



**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞININ**  
**REVERS TRANSKRİPTAZ PCR İLE TANISI**

**Dr. Metin ÖZDEMİR**  
**UZMANLIK TEZİ**

**TOKAT**  
**2009**

**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞININ**  
**REVERS TRANSKRİPTAZ PCR İLE TANISI**

**Dr. Metin ÖZDEMİR**  
**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Yrd. Doç. Dr. Yunus BULUT**

**TOKAT**  
**2009**

## TEZ TUTANAĞI

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı uzmanlık öğrencisi Dr. Metin ÖZDEMİR'in "KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞININ REVERS TRANSKRİPTAZ PCR İLE TANISI" konulu tezi Anabilim Dalımızda 07.05.2009 tarihinde tez danışmanı Yard. Doç. Dr. Yunus BULUT ve sınav jüri üyeleri tarafından incelenerek oybirliği ile uzmanlık tezi olabileceğine karar verilmiştir.

"Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı son yıllarda Türkiye'de ve 30'a yakın ülkede görülen, ölümcül bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu çalışmada Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi ile KKKA virüsü aranması ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yönteminin tanıda etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

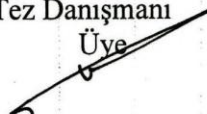
Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hastanesi ve Tokat ili sağlık kuruluşlarına başvuran, Sağlık Bakanlığının şüpheli/olası KKKA hastalığı tanımına uyan, 141 vakanın kan örneğinde, RT-PCR, hemogram ve biyokimyasal testler çalışıldı. 64 vakanın kan örneği karşılaştırma amacıyla Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi'nde ELISA yöntemi ile analiz edildi.

Ayrıca bu vakaların öyküleri incelenerek, hastalığın risk faktörleri, karakteristik bulguları ve çeşitli sosyo-demografik verileri hakkında bilgiler toplandı.

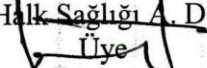
Her bir hastadan PCR, ELISA ve biyokimyasal testler için 10 ml ve hemogram için 2.5 ml kan örneği alındı. RT-PCR, ELISA, biyokimyasal testler ve hemogram analizleri yapıldı.

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri bilgisayar ortamında yapıldı. 141 kan örneğinin 84'ü RT-PCR ile pozitif, 57'si de negatif olarak bulundu. Hastalıktan ölüm oranını %5.95 olarak tespit edildi. RT-PCR ile Pozitif bulunan grupta Lökopeni ( $3.350/mm^3$ ), trombositopeni ( $103.500/mm^3$ ), Alanin Amino Transferaz (ALT) -Aspartat Amino Transferaz (AST) ( $50.5 U/L - 73.5 U/L$ ) yüksekliği belirgindi. Yaş grupları ve cinsiyet farklılığı gözlenmedi ( $P>0.05$ ). Tarım çalışanlarında hastalığa sık rastlandı ve kene temas öyküsü ( $P<0.05$ ) en büyük risk faktörü olarak gözlemlendi. RT-PCR yöntemi altın standart olarak değerlendirildiğinde ELISA yönteminin; Sensivitesi : % 42.5, Spesivitesi: % 45.8, Positive Predictive Value (PPV): % 56.6, Negative Predictive Value (NPV): % 32.3 olarak bulundu. KKKA hastalığının erken tanısında altın standart RT-PCR yöntemine güvenilmeli, ileri evrelerde ise ELISA yöntemi ile tanı desteklenmelidir."

Yard. Doç. Dr. Yunus BULUT  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.  
Tez Danışmanı

Üye  



Prof. Dr. Mücahit EĞRİ  
Halk Sağlığı A. D.

Üye  


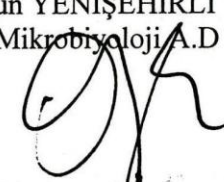
Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.

Üye  


Yard. Doç Dr. Şener BARUT  
Enfeksiyon Hastalıkları A. D.

Üye  


Yard. Doç. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.

Üye  


## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini ve her türlü desteği sağlayan tez danışmanım ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yard. Doç. Dr. Yunus BULUT'a, ihtisas süresince ve çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm anabilim dalımızın değerli öğretim üyesi, Sayın Yard. Doç. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ'ye, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, başta Uzm. Bio. Yelda DAĞCIOĞLU olmak üzere tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca çalışmamda bana yardımcı olan Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Mücahit EĞRİ'ye, tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, asistan ve çalışanlarına, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Rıza DURMAZ, Yard. Doç. Dr. Barış OTLU ve ekibine, Tokat il sağlık müdürlüğünden Dr. Fatih Şua TAPAR'a, adını yazamadığım ve bende emeği olan herkese teşekkür ederim.

Bana tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destek sağlayan aileme, desteğini ve fedakârlığını esirgemeyen eşime ve oğluma teşekkür ederim.

## ÖZET

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı son yıllarda Türkiye’de ve 30’a yakın ülkede görülen, ölümcül bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu çalışmada Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi ile KKKA virüsü aranması ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yönteminin tanıda etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hastanesi ve Tokat ili sağlık kuruluşlarına başvuran, Sağlık Bakanlığının şüpheli/olası KKKA hastalığı tanımına uyan, 141 vakanın kan örneğinde, RT-PCR, hemogram ve biyokimyasal testler çalışıldı. 64 vakanın kan örneği karşılaştırma amacıyla Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi’nde ELISA yöntemi ile analiz edildi.

Ayrıca bu vakaların öyküleri incelenerek, hastalığın risk faktörleri, karakteristik bulguları ve çeşitli sosyo-demografik verileri hakkında bilgiler toplandı.

Her bir hastadan PCR, ELISA ve biyokimyasal testler için 10 ml ve hemogram için 2.5 ml kan örneği alındı. RT-PCR, ELISA, biyokimyasal testler ve hemogram analizleri yapıldı.

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri bilgisayar ortamında yapıldı. 141 kan örneğinin 84’ü RT-PCR ile Pozitif, 57’si de Negatif olarak bulundu. Hastalıktan ölüm oranını %5.95 olarak tespit edildi. RT-PCR ile Pozitif bulunan grupta Lökopeni ( $3.350/mm^3$ ), trombositopeni ( $103.500/mm^3$ ), Alanin Amino Transferaz (ALT) -Aspartat Amino Transferaz (AST) (50.5 U/L - 73.5 U/L) yüksekliği belirgindi. Yaş grupları ve cinsiyet farklılığı gözlenmedi ( $P>0.05$ ). Tarım çalışanlarında hastalığa sık rastlandı ve kene temas öyküsü ( $P<0.05$ ) en büyük risk faktörü olarak gözlemlendi. RT-PCR yöntemi altın standart olarak değerlendirildiğinde ELISA yönteminin; Sensivitesi : % 42.5, Spesivitesi: % 45.8, Positive Predictive Value (PPV): % 56.6, Negative Predictive Value (NPV): % 32.3 olarak bulundu.

KKKA hastalığının erken tanısında altın standart RT-PCR yöntemine güvenilmeli, ileri evrelerde ise ELISA yöntemi ile tanı desteklenmelidir.

**Anahtar kelimeler:** Kırım Kanamalı Ateşi Hastalığı, RT-PCR, ELISA

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2007-3).

## ABSTRACT

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) disease is a deadly infection disease which is seen in Turkey as well as in more than 30 countries. Aim of the present study was to compare the efficiencies of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method and CCHF virus search and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) methods for diagnosis.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), hemogram and biochemistry tests were studied on 141 blood samples collected from the applicants to Gaziosmanpaşa University Hospital and Tokat city health institutions with the symptoms described of CCHF by Ministry of Health. Blood samples of 64 applicants were sent to Refik Saydam Hıfzısıhha Center to be compared by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method and were analyzed there.

The stories of those applicants were listened in order to obtain information about the risk factors of the disease, characteristic findings, and various socio-demographic data.

From each patient, a 10 ml blood sample was taken for PCR, ELISA and biochemical tests. An additional 2.5 ml blood was taken from each patient for hemogram. PCR, ELISA, biochemical tests and hemogram analyses were done.

The statistical analyses were performed on computer environment. Out of 141 blood samples, 84 were positive with RT-PCR, and 57 were negative. The death ratio because of the disease was 5.95%. In the group found to be positive with RT-PCR, Lokopenie ( $3.350/\text{mm}^3$ ), trombositopeni ( $103.500/\text{mm}^3$ ), Alanin Amino Transferaz (ALT) - Aspartat Amino Transferaz (AST) (50.5 U/L - 73.5 U/L) increases were determined. Age groups and sex differentiation were not observed. The disease is frequently found in agricultural workers, and the contact with the ticks is the highest risk factor. When RT-PCR method is taken as the golden standard, the sensitivity of the ELISA method was 42.5%, its specificity was 45.8%, its Positive Predictive Value (PPV) was 56.6%, and its Negative Predictive Value (NPV) was 32.3%.

RT-PCR method should be trusted in during the process of early diagnosis of the CCHF disease and in the future phases, the diagnosis should be supported by the ELISA method.

**Keywords:** Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, RT-PCR, ELISA

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

<b>TEZ TUTANAĞI</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>xi</b>
<b>TABLOLAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1.Tanım</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.TARİHÇE</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3. EPİDEMİYOLOJİ</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3.1. KKKA Hastalığının Türkiye’de Vaka ve Ölümünün Yıllara Göre Dağılımı</b> ..	<b>6</b>
<b>2.3.2. Hayvanlar Arasında KKKA Virüsü Yaygınlığı</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4. VEKTÖR KENELER</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5. VİRUS YAPISI VE REPLİKASYON</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5.1. Virus Replikasyonu</b> .....	<b>16</b>
<b>2.5.2. KKKA Virüsünün Filogenetik Grupları ve Dünya Üzerindeki Dağılımı</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5.3. Genetik Rekombinasyon ve Reassortmant</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6. PATOGENEZ</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6.1. İnterferon Sentezi ve KKKA Virüsünün İmmun Sistemden Kaçışı</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7. TEŞHİS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.8. KLİNİK</b> .....	<b>25</b>
<b>2.9. LABORATUVAR TANI METODLARI</b> .....	<b>26</b>
<b>2.9.1. Viral İzolasyon</b> .....	<b>27</b>
<b>2.9.2. Antijen Aranması</b> .....	<b>27</b>
<b>2.9.3. Moleküler Yöntemler</b> .....	<b>27</b>
<b>2.9.4. İndirek Serolojik Yöntemler</b> .....	<b>28</b>
<b>2.9.4.1. ELISA</b> .....	<b>29</b>

<b>2.9.5. İndirek İmmün Floresan Yöntemi.....</b>	<b>29</b>
<b>2.9.6. Revers Pasif Hemaglutinasyon İnhibisyonu .....</b>	<b>29</b>
<b>2.9.7. Nötralizasyon yöntemi.....</b>	<b>29</b>
<b>2.10. TEDAVİ.....</b>	<b>30</b>
<b>2.10.1. Sıvı Tedavisi.....</b>	<b>30</b>
<b>2.10.2. Antiviral ilaçlar .....</b>	<b>30</b>
<b>2.10.3. İnterferon.....</b>	<b>30</b>
<b>2.10.4. Kan ürünleri ve DİC tedavisi.....</b>	<b>31</b>
<b>2.10.5. Konvelesan plazma tedavisi .....</b>	<b>31</b>
<b>2.10.6. Koagülasyon modülatörleri.....</b>	<b>31</b>
<b>2.10.7. İmmünomodülatörler .....</b>	<b>31</b>
<b>2.11. KORUNMA VE KONTROL .....</b>	<b>31</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. HASTA POPULASYONU SEÇİMİ VE ÖRNEKLERİN ALINMASI.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. ÖRNEKLERİN HAZIRLANIŞI .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU(PCR).....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.1. RNA Elde Edilişi .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.2. Revers Transkripsiyon (RT) .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.3. Amplifikasyon.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Jel Görüntüleme .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4. SONUÇLARIN ANALİZİ VE YORUMLANMASI.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5. HEMOGRAM TESTLERİNİN ÇALIŞILMASI .....</b>	<b>39</b>
<b>3.6. ALT-AST, CK ÖLÇÜMÜ VE NORMAL DEĞERLERİ.....</b>	<b>39</b>
<b>3.7. ARAŞTIRMA VERİLERİNİN ANALİZİ .....</b>	<b>40</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. ÖLÜM ORANLARI.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. SOSYO-DEMOGRAFİK DEĞİŞKENLER.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. HASTALIĞIN KARAKTERİSTİK BULGULARI .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4. ÖYKÜ-RİSK FAKTÖRLERİ.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5. HEMATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL İNCELEMELER .....</b>	<b>46</b>
<b>4.6. PCR VE ELISA SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRMASI .....</b>	<b>47</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>48</b>
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>54</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>



## KISALTMALAR

<b>µL</b>	: Mikro litre
<b>ALT</b>	: Alanin Amino Transferaz
<b>AST</b>	: Aspartat Amino Transferaz
<b>BFB</b>	: Brom fenol blue
<b>bp</b>	: Base pair
<b>BSL-4</b>	: Biyo güvenlik seviye-4
<b>CCHFV</b>	: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus
<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>cDNA</b>	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
<b>CER</b>	: Hibrit böbrek/fibroblast hücre kültürü
<b>CF-1</b>	: Embriyonik fibroblast hücre kültürü
<b>CK</b>	: Kreatin fosfokinaz
<b>cRNA</b>	: Viral komplementer Ribo Nükleik Asit
<b>DEET</b>	: N,N-dietil-metatoluamid
<b>DIC</b>	: Yaygın Damar içi Pıhtılaşma
<b>dk</b>	: dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DTT</b>	: Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetikasit
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>FİTCH</b>	: Floresan izo tiyo siyanad
<b>Gc/G2</b>	: Glikoprotein-c
<b>Gn/G1</b>	: Glikoprotein-n
<b>GTPaz</b>	: Guanozintrifosfataz
<b>IFA</b>	: İndirek immunfloresan
<b>IFAT</b>	: İmmun floresan antikor testi
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>IgG</b>	: İmmünglobulin G
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IQR</b>	: İnter quartil range

<b>IRF-3</b>	: İnterferon düzenleyici faktör-3
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>KKKA</b>	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi
<b>KKKAV</b>	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü
<b>L protein</b>	: RNA bağımlı RNA polimeraz
<b>L</b>	: Büyük segment
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrogenaz
<b>LLC-MK2</b>	: Rhesus maymun böbrek hücre kültürü
<b>M</b>	: Orta segment
<b>mA</b>	: Mili amper
<b>MDA-5</b>	: Melanoma differentiation-associated gene-5
<b>MDCK-1</b>	: Madin-Darby canine kidney 1
<b>mg/dl</b>	: Miligram/desilitre
<b>MHIAF</b>	: Mouse Hiperimmun Asidic Flui
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>M-MLV</b>	: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
<b>MxA</b>	: İnterferon indükleyici protein
<b>N</b>	: Nükleokapsid protein
<b>NPV</b>	: Negatif Prediktif Değer
<b>NSM</b>	: M segment nonstrüktürel protein
<b>NSS</b>	: S segment nonstrüktürel protein
<b>ORF</b>	: Açık okuma bölgeleri
<b>OTU-like</b>	: Ovaryan tümör benzeri
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PPV</b>	: Pozitif Prediktif Değer
<b>PreGc</b>	: Glikoprotein-c preküsörü
<b>PreGn</b>	: Glikoprotein-n preküsörü
<b>RIG-1</b>	: Retinoic acid-inducible gene-1
<b>RKLL</b>	: Arginin-lizin-lösin-lösin
<b>RKPL</b>	: Arginin-lizin-prolin-lösin
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>rNP</b>	: Rekombinant nükleoprotein
<b>RPHA</b>	: Reverse Passive Hemagglutination Assay
<b>RRL</b>	: Arginin-arginin-lösin-lösin

<b>RSKR</b>	: Arginin-serin-lizin-arginin
<b>RT</b>	: Reverse Transcription
<b>RT</b>	: Reverse Transcription
<b>RT-PCR</b>	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<b>S</b>	: Küçük segment
<b>SKI-1/S1P</b>	: Prolizin benzeri subtilaz
<b>sn</b>	: saniye
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for the Social Sciences
<b>SW-13</b>	: Human Caucasian adrenal cortex adenocarcinoma hücre kültürü
<b>TBE</b>	: Tris Borate EDTA
<b>TE</b>	: Tris EDTA
<b>Th-1</b>	: Yardımcı T hücreleri tip-1
<b>TNF</b>	: Tümör nekrozu faktörü
<b>UV</b>	: Ultraviole
<b>V</b>	: Volt
<b>Vero</b>	: Afrika yeşil maymun böbrek hücresi hücre kültürü
<b>VKA</b>	: Viral Kanamalı Ateş

## ŞEKİLLER

- Şekil 1.** Türkiye 2002-2008 yılları KKKA hastalığı vaka ve ölüm sayılarının dağılımı
- Şekil 2.** 2007 yılı KKKA vakaların illere dağılımı
- Şekil 3.** KKKA hastalığı aylara göre dağılımı
- Şekil 4.** 2004- 2007 yılları cinsiyet dağılımı
- Şekil 5.** *Hyalomma marginatum marginatum* kenelerinin Türkiye üzerinde dağılımı
- Şekil 6.** *Bunyaviridaeae* viriyonunun kesitsel görünümü
- Şekil 7.** KKKA virüs kesiti ve segmentlerin şematik görünümü
- Şekil 8.** Matin suşu glikoprotein ORF şeması
- Şekil 9.** KKKAV ve Dugbe virüs L segment ORF'leri
- Şekil 10.** Komplamenter 3' ve 5' uç bölgeleri
- Şekil 11.** Virüs replikasyon ve transkripsiyonu
- Şekil 12.** RNA S segmentine göre filogenetik grupların dünya üzerindeki dağılımı
- Şekil 13.** S, M, L segmentlere göre filogenetik dallanma
- Şekil 14.** Reassortmant
- Şekil 15.** A-Fagosite edilmiş eritrosit, B- Makrofaj tarafından fagosite edilmiş trombosit
- Şekil 16.** Viral hemorajik ateş hastalıklarında patogenez
- Şekil 17.** KKKA hastalığının klinik ve laboratuvar seyri
- Şekil 18.** Görüntülenmiş jel elektroforez
- Şekil 19.** PCR Pozitif ve Negatif Hastaların Cinsiyet Dağılımı
- Şekil 20.** PCR Pozitif ve Negatif Hastaların Mesleki Dağılımı
- Şekil 21.** PCR Pozitif ve Negatif Hastaların Yaş Grupları Dağılımı
- Şekil 22.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasındaki Klinik Yakınmalarının Dağılımı
- Şekil 23.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasında Öykülerinde Var Olan Risk Faktörlerinin Dağılımı
- Şekil 24.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olgularda İlk Başvuru Sırasında Yapılan Hematolojik ve Biyokimyasal İncelemelerde Normal Sınırlar Dışında Gözlenen Bazı Parametrelerin Dağılımı

**TABLULAR**

- Tablo 1.** KKKA Hastalığı Salgınları
- Tablo 2.** Türkiye 2002-2008 yılları KKKA hastalığı vaka ve ölüm sayıları
- Tablo 3.** 2004- 2007 yılları cinsiyet dağılımı
- Tablo 4:** KKKA virüsü ile ilişkili başlıca kene türleri ve görüldüğü ülkeler ve bölgeler
- Tablo 5.** *Bunyaviridae* ailesi
- Tablo 6.** Ülkemizde bildirilen KKKA olgularının belirti ve bulguları
- Tablo 7.** KKKA Hastalığı ile Karışan Hastalıklar ve Ayırıcı Tanı
- Tablo 8.** Laboratuvar Tanı Metodları
- Tablo 9.** PCR Döngü Programı
- Tablo 10.** ALT normal değerleri
- Tablo 11.** AST normal değerleri
- Tablo 12.** CK normal değerleri
- Tablo 13.** Çalışma Ölüm Oranları
- Tablo 14.** PCR (+) KKKA Vakaları ile PCR (-) Şüpheli Vakaların Bazı Sosyo-Demografik Değişkenlere Göre Dağılımı
- Tablo 15.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasındaki Klinik Yakınmalarının Dağılımı
- Tablo 16.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasında Öykülerinde Var Olan Risk Faktörlerinin Dağılımı
- Tablo 17.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olgulara İlk Başvuru Sırasında Yapılan Hematolojik ve Biyokimyasal İncelemelerde Normal Sınırlar Dışında Gözlenen Bazı Parametrelerin Dağılımı
- Tablo 18.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olgulara İlk Başvuru sırasında yapılan hematolojik ve biyokimyasal incelemelerde gözlenen bazı parametreler
- Tablo 19.** PCR ve Ulusal Referans Laboratuvar ELISA sonuçlarının Karşılaştırılması

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı son yıllarda ülkemizin bazı bölgelerinde sık olmakla birlikte dünyada Asya, Orta Doğu, Doğu Avrupa ve Afrika'da 30'a yakın ülkede görülmüş yaygın ve ölümcül bir enfeksiyon hastalığıdır. Enfeksiyonun etkeni *Bunyaviridae* ailesinden *Nairovirüs* türüne dahil olan *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus* (CCHFV) dür (1-3).

KKKA hastalığı tarım ve hayvancılık (çobanlar, tarlada-çiftlikte çalışanlar, mezbaha çalışanları, kasaplar) ile ilgilenenler başta olmak üzere veterinerler, kamp-piknik yapanlar ve askerlerde, genellikle *Hyalomma* cinsi enfekte kenelerin ısırması, kenelerin ezilmesi ve enfekte hayvan teması ile bulaşabilmekte ve bu kenelerin dünyadaki dağılımı ile hastalığın yaygınlığı paralellik göstermektedir. Hastalığın bakımı ve teşhisinde görevli sağlık personeli arasında da hasta insanların kan, vücut salgıları veya dokularına teması sonrası sık görülmektedir (2, 4, 6-9).

Hastalık mevsimsel özellik göstermekte, ilkbahar ve yaz aylarında sık görülmektedir. Bazı çalışmalarda ocak ayında vakaların görüldüğü bildirilmiştir (5, 8).

Tüm viral kanamalı ateş hastalıklarında olduğu gibi nonspesifik bulgular gösteren KKKA hastalığında, genel olarak halsizlik, kas-eklem ağrıları, baş ağrısı, ateş, ishal, karın ağrısı, göğüs ağrısı ilk bulgular olabilmektedir. Enfeksiyonun ilerlemesi ile birlikte hemostazın bozulması sonucu yaygın kanamalar ve yaygın damar içi pıhtılaşması (DIC) görülmektedir. (10, 11). Bu ağır tablo sonucunda geç ve yetersiz tedavi ile kısa sürede yüksek ölüm oranları (ülkemiz için %5-10, bazı ülkelerde %30) sonucu hastalar kaybedilebilmektedir (2, 6, 12).

Hastalığın geniş bir coğrafyada görülüşü, biyoterörizm ajanı olarak kullanılabilme özelliği, sinsi başlangıçlı akut ve ölümcül seyrediyor olması tedaviyi geciktirmemek için hızlı tanı yöntemleri gerektirmektedir (13). Serolojik tanı metodları kullanılıyor olmasına rağmen antikor cevabının geç oluşması sebebiyle daha hızlı bir tanı yöntemi olan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile erken tanı konulabilmektedir (14-17).

Çalışmamızda Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezine ve Tokat ili sağlık kuruluşlarına KKKA hastalığı şüphesi ile başvuran, Sağlık Bakanlığı'nın belirlemiş olduğu kriterlere uyan vakaların, kan örnekleri alınarak Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve RT-PCR metodu ile KKKA virüsü aranması ve her iki testin etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yine bu kan örneklerinden

hematolojik ve biyokimyasal testler çalışılarak hastalığın değiştirebildiği parametreleri tespit edip, klinisyenlere benzer tabloya sahip hastalıkları ayırıcı tanısına katkı sağlanabilecektir. Ayrıca bu vakaların öyküleri incelenerek, hastalığın risk faktörleri, karakteristik bulguları ve çeşitli sosyo-demografik verileri hakkında bilgi de edinilebilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞI

#### 2.1.1.Tanım

Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi hastalığı, ateş ve kanama ile seyreden, şiddetli vakalarda şok sonucu önemli oranda ölümcül seyreden, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) ile oluşan viral kanamalı ateş (VKA) hastalığıdır. Enfeksiyonun etkeni olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) *Bunyaviridae* ailesinden *Nairovirus* türüne dahildir (1-5).

#### 2.2.TARİHÇE

İran ve eski Sovyet literatürlerine göre 12. Yüzyılda Orta Asya'da şimdiki Tacikistan'da Zeyn ed-Din ebu İbrahim İsmail ibn Muhammed el-Hüseyini el-Curcani (1136 da Merv de ölmüş) isimli bir hekim tarafından idrarda, dışkıda, balgamda, kusmukta kan ve karın boşluğunda kanama ile seyreden bir hemorajik hastalık tanımlanmıştır. Siyah bir kuşun normal bir paraziti olan, küçük bit veya kene gibi bir artropodun bu hastalığın sebebi olduğunu belirtmiştir. O dönemde hastalığı taze keçi sütü ve çeşitli bitki esansları ile tedavi etmeye çalışmışlardı (1).

Özbekistan'da yöresel adı ile "Hungribta (kan alımı)", "Khunymuny (burun kanaması)", "Karakhalak (kara ölüm)" gibi isimlerle anılmıştır (18). Bu yüzyılda ise ilk kez Kırım'da Nazi işgalinden kurtulan köylülere tarlalarında yardım eden 200 Sovyet askerinde 1944-1945 yıllarında bu hastalık görülmüştür (2,19). Kene ile ilişkisi o zamanlar belirlenen hastalığa Kırım Hemorajik Ateşi ismi verilmiş, daha sonraki yıllarda Kırım'a komşu ve yakın ülkelerde de rastlanmıştır (1). Bu sırada etken virus hasta kanından ve *Hyalomma marginatum marginatum* kene türünden izole edilmiştir. Afrika'da o zaman Belçika Kongosu olarak bilinen Zaire'de ateşli bir çocuktan Kongo virus 1956 yılında izole edilmiştir (19) . Simpson ve arkadaşları 5'i laboratuvar kaynaklı 12 sarılıklı hastanın serumlarını yenidoğan farelere enjekte ederek, virüsü 1967 yılında tanımlamıştır (20). Bu araştırmacılar daha sonra 1956 da izole edilen Kongo virüsü ile bu virusun aynı serolojik özellikte olduklarını ve dolayısı ile aynı virüs olduklarını bildirmişlerdir (1, 2, 6, 8, 21).



Moskova'da Poliomyelit ve Viral Ensefalitler Enstitüsünde Chumakov-Butenko ve arkadaşları (1) 1967'de virüs izolasyonunda ilk kez yenidoğan beyaz fare ve yenidoğan beyaz ratları kullanarak KKKA virusunu izole ettiler ve kompleman fiksasyonu yöntemi ile doğruladılar (1). Bu metod ile Astrakhan'da Drostov isimli hastadan izole edilen Drostov suşu deneysel çalışmalarda prototip suş olarak kullanılmaya başlandı. Dahası bu virüs izolasyonu ile araştırmalar gerçek virüs ile gerçekleştirmeye başladı. Bu suş serolojik antikor-antijen üretimi, farklı coğrafik bölgelerden virüs tanımlanması ve sınıflandırılması imkanı sağlamıştır (1, 2).

Donets (1) 1974'de elektron mikroskopik olarak virüsü tespit etmiş ve boyutlarını 100-300 nm olarak bildirmiştir. Donets ve Chumakov, Korolev ve arkadaşları tek zincirli bu Ribo Nükleik Asit (RNA) virüsünü morfogenez olarak tipik *Bunyaviridae* ailesi üyesi olarak görmüşlerdir (1).

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 Aspartat Amino Transferaz (AST), Alanin Amino Transferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH) yüksekliği, lökopeni ve trombositopenisi olan kanamalı ateş vakaları, Tokat başta olmak üzere Çorum, Sivas, Yozgat illeri ve civarından bildirilmiş ve 2003 yılında hastalığın KKKA hastalığı olduğu doğrulanmıştır (18, 22).

### 2.3.EPIDEMİYOLOJİ

Dengue virusundan sonra hemorajik virusler açısından insan sağlığı için en önemli ikinci virüs olan KKKA virüsü kene kaynaklı olup, bu kenelerin yaygın dağılımı ile doğrudan alakalıdır ve geniş bir coğrafyayı etkilemektedir (6, 2, 8).

Hastalık ilk defa Rusya'nın Kırım bölgesinde 1940'larda keşfedildi ve şimdi dünyanın çoğu bölgesinden bildirilmektedir: Afrika, Orta Doğu, Asya ve Güney Doğu Avrupa. 1970 yılından önceki vaka bildirimlerinin çoğu eski Sovyetler Birliği ülkeleri (Kırım, Astrakhan, Rostov, Özbekistan, Kazakistan, Tacikistan), Afrika'nın bazı bölgeleri (Uganda ve Demokratik Kongo Cumhuriyeti) ve Bulgaristan'dan gelmekteydi (2, 20, 23). Salgınlar Tablo-1'de özetlenmiştir. Ayrıntılı bilgi olmamasına rağmen bilinen ilk salgın 1965 yılında Çin'de meydana gelmiştir ve %80 ölüm oranı görülmüştür (24).

**Tablo 1. KKKA Hastalığı Salgınları (2)**

Coğrafik bölge	Yıllar	Vaka sayısı	Ölüm oranı(%)	Meslek
<b>Güneydoğu Avrupa</b>				
Kırım	1944–1945	200	10	Askeri personel
Astrakhan	1953–1963	104	17	Tarım çalışanı
Rostov	1963–1969	323	15	Tarım çalışanı
Bulgaristan	1953–1974	1105	17	Tarım ve sağlık çalışanı
	1975–1996	279	11	Tarım çalışanı
	1997–2003	138	21	Tarım çalışanı
Arnavutluk	2001	7	0	Tarım ve sağlık çalışanı
Kosova	2001	18	33	Tarım çalışanı
Türkiye	2002–2008	3110	5	Tarım ve sağlık çalışanı
<b>Asya</b>				
Çin	1965–1994	260	21	Tarım çalışanı
	1997	26	24	Tarım çalışanı
Kazakistan	1948–1968	75	50	Tarım çalışanı
Tacikistan	1943–1970	97	23	Tarım ve laboratuvar çalışanı
Pakistan	1976	14	29	Çoban, sağlık çalışanı
	1994	3	?	Sağlık çalışanı
	2000	9	55	Tarım ve sağlık çalışanı
<b>Orta Doğu</b>				
Birleşik Arab Emirlikleri (BAE)	1979	6	50	Sağlık çalışanı
	1994–1995	11	73	Tarım çalışanı
Sharjah BAE	1980	1	0	Mağaza çalışanı
Irak	1979–1980	55	64	Tarım çalışanı
S. Arabistan	1990	7		Tarım çalışanı
Umman	1995–1996	4	?	Tarım çalışanı
İran	2003	81	18	Tarım çalışanı
<b>Afrika</b>				
Zaire (Kongo)	1956	2	0	Doktor
Uganda	1958–1977	12	8	Laboratuvar çalışanı
Moritanya	1983	1	0	Deve sürüsü sahibi
	2004	38	29	Tarım çalışanı, sağlık çalışanı
Burkina Faso	1983	1	0	?
Güney Afrika Cum	1981–1986	32	31	Çiftçi, sağlık çalışanı
Tanzania	1986	1	0	Öğrenci
Güneybatı Afrika	1986	1	0	?
Kenya	2000	1	100	Tarım çalışanı

Major KKKA epidemileri ve salgınlarını tanımlayan birçok rapor mevcuttur. Bu raporlar virusun geniş coğrafik dağılımını göstermektedir. Bu dağılım Çin'in Xinjiang

bölgesinden Ortadoğu'ya uzanan Asya'nın çoğu, Güney Rusya, Afrika'nın endemik bölgeleri, Güneydoğu Avrupa'nın bazı bölgelerini kapsar. Buna göre KKKA virüsü, bilinen birçok ciddi hemorajik ateş arasında dünyada çok yaygın bir viral etkindir (25).

Afrika'dan 1960'larda bildirimler olmuştur. Güney Afrika, Kongo, Moritanya, Burkina-Faso, Tanzanya ve Senegal'den de salgınlar rapor edildi (26 - 30). Önemli sayıda vaka Ortadoğu ülkelerinden (Irak, Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Umman), Pakistan ve Çin den de bildirildi (31-39).

Pakistan, İran, Senegal, Yugoslavya, Bulgaristan, Arnavutluk, Kenya, Moritanya ve Türkiye,'den 2000'li yıllarda yeni salgınlar rapor edildi (40-51). Virüs izolasyonu Yunanistan'da yapılabilmiş olmasına rağmen, KKKA virüsünün serolojik kanıtları ise, Hindistan, Mısır, Portekiz, Macaristan, Fransa, Benin ve Kazakistan'dan bildirilmiştir (2, 52-57). Yunanistan'da rapor edilen hasta bir laboratuvar enfeksiyonuydu. Yunanistan'da laboratuvar enfeksiyonuna yol açan bu AP92 kodlu suş, balkan yarımadası, Türkiye, Rusya ve diğer KKKA viruslerinden büyük filogenetik farklılığa sahipti. Ancak 2008 yılında Yunanistan'ın Bulgaristan ile olan sınır bölgesinde AP92 suşuna benzemeyen, balkanlarda yaygın görülen suş ile enfekte, ölüm ile neticelenen bir vaka görülmüştür. KKKA virüsü balkanlarda: Bulgaristan, eski Yugoslavya, Arnavutluk'ta endemiktir (6, 58, 59).

KKKA virüsünün yaygın vektörü *Hyalomma* genusu keneleridir. Virüs insanlara hem *Hyalomma* kenelerinin, hem de enfekte evcil hayvanların doğrudan teması ile yayılır. KKKA virüsü yayılım döngüsü başlıca keneleri, vahşi ve evcil hayvanları içermesi bakımından öncelikle bir zoonozdur. Sığır, koyun ve keçiler enfeksiyondan sonra hastalanmazlar fakat bir hafta viremik olurlar. Virüs bu periyod boyunca bu hayvanlar ile teması olan tarım çalışanlarına, veterinerlere ve mezbaha işçilerine bulaşabilir, tarım çalışanları birinci derece risk altındadır. Ayrıca virüs, enfekte ticari hayvanlar ile de diğer coğrafi bölgelere yayılabilir. Deneysel olarak virüs ile enfekte edilmiş devekuşları, hiçbir hastalık semptomu görülmemesine karşın virüs, kan, karaciğer, dalak ve böbrekten izole edilmiştir. Öncelikle hastane ortamlarında insandan insana virüsün yayılımı olabilir. Tarım çalışanlarından sonra ikinci olarak sağlık çalışanları da en çok risk altında olan kesimdir (6, 58, 60).

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

KKKA hastalığının 2002 yılında Türkiye'de ilk bildiriminden sonra artan sayıda vaka ve ölümler olmuştur. Önemli sayıdaki vaka ve ölümler ise özellikle Tokat ilimiz ve

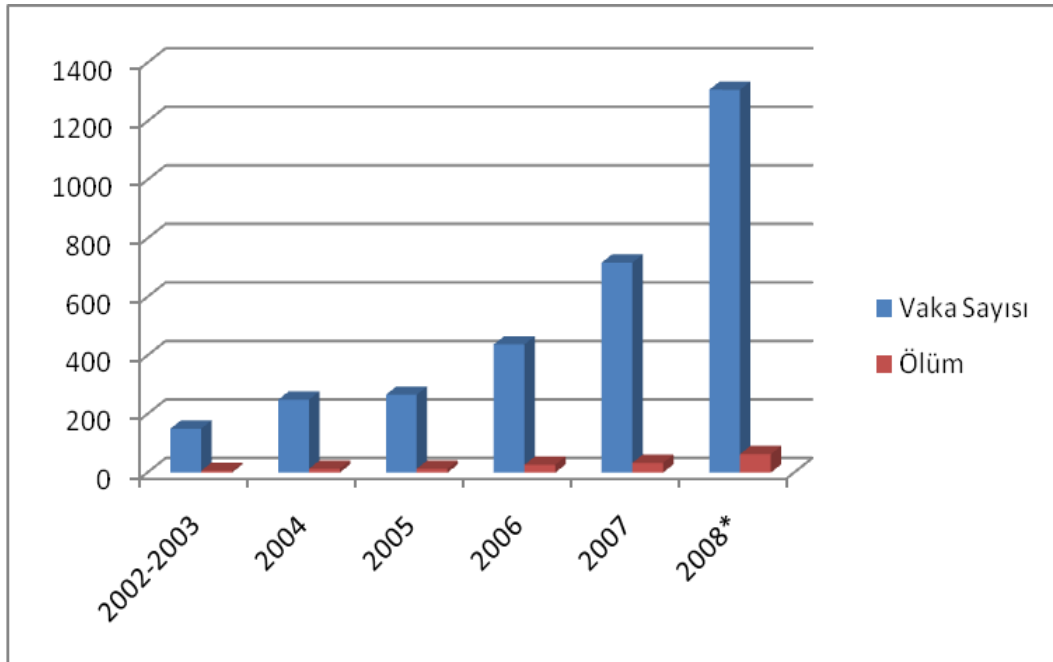
çevresinde olmuştur (2, 22, 50). Kayıtlara göre 3110 vaka 2002 ile Ekim 2008 yılları arasında görülmüştür (Tablo 2) - (12, 61).

Türkiye’de 2002-2008 yılları arasında sayısı giderek artarak, toplam 3110 vaka görülmüş olup, bunların 155 tanesi ölüm ile neticelenmiştir. Türkiye’de yıllara göre vaka ve ölüm sayıları Tablo-2 ve Şekil-1’de gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Türkiye 2002-2008 yılları KKKA hastalığı vaka ve ölüm sayıları (12)

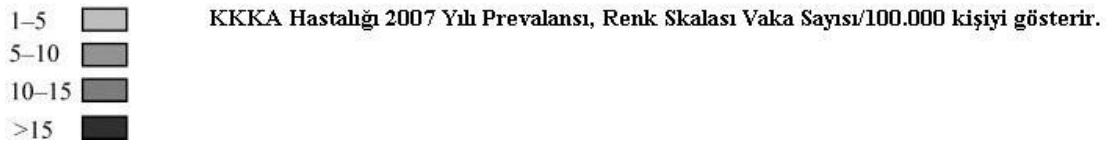
Yıllar	Vaka Sayısı	Ölüm
2002-2003	150	6
2004	249	13
2005	266	13
2006	438	27
2007	717	33
2008*	1308	63
<b>TOPLAM</b>	<b>3110</b>	<b>155</b>

\*14 Ekim 2008



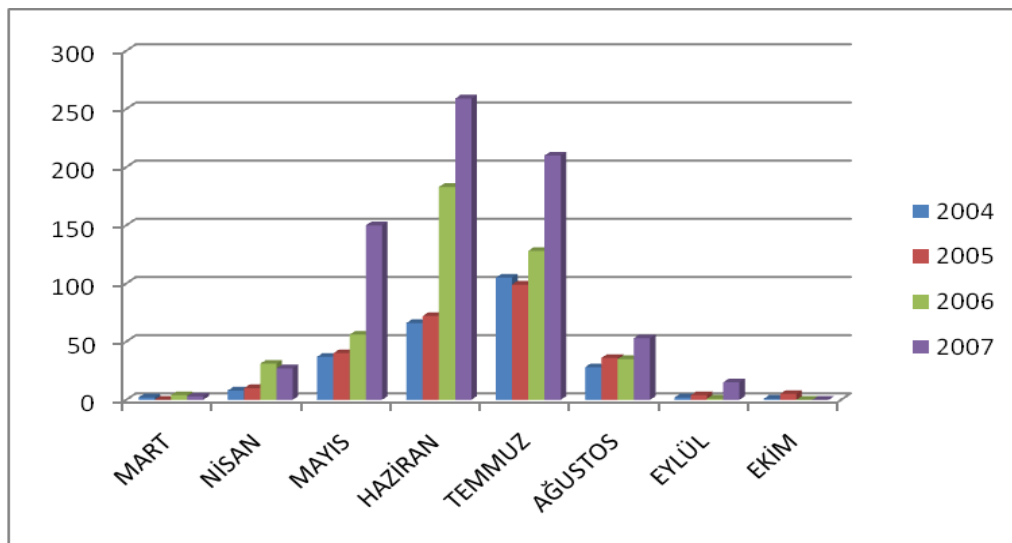
**Şekil 1:** Türkiye 2002-2008 yılları KKKA hastalığı vaka ve ölüm sayılarının dağılımı (12)

Haritada (Şekil 2) 2007 yılında vakaların illere dağılımı gösterilmiştir. Tokat ilinde 15/100.000 den daha fazla vaka görülmüştür.



**Şekil 2:** 2007 yılı KKKK vakaların illere dağılımı (61)

Hastalık ülkemizde özellikle Şekil-3'de görüldüğü gibi mart-nisan aylarında görülmeye başlayıp mayıs- haziran-temmuz ve ağustosta aylarında en fazla görülmektedir (61).

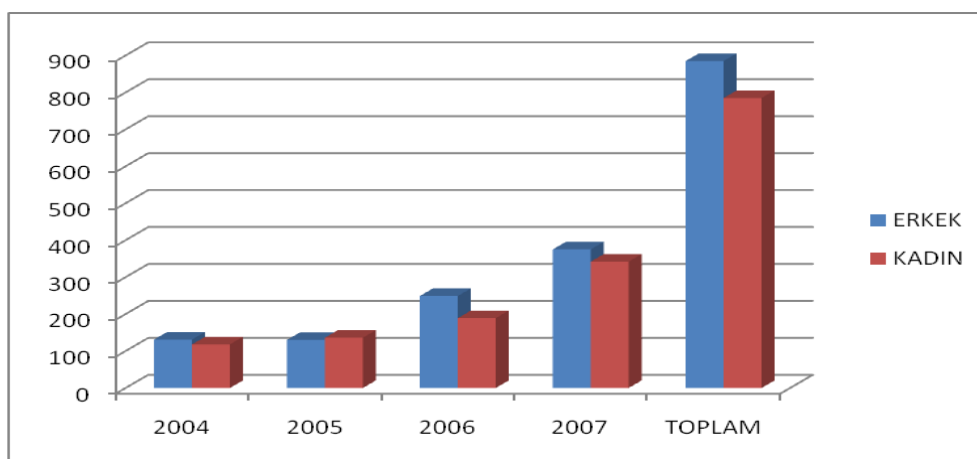


**Şekil 3:** KKKK hastalığı aylara göre dağılımı (61)

2004- 2007 yılları analizleri Tablo-3 ve Şekil-4'te görülmektedir. Buna göre hastalığın ülkemizde erkek ve kadın cinsi arasında aynı oranda olduğu görülmüştür(61).

**Tablo 3:** 2004- 2007 yılları cinsiyet dağılımı (61)

	2004	2005	2006	2007	<b>TOPLAM</b>
<b>ERKEK</b>	131	130	249	375	885
<b>KADIN</b>	118	136	189	342	785



**Şekil 4:** 2004- 2007 yılları cinsiyet dağılımı (61)

### 2.3.2. Hayvanlar Arasında KKKA Virüsü Yaygınlığı

İran'da 88 evcil hayvanda yapılan sero epidemiyolojik bir çalışmada koyunlarda %53.3, sığırlarda %38.5, keçilerde %18.6 ve toplamda %37.9 seropozitiflik bulunmuştur (60, 62). Umman'da yapılan diğer bir çalışmada 489 evcil hayvanın 108 (%22)'inde KKKA virusu seropozitif bulunmuştur (63). Suudi Arabistan'da da koyun, keçi ve sığırdaki seropozitiflik gösterilmiştir (64).

### 2.4. VEKTÖR KENELER

Ülkemizde halk arasında sakırğa, yavşa, kerni gibi isimlerle de bilinen keneleri, dünyanın her bölgesinde görmek mümkündür (65). Günümüzde dünyada kenelerin 899 türü izole edilmiştir. Morfolojik, biyolojik ve davranış biçimlerine göre de *Ixodidea* (713 tür), *Nuttalliellidae* (1 tür) ve *Argasidae* (185 tür) olmak üzere 3 aile tariflenmiştir (66). KKKA virusunun başlıca vektörleri zoonotik enfeksiyon oluşturan *Hyalomma* cinsi

kenelerdir. 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 virüsü izole edilmiştir (1, 67-70). Virüs izole edilen bu kenelerin tümü *Ixodidea* ailesi içerisinde yer almaktadır (66).

Hastalığın doğadaki esas taşıyıcısı ve rezervuarı olarak keneler kabul edilirler. Virüsü evcil ve yabani hayvanlar ancak 7-10 gün kadar barındırabilmelerine karşın, virüs kenelerde ömür boyu (1-1.5 yıl), hatta nesiller boyu (transovaryal ve transstadial geçiş) kalmakta ve çoğalabilmektedir (1). Epidemiyolojik yönden 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 hasta insanların vücut sıvıları ile temasıdır (2, 6).

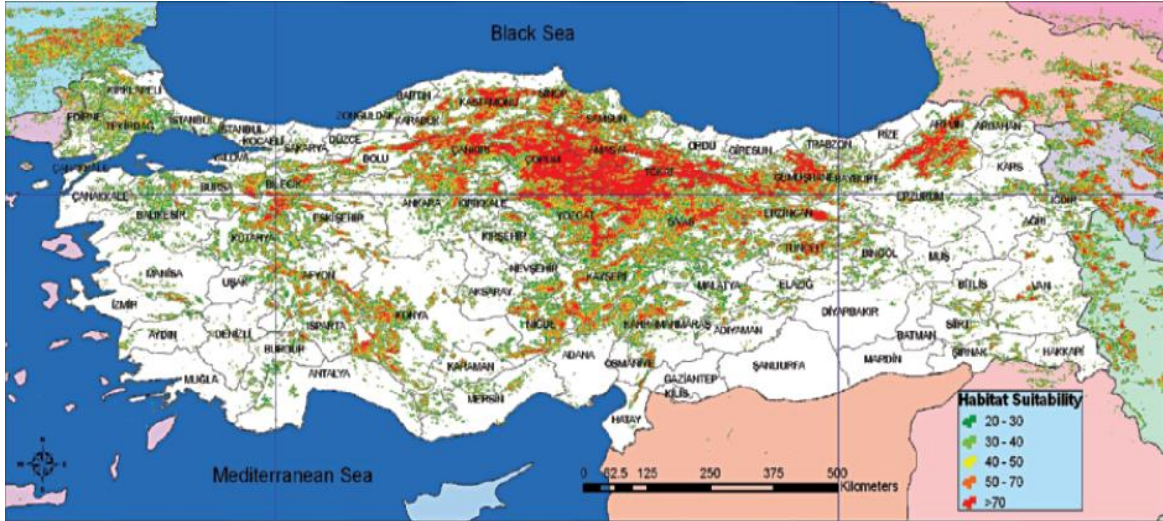
Türkiye’de ise *Ixodidea* ve *Argasidae* ailelerinden 32 tür tanımlanmıştır (70, 71). Tokat ili ve çevresini oluşturan Kelkit vadisinde yapılan bir çalışmada *Hyalomma marginatum* ve *Rhipicephalus bursa* en fazla bulunan kene türü olmuştur (72). Ayrıca Nijerya’da sığır yaşam alanlarında yakalanan tatarcıkta sindirilmemiş kandan virüs izole edilmiştir (1, 6).

Tablo-4’te KKKA virüsü ile ilişkili başlıca kene türleri ve görüldüğü ülkeler ve bölgeler özetlenmiştir (73)

**Tablo 4:** KKKA virüsü ile ilişkili başlıca kene türleri ve görüldüğü ülkeler ve bölgeler (73)

Bölge-Ülke	Kene Türleri
Batı ve Güney Afrika	<i>Hyalomma marginatum rufipes</i> ve <i>Hyalomma turanicum</i>
Madagaskar	<i>Boophilus microplus</i>
Çin	<i>Hyalomma asiaticum asiaticum</i>
Özbekistan	<i>Hyalomma asiaticum asiaticum</i>
Tacikistan	<i>Dermacentor niveus</i>
Pakistan	<i>Hyalomma anatolicum</i>
Rusya, Balkanlar	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i>
Türkiye	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i>
Yunanistan	<i>Rhipicephalus bursa</i>

*Hyalomma marginatum marginatum* kenelerinin Türkiye üzerinde dağılımı Şekil-5’te gösterilmiştir. Renk yeşilden kırmızıya doğru geçtikçe kene yoğunluğu artmaktadır.



Şekil 5: *Hyalomma marginatum marginatum* kenelerinin Türkiye üzerinde dağılımı (74).

## 2.5. VİRUS YAPISI ve REPLİKASYON

KKKA hastalığı virüsü *Bunyavirus* ailesindedir. *Bunyavirus* ailesinde *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* ve *Tospovirus* ve Sınıflandırılmayan *Bunyaviridae* olmak üzere 6 farklı grupta 300 den fazla virüs bulunmaktadır (Tablo 5) (75).

Tablo 5. *Bunyaviridae* ailesi (75)

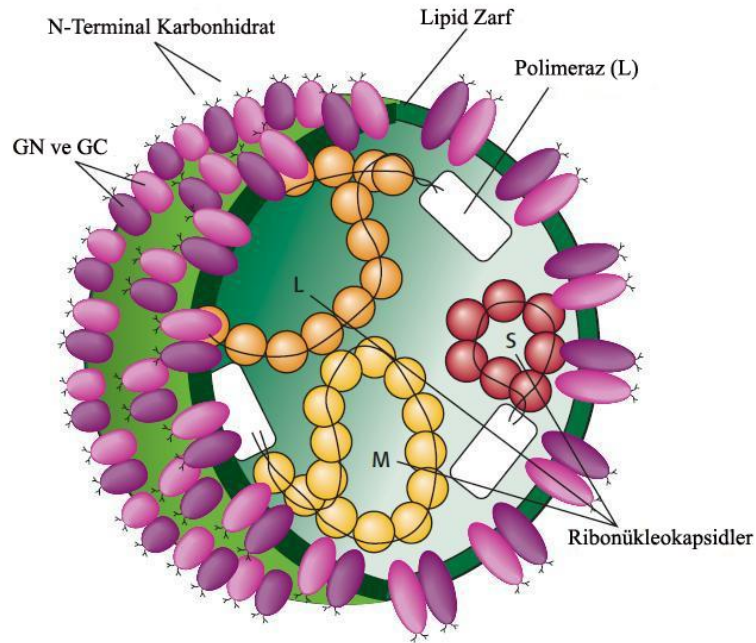
### *Bunyaviridae*;

1. *Hantavirus*
2. *Nairovirus*
  - a. *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*
  - b. *Dera Ghazi Khan virus*
  - c. *Dugbe virus*
  - d. *Hughes virus*
  - e. *Qalyub virus*
  - f. *Sakhalin virus*
  - g. *Thiafora virus*
3. *Orthobunyavirus*
4. *Phlebovirus*
5. *Tospovirus*
6. Sınıflandırılmayan *Bunyaviridae*



Nairovirus grubunda 7 farklı serogrup bulunmaktadır. Koyun hastalığı virüsü ve *Dugbe* virüs grubunu bazı kaynaklar tek virüs grubu olarak ele almaktadır. Aslında *Nairobi* koyun hastalığı virüsü ve *Dugbe* virüs, koyun ve keçilerde primer patojen olmalarına karşın *Dugbe* virüsün insanlarda da ateş ve trombositopeni yaptığı gözlenmiştir (2, 3, 6, 75).

KKKA hastalığı virüsü yaklaşık 5-7 nm kalınlığında zarfa sahip bir RNA virüsüdür. Virüs 80-120 nm çapındadır. Virüs genomu tek zincirli, üç parçalı ve negatif yönelimli bir RNA yapısına sahiptir. Bu üç parça; büyük (L), orta (M) ve küçük (S) olarak isimlendirilir, helikal ve sirküler (Şekil 6) yapıdadır (6).



Şekil 6. Bunyavirideae viriyonunun kesitsel görünümü (2)

RNA'nın toplam moleküler ağırlığı  $5 \times 10^6$  daltondur.

S segment:  $0.28 \times 10^6$  -  $0.50 \times 10^6$  dalton, kodladığı nukleokapsid (N) polipeptid ( $19 \times 10^3$  -  $25 \times 10^3$  dalton).

M segment:  $1.8 \times 10^6$  -  $2.3 \times 10^6$  dalton, kodladığı iki glikoprotein (G), G1/Gn ( $108 \times 10^3$  -  $120 \times 10^3$  dalton) ve G2/Gc ( $29 \times 10^3$  -  $41 \times 10^3$  dalton).

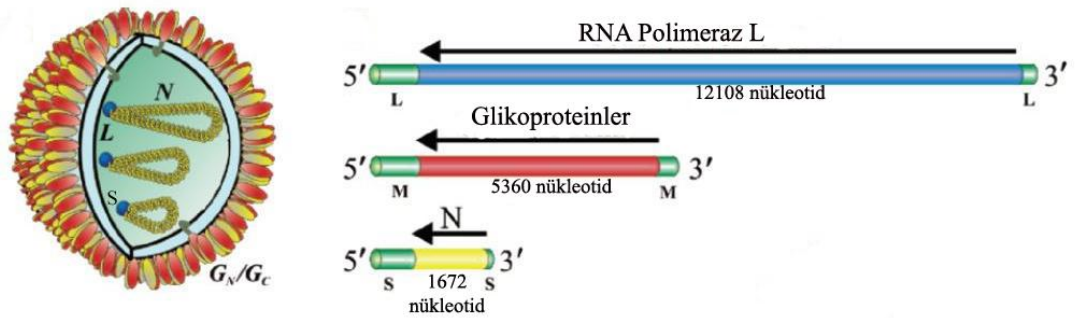
L segment:  $2.7 \times 10^6$  -  $3.1 \times 10^6$  dalton (6, 76, 77). Yüzeyinde yaklaşık 8-10 nm uzunluğunda 2 glikoprotein dikensi çıkıntı bulunmakta (Gn ve Gc) ve bunlar enfektivite ile alakalı olup, kırmızı kan hücrelerini hemaglutine etme özelliğindedir (6, 21). Negatif boyalı elektron

mikroskopide bakıldığında, belli bir düzende yerleşmemiş merkezi boşluklar göstermeyen çok küçük morfolojik yüzey birimlerine sahip olmalarından dolayı diğer bunyavirüslerden farklı görülmektedir (2, 6, 21). Üç genom segmenti de açık okuma bölgeleri (ORF), yanında kodlamayan bölgeler de içerir. Dört yapısal protein (Şekil 7) kodlanır:

-L segmentinin (12.108 nükleotid) kodladığı RNA bağımlı RNA polimeraz (L protein)

-M segmentinin (5360 nükleotid) kodladığı matür glikoproteinler olan Gn ve Gc (G1 ve G2)

-S segmentinin (1267 nükleotid) kodladığı nükleokapsid protein (N) (78)

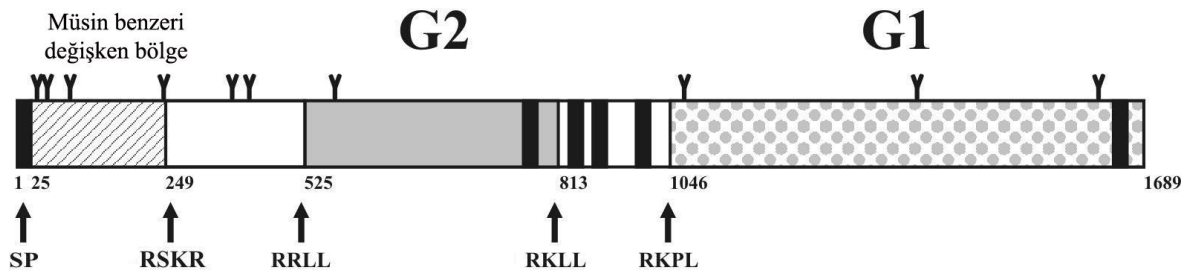


Şekil 7. KKKA virüs kesiti ve segmentlerin şematik görünümü (78)

Kırım Kongo virüsü hücre içinde aktin filamentleri ile etkileşir. Nükleoproteinler perinükleer bölgeyi hedefler ve enfekte hücrenin perinükleer bölgesine lokalize edilir. KKKA virüsü nükleoproteinleri golgi membranlarına bağlı bir protein gibi eksprese edilmez, aktin filamentleri ile ilişkilidir (79).

Bu üç genom segmenti (L, M, S) nükleoprotein ve viral RNA polimeraz ile ribonükleoprotein şeklinde kapsidlenmiştir (6, 79). KKKA virüsünün glikoprotein poliproteinlerinin klevajı ile nonstrüktürel protein (NSS, NSM gibi) üretimi gösterilmiştir (21, 79, 80). Nairovirüslerin L segment genomu tospovirüs hariç diğer bunyavirüslerden yaklaşık iki kat daha uzundur (81). M segmentleri yaklaşık %30-50 daha büyüktür (83). M segmenti tarafından kodlanan poliprotein, kotranslasyonel yarımla ile PreGn ve PreGc olarak iki prekürsör moleküle ayrılır. Bunlar da posttranslasyonel işlem ile Gn ve Gc olarak iki matür glikoproteine dönüşür. Benzersiz olan bu glikoprotein üretimi sonrasında oluşan matür Gn ve Gc glikoproteinleri dikensi yapıda lipid zarf arasına girer. Etkilenen konak hücresinin şu ana kadar bilinmeyen reseptörlerine virionun tutunmasından ve nötralizan antikorların indüksiyonundan bu glikoproteinler sorumludur (6, 21, 78, 83). Son zamanlarda, KKKA virüsünün glikoprotein biyosentezi ve ekspresyon stratejisinde

prekürsör yarıma bölgelerinin belirlenmesini ve iki major klevaj ürünü olan Gn, Gc N-terminal bölgelerinin tam tanımlanmasını içeren daha detaylı çalışmalar yapılmıştır. 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 değişken bölge (Şekil 8.) içerdiğini göstermiştir (84). Yine bu çalışmada glikoprotein prekürsörlerinin proteolitik sürecinden sorumlu bir hücrel proteaz olan SKI-1/S1P subtilaz, olgun Gn'nin N-terminal işleminden sorumlu hücrel proteaz olarak tanımlanmıştır. Bu enzim şekilde görülen arginin-arginin-lösin-lösin (RRLL) ve arginin-lizin-prolin-lösin (RKPL) tetrapeptid bölgelerini tanıyıp klevaj işlemini gerçekleştirir. Gn'nin tam olarak karboksi uç (C-terminal) ve Gc işlenmesi için gereken proteaz henüz tanımlanamadı. 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. İlâveten 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 protein 38 kDa idi. Diğer negatif zincirli RNA virüslerinde gösterildiği gibi Gp 38 proteini eriyebilen bir proteindir ve virüs patogeneğinde önemli olabileceği düşünülmüştür (80-85).



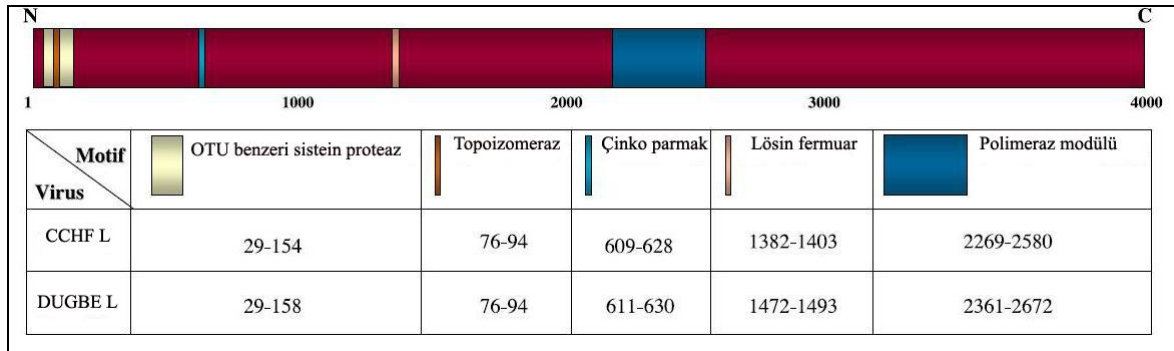
**Şekil 8.** Matin suşu glikoprotein ORF şeması (SP: sinyal peptid bölgesi) (84)

Viral glikoproteinler etkilenen hücrelerin reseptör alanlarına bağlanmasından sorumlu olduğu kabul edilir. Virüsün hücreye tutunmasını takiben endositoz ile içeri girişi olur. Bunyavirüslerde replikasyon sitoplazmada olur ve endoplazmik retikulum (ER) boyunca sitoplazmik veziküller içinde golgi membranlarından tomurcuklanarak olgunlaşır. Bu tomurcuklanma bölgesinin glikoprotein Gn ve Gc 'nin biriktiği bölgeler olduğu

gözlenmiştir. Gn glikoproteini sinyal hedeflemesi/tutulması ile golgi kompleksine lokalize olduğu, buna karşın Gc glikoproteininin endoplazmik retikulumda kaldığı ve Gn glikoproteini ko-ekspresyonu ile salınabileceği gösterilmiştir (85).

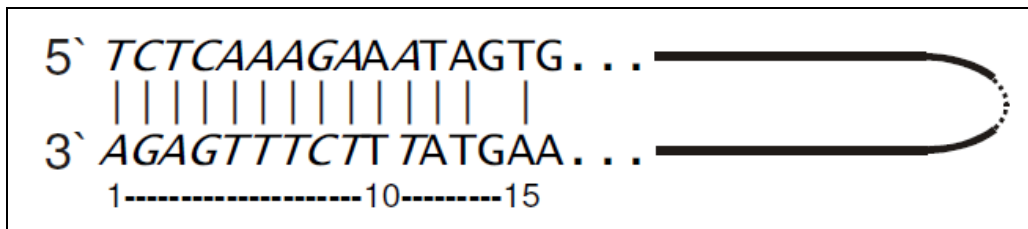
Ebola virüs glikoproteini münir benzeri domaini vasküler endotel hücre kaybı ve permabilite artışına sebep olduğu gösterilmiştir. Benzer patolojik etki KKKK virüsü glikoproteinlerinde de mevcuttur (84).

KKKK virusunun L segmentinin Dugbevirüs ile nükleotid ve amino asit miktarları %60 homoloji gösterilmiştir (86). 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 virüsü L segmentinde ve Dugbevirüs'te de gösterilmiştir (Şekil 9) (86).



Şekil 9. KKKAV ve Dugbe virüs L segment ORF'leri (86)

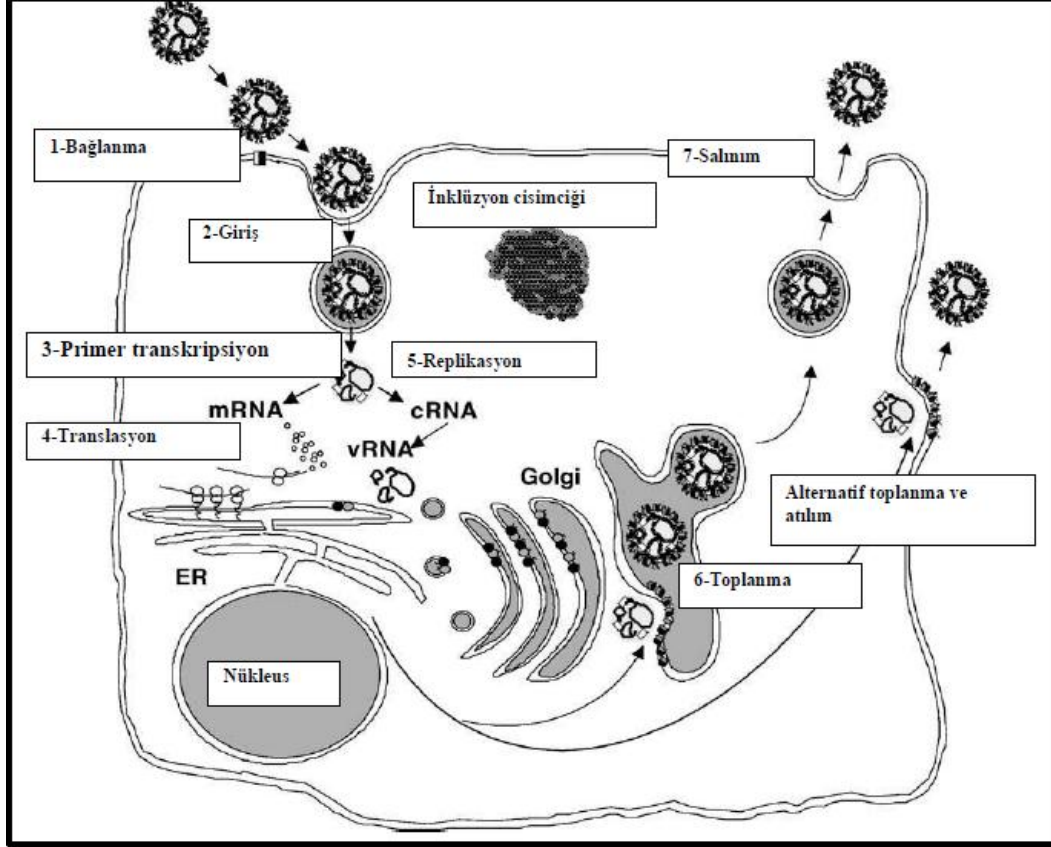
Üç RNA segmentinin her birinde, 3'AGAGUUUCU... şeklinde 3' terminalinin ilk 8-13 nükleotidi "panhandle" (tava sapı) görünümü mevcuttur, ve diğer Bunyavirüsler arasında da benzer yapıda görülmektedir. Özellikle ilk ve son 9 nükleotid segmentleri (3' ve 5' uçları) yüksek derecede birbirlerini komplementerlik gösterirler (Şekil 10). Bu bölgenin RNA polimeraz enzimi bağlanmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir (85, 87).



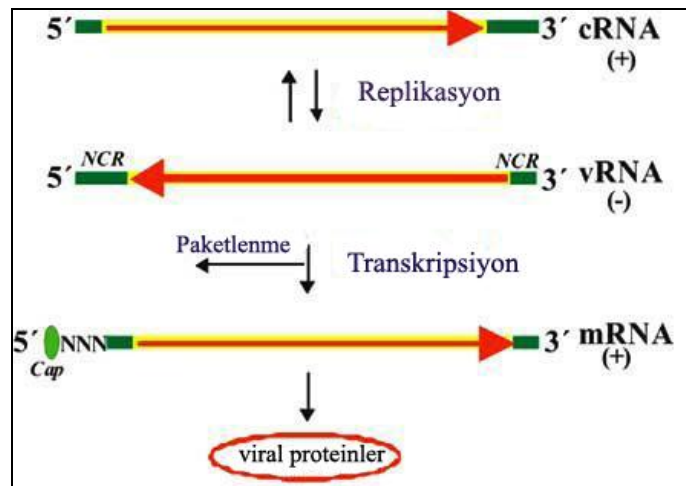
Şekil 10. Komplementer 3' ve 5' uç bölgeleri (85)

### 2.5.1. Virus Replikasyonu

Viral replikasyon birbirini izleyen 7 temel basamakta meydana gelmektedir (Şekil 11a). Bunlar kısaca şu şekilde verilebilir;



a. Virüs replikasyonu



b. Replikasyon ve transkripsiyon şematik

Şekil 11. Virüs replikasyon ve transkripsiyonu (a. Virüs replikasyonu, b. Replikasyon ve transkripsiyon şematik) (6, 21).

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 poliproteinin 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 (Şekil 11b)
6. Toplanma: Dış yapının gelişen kısımlardaki nükleoproteinlerin 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 hücrenin plazma membranından tomurcuklanarak salınım (21, 81, 88)

KKKA virüsünün ters genetik sistemi ile replikasyonu hücre ve konakçı tropizmini belirler ve bu da primatlarda sınırlı kalmasını sağlar (87).

KKKA virüsü nativ RNA segmentleri ve viral kodlanmış glikoproteinler yokluğunda, viral nükleoproteinler enfekte hücrenin perinükleer bölgesinde aktin filamentlerini hedeflemektedir. KKKA virüs nükleoproteinleri golgi membranına bağlı proteinler gibi ifade edilmezler. Deneysel aktin yıkımı virüsün bir araya gelişini büyük oranda bozmuştur (79).

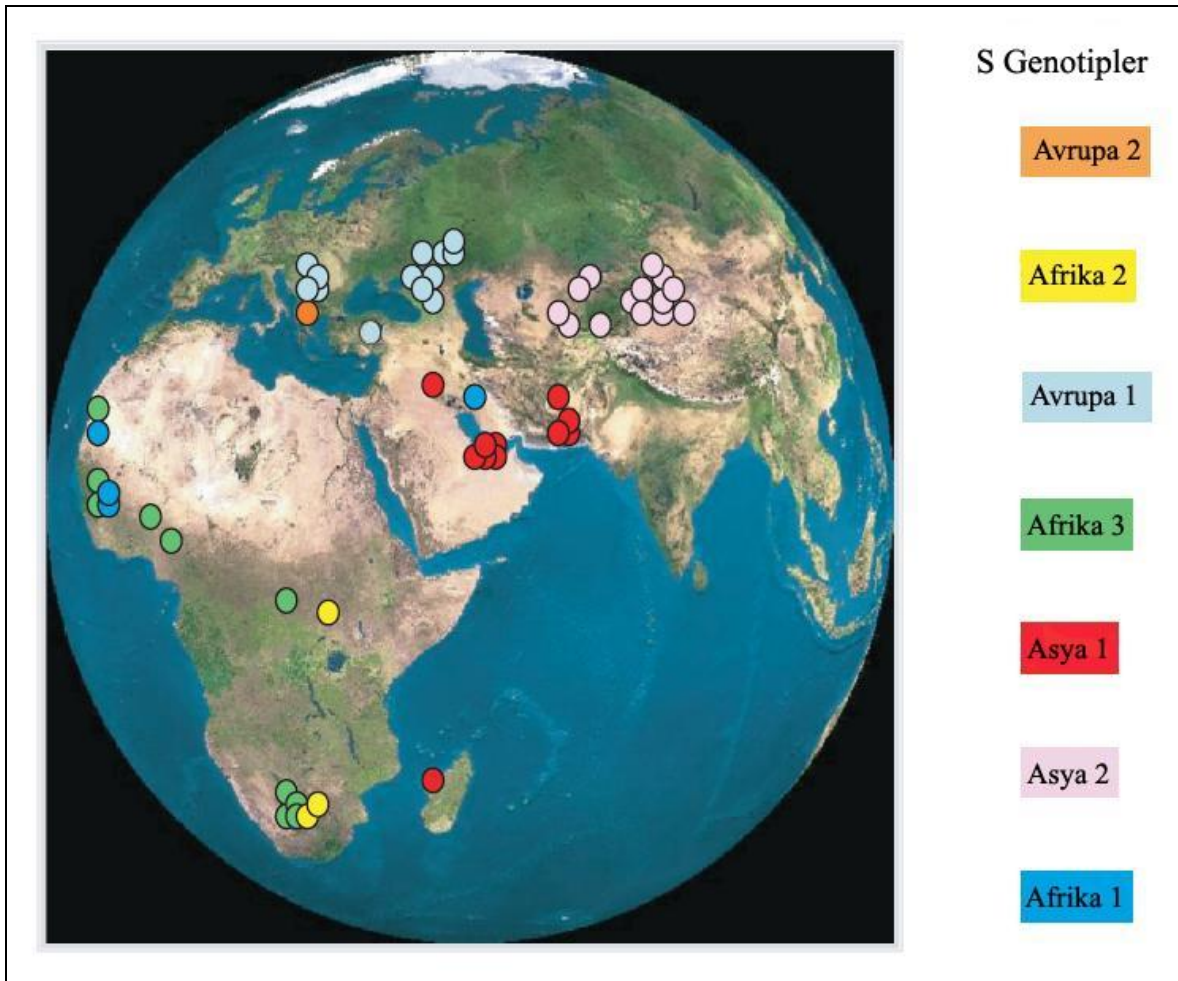
İnsan MxA proteininin nükleoproteinler ile etkileşimi hücre kültürlerinde virüs replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (89). İnterferon indükleyen MxA GTPaz aracılığı ile interferon-alfa tarafından KKKA virüsün büyümesi inhibe edilebilmiştir (90).

### **2.5.2. KKKA Virüsünün Filogenetik Grupları ve Dünya Üzerindeki Dağılımı**

Serolojik testlerle yapılan pek çok çalışma, KKHA virüsü türleri içinde çok az değişiklik olduğunu ortaya koymuştur. Nükleik asit sekans analizine dayanan çalışmalar, genetik farklılıklar ortaya koymuştur (Şekil 12) (6, 91).

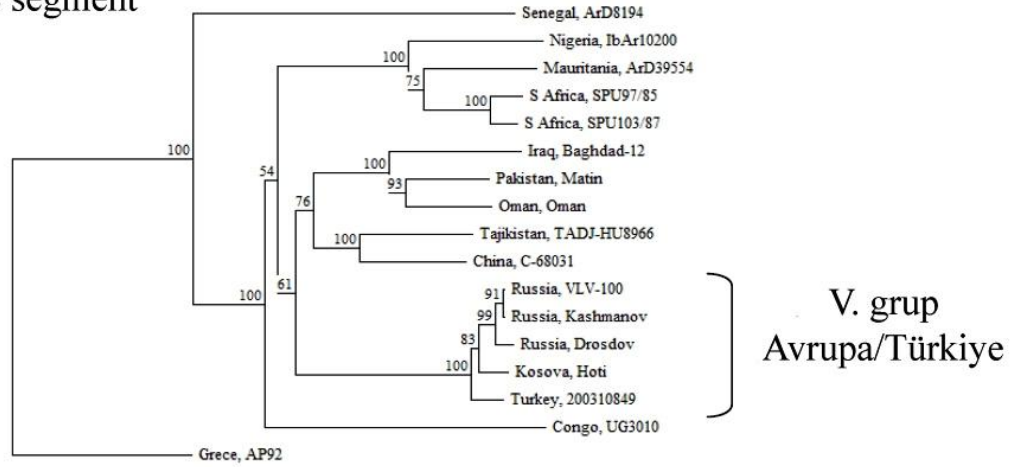


Wölfel ve arkadaşlarının S segment analizlerine göre, Türkiye’de bulunan suş, Avrupa/Türkiye grubu olan 5. grupta yer almaktadır (92). Morikawa ve arkadaşları M segment analizlerine göre 6 farklı filogenetik grup göstermiştir (73). Türkiye’de bulunan suş, Rusya ve Kosova’da bulunan suşlar ile aynı M4 grubunda yer almıştır. Duh ve arkadaşları S, M ve L segment analizlerinde V.grup olarak Avrupa/Türkiye suşunu göstermişlerdir. Rusya, Kosova ve Türkiye suşları (Şekil 13) arasında oldukça yüksek düzeyde benzerlik bulunmuştur (93).

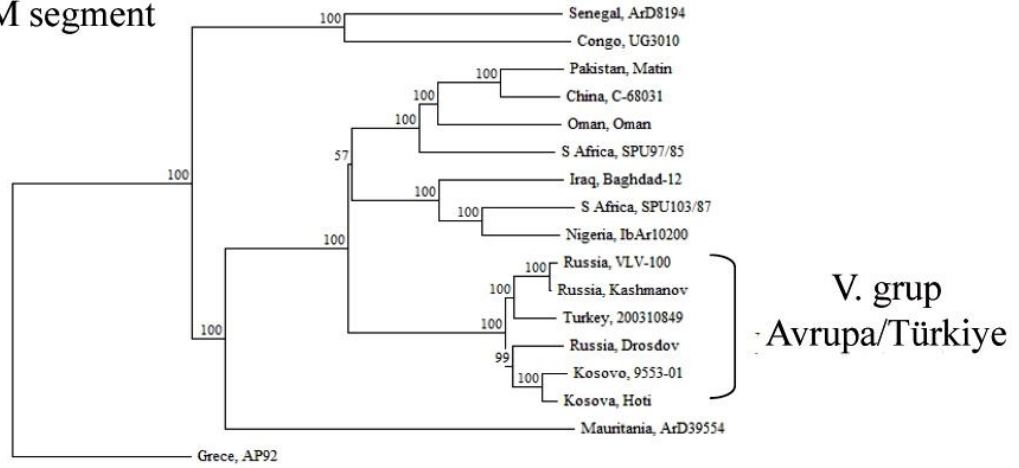


Şekil 12: RNA S segmentine göre filogenetik grupların dünya üzerindeki dağılımı (74)

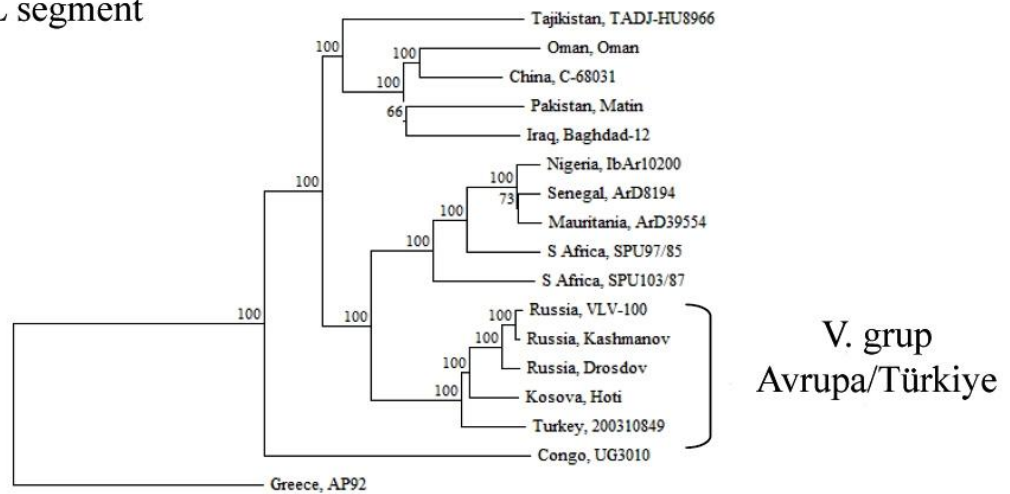
## S segment



## M segment



## L segment



Şekil 13. S, M ve L segmentlerine göre filogenetik dallanma (93)

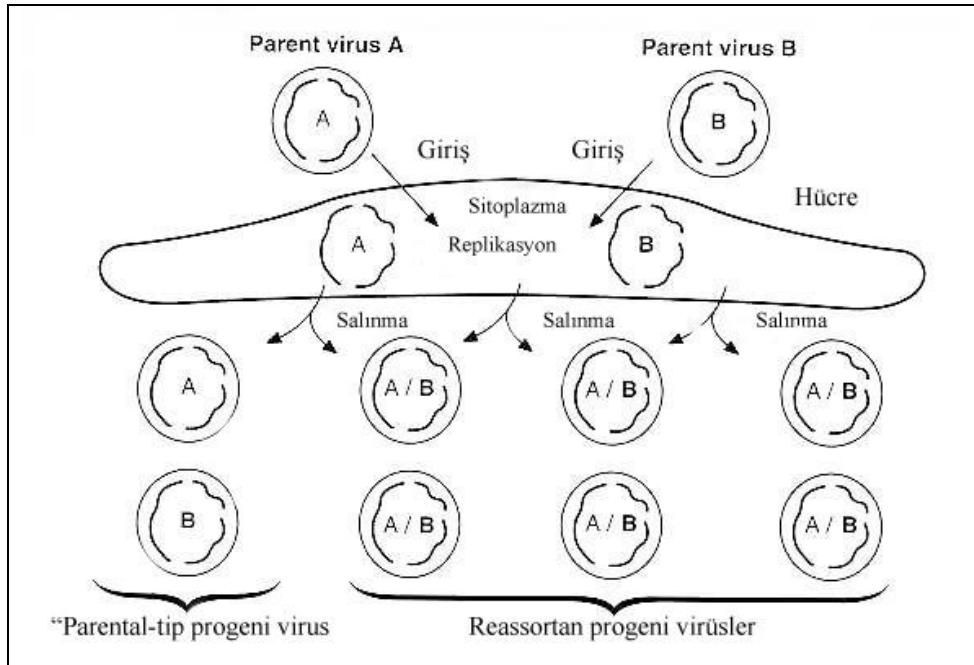


### 2.5.3. Genetik Rekombinasyon ve Reassortmant

Filogenetik analizlerde gözlenen çeşitlilik ve yapılan diğer genetik çalışmalar rekombinasyon ve reassortmantın olabileceğini göstermektedir (94, 95).

Eşzamanlı olarak iki farklı fakat yakınca ilişkili bunyavirusun aynı hücreyi enfekte etmeleri halinde (Şekil 13), sitoplazmada farklı kombinasyonlarda paketlenmeleri, sekiz farklı progenivirus meydana gelmesi, bunlardan ikisinin parental virus ile benzer altısının reasortan, genetik olarak farklı yapıda progenivirus olduğu görülmektedir (94, 96).

Coğrafi olarak uzak bölgeler arası KKKA virüsleri kenelerle enfeste kuşlarla taşınabilir ve çoğunlukla M segment RNA olmak üzere reassortmant gerçekleşebilir. Filogenetik analizler bunun sık sık gerçekleştiğini göstermiştir (73, 77, 91, 94, 96).



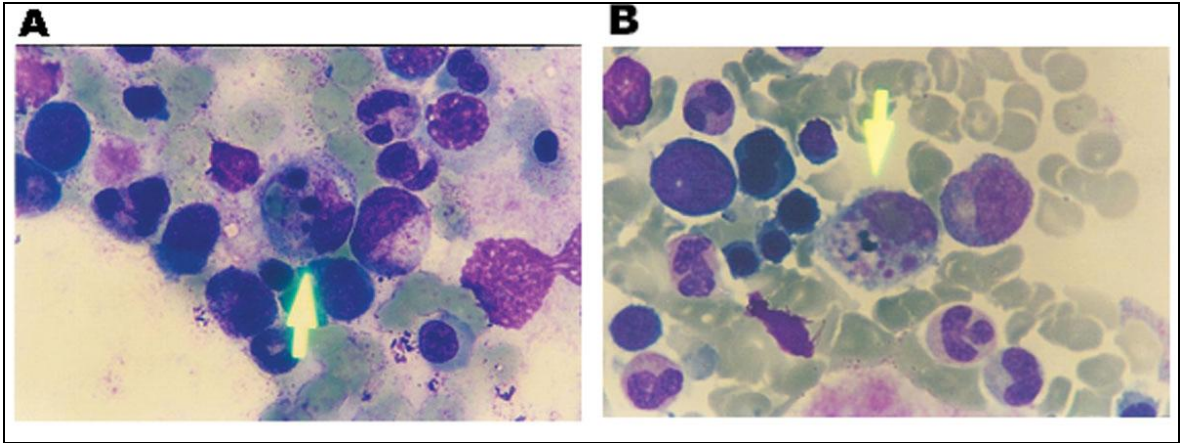
Şekil 14. Reassortmant (77)

### 2.6. PATOGENEZ

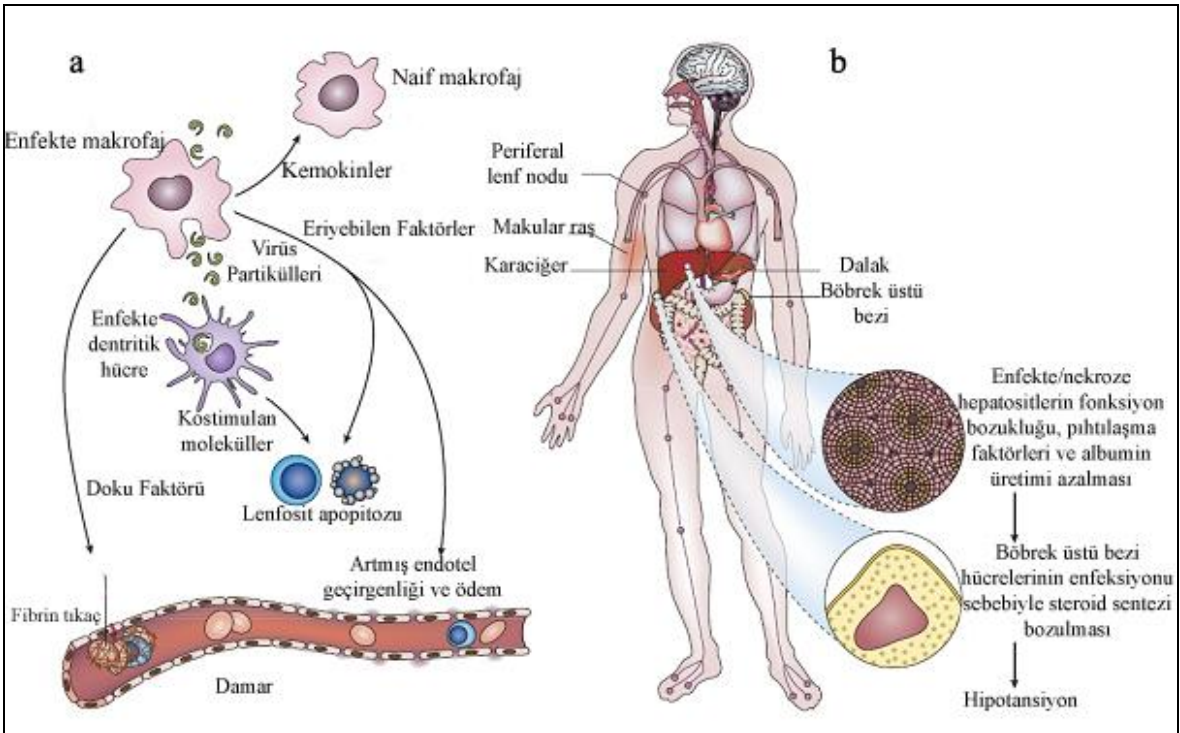
İmmunohistokimyasal ve insitu hibridizasyon yöntemleri ile analizler neticesinde mononükleer fagosit, endotel hücreleri, hepatositler ve dalağın viral enfeksiyonun ana hedefi olduğu ve direk viral sitopatik etki ile hücre hasarı sonucu karaciğer parankimal nekrozu oluşturduğu görülmüştür (97).

Sami Kartı ve Atahan Çağatay arkadaşlarının ayrı ayrı yaptıkları çalışmada KKKA hastalığında hemofagositozu göstermişlerdir (Şekil 15) (50, 98). Bu hastalarda hemofagositoz mekanizmasında sitokinlerin önemli bir rolü olduğu ve mekanizmanın daha

iyi anlaşılabilmesi için fazlaca sitokin çalışmalarına ihtiyaç olduğuna işaret edilmiştir (98). Çok yüksek seviyedeki gama interferon, tümör nekrozu faktörü (TNF), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) gibi yardımcı T hücreleri tip-1 (Th1) sitokinlerinin hemofagositik lenfositosisin immunopatolojik mekanizmasında rolü olduğu bildirilmiştir. Hemafagositoz viral, bakteriyel, fungal, parazitik ve kollajen damar hastalıklarında da gösterilmiştir (98). Viral hastalıklardan Hantaan, Pumala ve Dengue virus gibi birçok hemorajik virus enfeksiyonlarında da hemofagositoz gösterilmiştir (Şekil 15) ( 11, 50, 98).



Şekil 15. A-Fagosite edilmiş eritrosit, B- Makrofaj tarafından fagosite edilmiş trombosit (50)



Şekil 16. Viral hemorajik ateş hastalıklarında patogenez (99)

Şekil-16'ya göre;

a- Virüs enfeksiyon giriş bölgesinden bölgesel lenf nodlarına, karaciğer ve dalağa yayılır. Bu bölgelerde virüs doku makrofajlarını (kupfer hücreleri de dahil) ve dendritik hücreleri enfekte eder. Virüs ile enfekte olan makrofajlardan ve monositlerden, lokal ve sistemik etkileri olan eriyebilen faktörler salınır. Virüs ile enfekte hücrelerden salınan bu kemokinler makrofajların enfeksiyon bölgesine toplanması sağlar. Virüs böylelikle enfekte edeceği makrofajların bölgede sayısını artırmış olur. Bu hemorajik ateş virüslerin hiçbiri lenfositleri enfekte etmemesine rağmen, lenfositlerin apoptoz ile hızla kaybı hastalığın göze çarpan önemli bir özelliğidir. Lenfositlerin yıkımında viral proteinlerin doğrudan etkisi dikkate değer değildir. Virüsle enfekte monosit ve makrofajlardan salınan eriyen faktörler ve muhtemelen virüsle enfekte dendritik hücrelerin içerdiği faktörlerin bir kombinasyonu sonucu belirgin lenfosit kaybı olur. Kostimulan uyarıcı moleküllerin artması ile oluşan karışıklık dendritik hücrelerin fonksiyonunu ve antijen sunumunu bozar. İlaveten enfekte monosit ve makrofajlardan salınan eriyebilen faktörler lenfositlerin delesyonuna yol açar, proapoptotik proteinlerin artışını dolaylı yoldan sağlar. Koagülasyon anormallikleri virüsün doğasına ve büyüklüğüne göre değişir. Örneğin Ebola virüsü doku faktörlerinin aşırı ekspresyonunu artırır ki bu pıhtılaşma yollarının aktivasyonu ile sonuçlanan ve damarlarda fibrin oluşumu ile sonuçlanan doku faktörlerinin aşırı üretimi artırır. Tersine Lassa ateşinde koagülasyon bozuklukları daha az belirgindir. Endotelial fonksiyon bozuklukları ödeme katkı sağlar ki, bu diğer hemorajik ateş virüslerinden daha göze çarpan bir bulgudur.

b- Tüm viral hemorajik ateş virüsleri arasında yaygın hemodinamik ve koagülasyon bozuklukları hepatositlerin ve adrenokortikal hücrelerin enfeksiyonu ile şiddetlenir. Hepatositlerin enfeksiyonu önemli pıhtılaşma faktörlerinin sentezini bozar. Aynı zamanda hepatositlerde albumin sentezinin azalması plazma ozmotik basıncını azaltır, ödeme katkı sağlar. Enfekte kortikal hücrelerdeki steroid sentez ve sekresyonunun bozulması hipotansiyona, sodyum azalmasına ve hipovolemiye yol açar. Viral hemorajik ateşlerde sıklıkla maküler raşlar görülür (99).

Hemorajik ateşlerde ya azalmış trombosit üretimi ya da artmış trombosit tüketimi trombositopeniye sebep olabilir. KKK hastalığında DIC, endotel disfonksiyonu, hepatosit disfonksiyonu, koagülasyon faktörleri azalması, trombositopeni mevcut iken trombosit disfonksiyonu gösterilememiştir. Kemik iliği incelemesinde megakaryosit azalması ve kemik iliği hipoplazisi gözlenmiştir (100).

### 2.6.1. İnterferon Sentezi ve KKKA Virüsünün İmmun Sistemden Kaçışı

KKKA virüsü interferon (IFN) duyarlı virüs listesine yakın zamanda eklenmiştir. Bu konudaki çalışmalar sayıca azdır. Bunyavirüslerin diğer üyelerinde de gözlemlendiği şekilde, virüse karşı IFN'un antiviral aktivitesine MxA önemli katkı sağlar. MxA enfekte hücrelerin perinükleer bölgelerinde virüsün nükleokapsid proteini ile etkileştiği ve kolokelize olduğu bulunmuştur. Bu muhtemelen virüsün replikasyonunu inhibe etmekten sorumlu bir etkileşimdir (90). Diğer bunyavirüslerde de bu etkileşim mevcuttur. MxA virüse karşı IFN aktivasyonunu artırıcı tek bir ajan değildir, birçok Interferon Stimulated Gene (ISG), Interferon Inducible Gene (IP-10) ve dsRNA bağımlı kinaz olan RNA-activated protein kinase (PKR) 'ın da katkıları vardır (101-104).

Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1) ve melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA-5), RNA helikaz aktivitesine sahiptir ve virüsün overlapping olmayan farklı yerlerini tanır. İnterferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3), IFN- $\beta$  promoter aktivasyonunda merkezi rol oynar. RIG-1 trifosfat gruplarına, 5' uçta keplenmemiş tek zincirli RNA (ssRNA) ve kısa çift zincirli (dsRNA) moleküllere de bağlanma yeteneği vardır. RIG-1 ve MDA-5 viral RNA ya bağlandıktan sonra IRF-3 fosforile olur. Fosforile olan IRF-3 homodimerleri nükleusa taşınır ve IFN- $\beta$  mRNA sentezini başlatır. Bu birinci dalga ile artan interferon IRF-7 ekspresyonunu tetikler. IRF-7 fibroblastlarda düşük bir miktarda hazır olarak vardır. IRF-7 aktivasyonu ve ekspresyonu pozitif feed-back halkasına liderlik eder ki bu bazı IFN- $\alpha$  subtiplerinin sentezini başlatır, buda ikinci IFN dalgasıdır (101-104).

KKKA virüsü IFN sentezine karşı koyar. Birinci olarak diğer negatif zincirli RNA virüslerine benzer şekilde önemli miktarda ve dsRNA gibi fazla sinyal üretmez. İkinci olarak RIG-1 sinyal yolağını 5' trifosfat taşıyan ssRNA virüsleri gibi KKKA virüsü aktive etmez. KKKA virüsü RIG-1 için etkisiz olan 5' monofosfat içerir. Son olarak KKKA virüsü RIG-1 ile tanınmaktan kaçış için genom replikasyonu süresince 5' trifosfat gruplarını da ayrı tutar (101-104).

### 2.7. TEŞHİS

Hastalığın hızlı seyri ve nazokomiyal enfeksiyonlara sebep olabilmesinden dolayı erken tanısı önemlidir. Hastanın öyküsü, endemik bölgede bulunma/endemik bölgeye seyahat, kene ısırığı öyküsü, hasta insanlar veya hayvanların kan veya dokuları ile temas ve klinik semptomlar KKKA hastalığının göstergeleridir (2, 4, 6, 105).

**Tablo 6:** Ülkemizde bildirilen KKKA olgularının belirti ve bulguları (10)

-Bulantı-kusma %80
-Miyalji %70
-Ateş %75
-Baş ağrısı %75
-Kanamalar %48
Epistaksis %40
Hematemez %26
Hematüri %16
Melena %14
Hemoptizi %8
-Konjontivada kızarıklık %42
-Makülopapüler döküntü %35
-Hepatomegali %35
-İshal %34
-Uyku hali %20
-Sarılık %10
-Splenomegali %10
-Lenfadenopati %15

Ayırıcı tanı listesi coğrafi bölgeye göre değişmekle birlikte bakteriler, viruslar ve enfeksiyon dışı etkenleri kapsar (Tablo 6). Sınırlı sayıda difüz alveoler hemoraji vakasına rağmen, pulmoner tutulum, ensefalit benzeri klinik tablolar ön planda değildir (106). Ayrıca, ateş ve hastalık gelişimi akut seyirli olduğundan öyküsü 2-3 haftayı bulan hastalarda tanıdan uzaklaşılır. Örnek olarak, KKKA, nedeni bilinmeyen ateşlerin klasik tanımında yer almaz (10).

Hemofagositoz gözlenen vakalarda kene teması olmamasına rağmen, kanama bulguları olup (burun-dişeti kanaması, aşırı vaginal/menstrüal kanama), hematolojik parametrelerinde düşme (platelet, beyaz küre), biyokimyasal parametrelerde yükselme (özellikle ALT, AST, LDH) gözlenmiştir. Yapılan kemik iliği aspirasyonunda hemofagositoz görülmesi KKKA hastalığını da akla getirmiş ve yapılan serolojik ve moleküler analizler ile KKKA pozitif bulunmuştur. Bununla birlikte bu tür vakalarda kemik iliğinde hemofagositoz görülmesi durumunda hematologların mutlaka ayırıcı tanıda KKKA hastalığını da akıllarında çıkarmamaları gerekmektedir ve hemofagositoz bu klinik semptomları gösteren hastalarda bir indikatör olabilmektedir (11, 50, 98).

**Tablo 7:** KKKA Hastalığı ile Karışan Hastalıklar ve Ayırıcı Tanı (10)

<b><u>Enfeksiyonlar</u></b>	<b><u>Ayırıcı tanı</u></b>
Brucella	pansitopeni, Wright aglütinasyonu
Q ateşi	seroloji (ELISA ve ya IFAT*)
Riketsiya	Weil-Felix testi
Erlhiyoz	seroloji (ELISA)
Hanta	pulmoner ve ya renal tutulum, seroloji, PCR
Diğer kanamalı ateşler	
Ebola	coğrafi bölge
Marburg	coğrafi bölge
Leptospira	aglütinasyon
Salmonella	Widal testi
<b><u>Enfeksiyon dışı nedenler</u></b>	
Vitamin B12 eksikliği	pansitopeni ve serum B12 düzeyi
Febril nötropeni	altta yatan hastalık
İlaç yan etkileri	
Metamizole	öykü

\*IFAT: immun floresan antikor testi

## 2.8. KLİNİK

Şekil-17’de KKKA enfeksiyonunun klinik gidişi dört ana bölümde görülmektedir. Bunlar: inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelasan dönemdir (1, 2, 6, 10).

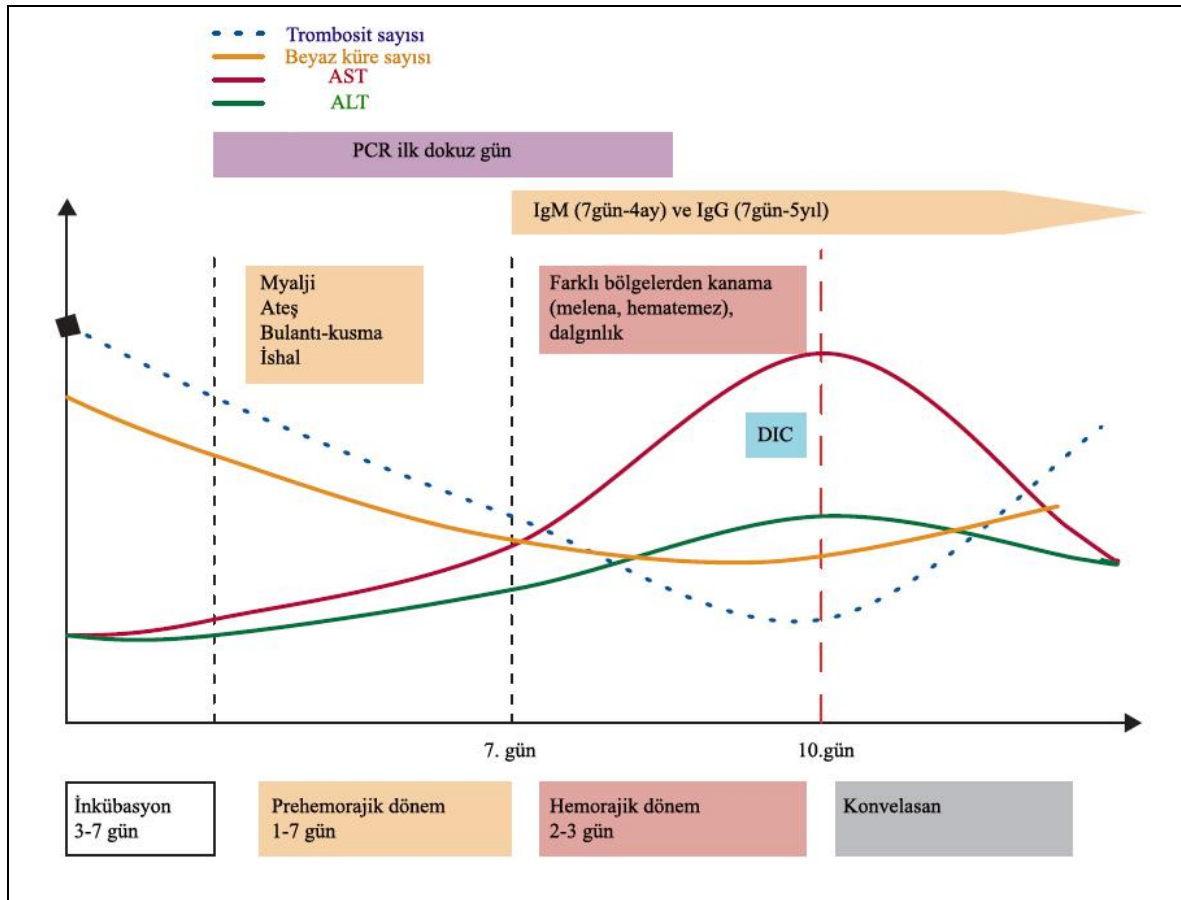
Çoğu hastada kene ısırma öyküsü vardır. Kenenin ısırması ile hastalık gelişmesi arasındaki inkübasyon dönemi süresi ortalama 3-7 gün sürer. İnkübasyon süresi enfeksiyonun giriş yolu (örneğin kan yolu ile geçişlerde daha kısadır) ve viral yüke bağlı olarak değişebilir (10).

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. (2, 6, 10).

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 ve hastanede yattıkları sırada 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 (2, 107, 108). Hastaların 1/3 ünde karaciğer ve dalak büyüklüğü bildirilmiştir (2).

Hastalığın görülmesinden 10-20 gün sonra konvelasan dönem başlar. Türkiye'deki hiçbir hastada görülmemesine rağmen nabız değişiklikleri, çarpıntı, polinörit, saç dökülmesi, solunum güçlüğü, zayıf görme, kserostomi, işitme ve hafıza kaybı bildirilmiştir (1, 10, 107). Güney Afrika'da da hepatorenal yetmezlikli hasta raporlanmıştır. Relaps hastalığa özgün değildir (10, 109).



Şekil 17: KKKA hastalığının klinik ve laboratuvar seyri (2)

## 2.9. LABORATUVAR TANI METODLARI

Laboratuvar tanı metodları Tablo-8'de doğrudan ve dolaylı yöntemler olarak iki ana başlık halinde özetlenmiştir. İlâveten bilinmeyen bir ajanın tanımlanması için elektron mikroskobu ile direk görüntüleme kullanılabilir (109, 110).

**Tablo 8:** Laboratuvar Tanı Metodları

<p>A- Doğrudan (Direk) Yöntemler:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1-Viral İzolasyon</li> <li>2- Antijen Aranması</li> <li>3-Moleküler Yöntemler</li> </ol> <p>B- Dolaylı (indirek) Yöntemler:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- İndirek Serolojik Yöntemler</li> <li>2- İndirek İmmunfloresan Yöntemi</li> <li>3- Revers Pasif Hemaglutinasyon Yöntemi</li> <li>4- Nötralizasyon Yöntemi</li> </ol>
--

### 2.9.1. Viral İzolasyon

Arboviruslerin izolasyonunda da sıklıkla kullanılan, emen farelere intrakraniyal inokulasyon yöntemi KKA virüsü izolasyonunda kullanılmıştır. İnokulasyon sonrası virüs ile hastalanan fareler 4-6 günde ölürlür (111). Virüsün 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 (17, 50, 112, 113).

KKA virüsü hücre kültüründe genellikle fark edilebilir bir sitopatik etki göstermemiştir. Virüsün nükleokapsid proteinlerine karşı monoklonal antikor veya KKA spesifik Mouse Hiperimmün Asidic Flui (MHIAF) kullanımıyla 2-6 günde indirek immunfloresan (IFA) yöntemi ile viral replikasyon tespit edilebilir (114-116).

### 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 (116-118). ELISA için KKA Afrika ve Çin suşlarının N'ine karşı elde edilmiş monoklonal antikorlar kullanılmıştır (116, 118, 119).

ELISA yöntemi ile antijen aranmasının SW-13 hücre kültürü veya RPHA yöntemine göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (118).

### 2.9.3. Moleküler Yöntemler

Enfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır. Mikroorganizma ve klinik materyalden nükleik asitin izole edilmesi gerekir ve sınırlayıcı



endonükleaz enziminin, jel elektroforez ve nükleik asit hibridizasyon tekniklerinin kullanımına dayanır. Giderek artan sayıda yeni nükleik asit amplifikasyon tekniği klinik materyallere uygulanmaktadır (120, 121).

PCR birkaç saat içerisinde bir klinik örnekten viral ajanın varlığını ve kantifikasyonuna imkan veren bir metoddur. KKKAV genomu hastalığın başlamasından ilk birkaç günden itibaren klinik örneklerden tespit edilebilir (17, 113, 120).

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 (122).

Tanı amaçlı konsensus nukleotid dizileri S segmentinde nükleoproteinleri kodlayan bölgelerdir, bu segmentin sekans analizleri filogenetik çalışmalara da esas teşkil etmiştir (17, 93,120).

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 (17,123).

#### **2.9.4. İndirek Serolojik Yöntemler**

KKKAV enfeksiyonunun serolojik tanısı, nükleoprotein antijenine karşı immün cevap olarak üretilen spesifik IgM ve IgG antikorlarının tespiti esasına dayanır (2, 6, 116, 119).

KKKAV spesifik IgM antikorlarının serokonversiyonu veya ardışık iki kan örneğindeki antikor titresinin 4 kat artışı akut enfeksiyon delilidir (2, 6, 117). Hastalığın bulaşından sonraki birkaç günde serolojik tanı konabilir (2, 6). Azalan sensitivitelere göre antikor tespiti için geliştirilen metodlar şöyle sıralanmıştır; ELISA, RPHA inhibisyonu, IFA, Floresans Fokus Redüksiyon, Kompleman Fiksasyon, İmmündefüzyon (124).

Coğrafik orjinleri farklı serotipler arasında floresans fokus nötralizasyon yöntemiyle büyük oranda antijenik homojenite gösterilmiştir (124).

### **2.9.4.1. ELISA**

ELISA yöntemi KKKAV aranması için kullanılan en yaygın tekniktir ve IFA'dan daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (16, 125). Antijen kaynağı olarak genelde enfekte emen fare beyninin çeşitli işlemlerle inaktive edilmiş süspansiyonu kullanılmaktadır (15, 111). Rekombinant N deriveleri de antijen kaynağı olarak kullanılmıştır (115, 126).

IgM için spesifik antikor ile kaplı pleytlerde immün yakalama yöntemiyle metod uygulanmıştır (15, 115).

Rekombinant nükleoprotein (rNP) bazlı yöntemler ile IgG ve IgM yakalama ELISA yöntemi geliştirilmiş ve başarı ile uygulanabilmektedir (127)

KKKAV IgM ve IgG antikorları genellikle semptomların görülmesinden sonraki 4-5. günlerde tespit edilir (2, 6, 16, 112, 128). Ig M titreleri hastalığın 2-3 hafta sonrasında en üst düzeydedir ve genellikle 4 ay içerisinde yok olurlar. Ig G antikorları birkaç yıl serumda kalıcı olabilir (2, 6, 112, 128).

### **2.9.5. İndirek İmmün Floresan Yöntemi**

Hastalığın hızlı serolojik tanısını yapmak için IFA uygun bir yöntemdir (16,129). BSL-4 laboratuvarında KKKAV ile enfekte hücrelerden hazırlanmış slaytlar ile hasta serum örnekleri muamele edilip floresan izo tiyo siyanad (FİTCH) kullanılarak antikorların tespiti sağlanabilir (130). Son zamanlarda rekombinant nükleoprotein derivelerinin üretimiyle, BSL-4 laboratuvarında üretilen enfekte hücre kullanım zorunluluğu ortadan kalkmıştır (124).

IgM varlığını gösteren floresan hastalığın en erken dördüncü gününde tespit edilebilir (16).

### **2.9.6. Revers Pasif Hemaglütinasyon İnhibisyonu**

RPHA inhibisyonu enfekte emen fare beyninden elde edilen antijenlerin koyun eritrositlerine gluteraldehit ile fiksasyonu yapıp KKKAV'ne duyarlı antikor kullanılarak gerçekleştirilmiştir (128-131).

### **2.9.7. Nötralizasyon yöntemi**

Nairovirüsler genellikle bunyavirüs ailesinin diğer üyelerinin yaptığından daha zayıf antikor cevabına neden olur, bu nedenle genellikle KKKA tanısında nötralizasyon yöntemi kullanılmamıştır (124, 131).

## 2.10. TEDAVİ

KKKA hastalığında destek tedavisi temel tedavidir. Sıvı ve elektrolitler hemodinamik açıdan sıkı takip edilmelidir. Vazopresörler ve gereğinde verilebilir. İhtiyaç halinde sedasyon ve analjezi yapılabilir. Ciddi hastaların solunum desteği ve mekanik ventilatör gereğinden yoğununda bakımda izlenmesi tavsiye edilir. Hematolojik parametreler sıkı takip edilip yerine koyma tedavisi yapılmalıdır. Trombositlerin fonksiyonunu bozabilecek veya toksik olabilecek aspirin, nonsteroid antiinflamatuvarlar ve antikoagülanlar kontrendikedir. İntramüsküler enjeksiyonlardan kaçınılmalıdır. Steroid tedavisi halen kontrendikedir (2, 6, 42, 132).

### 2.10.1. Sıvı Tedavisi

Damar endotel hasarı sıvı kaybına yol açtığından sıvı replasmanı gereklidir. Kristaloidler, vazopresörler ve kardiyotonik ilaçlar (dopamin, dobutamin, norepinefrin) kullanılabilir. Böbrek yetmezliği geliştiğinde periton diyalizi veya hemodiyaliz uygulanabilir (2, 10, 132)

### 2.10.2. Antiviral ilaçlar

Ribavirin (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-karboxamid) ve analoglarının bazı viral kanamalı ateşlerde faydalı olduğu gösterilmiştir. Ribamidinin ribavirinden yaklaşık 8 kat daha az etkili olduğu bulunmuştur. Ribavirin bir guanozin nükleotid analogudur. KKKA virüsüne ribavirinin invitro etkisi gösterilmiştir (42, 132, 133). Ribavirinin kanamalar başladıktan sonra etkili olmadığı hastalığın ilk evrelerinde etkili olduğu ve umut verici bir tedavi olabileceği bildirilmiştir. İlavenen intravenöz ribavirin tedavisinin ağır KKKA hastalığı tedavisinde hayatta kalma oranında faydalı olmadığı gösterilmiştir (134).

Hemolitik anemi, döküntü, kaşıntı, öksürük, uyku bozukluğu ve depresyon ribavirinin yan etkileridir. Gebelerde kullanımı kontrendikedir. Embriyotoksik ve teratojenik etkileri bulunmuştur ancak gerekli görüldüğünde erişkin dozu verilebilir (2, 42, 112, 132, 133).

### 2.10.3. İnterferon

İnterferonun invitro hayvan modeli çalışmalarında birçok viral kanamalı ateşi hastalığına karşın etkin olduğu gösterilse de KKKA virüsüne karşı bir etkinliği henüz gösterilememiştir (132).

Henüz klinik faydası olmasa da interferon indükleyen bir GTPaz olan MxA aracılığı ile IFN-alfa tarafından virüs replikasyonunun engellenebildiği bildirilmiştir (90).

#### **2.10.4. Kan ürünleri ve DIC tedavisi**

Trombosit süspansiyonu, kanamalı hastalarda trombosit sayısı 50.000 / $\mu$ L altında ise ve kanaması olmayan hastalarda trombosit sayısı 10.000 / $\mu$ L altında ise uygulanmalıdır. Fibrinojen düzeyi 100 mg/dl altına düştüğünde veya international normalized ratio (INR) düzeyinin normalden 1,5 kat artışında (1,6'nın üzeri) taze donmuş plazma verilmelidir (10, 132)

#### **2.10.5. Konvelesan plazma tedavisi**

Lassa ateşi ve Arjantin kanamalı ateşinde başarılı bulunan konvelesan plazma tedavisi Ebola kanamalı ateşinde de denenmiş ancak başarısızlıkla sonuçlanmıştır. KKKA hastalığında konvelesan plazma tedavisinin yararlı olduğu gösterilmiştir (10, 21, 132)

#### **2.10.6. Koagülasyon modülatörleri**

Aktive protein C kullanımının Ebola ile enfekte maymunlarda faydalı olabileceği gösterilmiştir. KKKA hastalığı için yeterli bilgi yoktur (10).

#### **2.10.7. İmmünomodülatörler**

Kortikosteroid, antiTNF-alfa, nitrik oksit inhibitörleri gibi immünomodülatörler denenmiş olmasına rağmen etkinlikleri tam olarak gösterilememiştir (10, 135) .

### **2.11. KORUNMA ve KONTROL**

KKKA hastalığını bulaştıran vektör kenelerden ve bunların yoğun yaşadığı kırsal alanlardan uzak durmak en önemli tedbirdir. Kene kovucu repellentler; N,N-dietil-metatoluamid (DEET) ve permetrin kullanılabilir (6, 18, 21).

Kan içermediği sürece tükürük, dışkı, nazal sekresyonlar, balgam, ter, idrar ve kusmuk için önlem almaya gerek yoktur denilmektedir. Ancak yine de kan ve vücut sıvılarının temasından kaçınılmalıdır. Hastane personelinin korunmasında hasta ve hasta sekresyonları ile teması esnasında universal önlemleri (önlük, eldiven, maske, gözlük vs) alınmalıdır (6, 18, 21, 136).

KKKA tanılı bir hasta kabul edildiğinde; hasta izole edilmeli, personele gerekli eğitim verilmeli, personel koruyucu ekipman giymeli, bulaş olmuş yerler ve hastaya kullanılan malzemeler 1:10-1:100 klorlu dezenfektanlar ile temizlenmelidir (18, 136)

Fare beyninden izole edilen virüsün formalin inaktivasyonu ile aşı yapılarak yıllar önce Rusya ve Bulgaristan'da kullanılmıştır. Yüksek miktarda antikor cevabı oluşturduğu ancak efektif kullanımı olmadığı bildirilmiştir (6, 21).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. HASTA POPULASYONU SEÇİMİ VE ÖRNEKLERİN ALINMASI

Çalışmaya başlamadan önce fakültemiz etik kurulunun 27/03/2007 tarih ve 38 nolu kararı ile onayı alınarak, hasta veya yakınlarına çalışmanın amacı ve yapılacak işlemler anlatılıp, yazılı izinleri alındı. Bu çalışmaya Nisan 2007 – Ağustos 2008 ayları arasındaki, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezine ve Tokat ili sağlık kuruluşlarına başvuran, Sağlık bakanlığı tarafından da tarif edildiği şekilde, şüpheli-olası Kırım Kongo Hemorajik Ateşi Hastalığı vakalarının serum örnekleri dahil edildi (136).

Türkiye’de ilk KKKA olgularının 2003 yılında tanımlanmasından sonra Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı KKKA çalışma grubu tarafından KKKA olgu tanımlama kriteri oluşturulmuştu. Buna göre aşağıdaki iki kritere sahip olan hastalar şüpheli KKKA olgusu olarak değerlendirilip çalışmaya alındılar (136).

1. KKKA için epidemiyolojik risk faktörü hikayesi olan hastalar:

a) Kene teması (Kene ile ısırılma, kene kırma öyküsü) ve/veya

b) KKKA için epidemik olan bölgeye seyahat veya o bölgede yaşama öyküsü

2. Viral Kanamalı Ateşi düşündüren akut hastalık tablosu

a) Ateş (aksiller  $>38^{\circ}\text{C}$ ) ve trombositopeni (kan trombosit sayısı  $< 150 \times 10^9$  hücre/Litre) ve/veya

b) Hemorajik manifestasyonlar (ekimoz, purpura, peteşi, gastrointestinal kanamalar, epistaksis, kan alınan vücut bölgelerinden kanamalar veya kadınlarda adet dışı vajinal kanamalar)

Her bir hastadan PCR, ELISA ve biyokimyasal testler için etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) içermeyen jelli tüplere 10 ml venöz kan örneği alındı. İlaveten hematolojik parametreler için de 2.5 ml kan örneği EDTA’lı tüplere alındı. Bu amaçla jelli tüplere alınan kan örneklerinden Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünü belirlemek amacı ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonunu takiben Reverse Transkriptase basamağı ile RNA, cDNA’ya dönüştürüldü ve sonrasında PCR gerçekleştirildi. EDTA’lı tüplerdeki kan örnekleri hemogram cihazlarında analiz edildi. PCR, ELISA ve biyokimyasal testler için ayrılan hasta serumları paylaştırılarak kullanıldı.

Eşzamanlı olarak 64 vakanın, aynı serum örnekleri ulusal referans laboratuvarı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi'nde, immun capture IgM ELISA yöntemi ile ayrıca analiz edildi.

Hastaların gerek Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerekse de ilimiz sağlık kuruluşlarında yattığı sürece test edilen hematolojik ve biyokimyasal parametreler de kayıt altına alındı. Bu konu hakkında İl Sağlık Müdürlüğü ile gerekli yazışmalar yapılarak izinler alındı.

### **3.2. ÖRNEKLERİN HAZIRLANIŞI**

Hastalardan jelli-düz tüplere alınan 10 ml venöz kan ortalama 30 dakika +4°C de bekletildi ve sonra santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Biyokimyasal testleri yapıldı ve ELISA için vida kapaklı polipropilen tüplere serumlar ayrıldı. Aynı gün çalışılmayan serum örnekleri RNA ekstraksiyon, Reverse Transcription (RT) ve PCR işlemlerine kadar -85°C de saklandı.

### **3.3 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)**

Çalışmamızda bir RNA virüsü olan KKKA virüsünün PCR ile klinik örneklerden aranmasında; RNA ekstraksiyonu, bu aşamayı takiben elde edilen RNA'ların daha stabil ve dayanıklı Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit (cDNA)'ya RT basamağı ile dönüştürülmesi, amplifikasyon basamağında DNA'ların çoğaltılması ve son olarak çoğaltılan DNA'ların jel elektroforez yöntemi ile görüntülenebilir hale getirilip görüntülenmesi basamakları gerçekleştirilmiştir. Kullandığımız kit S segment nükleotid zincirinin 212'den 492' ye kadarki bölgesini hedeflemektedir.

#### **3.3.1. RNA Elde Edilişi**

Sacace Biotechnologies (İtalya) firmasının Ribo-Sorb RNA/DNA extraction kit kullanılarak üretici talimatlarına göre aşağıdaki gibi -85°C de saklanan serumlardan, çözüldükten sonra RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Buna göre;

- 1) Lizis solüsyonu ve yıkama solüsyonu (saklanmaları +2-8°C de olduğu takdirde) buz kristalleri kaybolana dek 60-65°C'ye kadar ısıtıldı. Test sayısınca 1.5 ml lik polypropilen tüpler hazırlandı. Ekstraksiyonun negatif kontrolü için de bir tüp ilave edildi.

- 2) Her bir tüpe 10 µl internal kontrol ve 450 µl lizis solüsyonu eklendi.
- 3) Lizis solüsyonu içeren uygun tüpe 100 µl serum eklendi.
- 4) Kontrolleri aşağıdaki gibi hazırlandı:
  - C-negatif tüpüne 100 µl C-Negatif kontrol eklendi.
- 5) Tüpleri vortekslenip 5000 devirde 5 sn. santrifüjlendi.
- 6) Sorbenti kuvvetli bir şekilde vortekslenip her bir tüpe 25 µl eklendi.
- 7) 5-7 sn. vortekslenip tüm tüpler 10 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Tüm tüpler periyodik olarak vortekslendi.
- 8) Tüm tüpler 10000 devirde 30 sn. santrifüjlendi ve aerosol bariyerli ucu olan mikropipetle her bir tüpün üstündeki sıvı, çökeltiyi karıştırmadan dikkatle alındı. Tüpler arasında pipet uçları değiştirildi.
- 9) Her bir tüpe 400 µl yıkama solüsyonu eklendi. Kuvvetle vortekslendi ve 10000 devirde 30 sn. santrifüjlenerek aerosol bariyerli ucu olan mikropipetle her bir tüpün üstündeki sıvı, çökeltiyi karıştırmadan dikkatle alındı. Tüpler arasında pipet uçları değiştirildi.
- 10) Her bir tüpe 500 µl %70 etanol eklendi. Kuvvetle vortekslendi ve 10000 devirde 30 sn. santrifüjlenip aerosol bariyerli ucu olan mikropipetle her bir tüpün üstündeki sıvı, çökeltiyi karıştırmadan dikkatle alındı. Tüpler arasında pipet uçları değiştirildi.
- 11) 10. basamak tekrarlandı.
- 12) Her bir tüpe 400 µl aseton eklendi. Kuvvetle vortekslendi ve 10000 devirde 30 sn. santrifüjlenip aerosol bariyerli ucu olan mikropipetle her bir tüpün üstündeki sıvı, çökeltiyi karıştırmadan dikkatle alındı. Tüpler arasında pipet uçları değiştirildi.
- 13) Tüplerin ağzı açık olarak 60°C 'de 10 dk. inkübe edildi.
- 14) Çökelti 50 µl RNA-eluent'de geçici olarak bırakıldı. 60°C'de 10 dk. inkübe edildi. Periyodik olarak vortekslendi. Maksimum hızda (16000 devirde) 2 dk. santrifüjlendi. Üstteki sıvı, kullanım için hazır olan RNA'yı içermekteydi. RT basamağı, amplifikasyon ve jel görüntüleme aynı gün içinde gerçekleştirildi.

### 3.3.2. Revers Transkripsiyon (RT)

Sacace Biotechnologies firmasının Reverta (Congo-Crimea) Reverse Transcription Kit extraction kit kullanılarak üretici talimatlarına göre aşağıdaki gibi ekstraksiyonunu yapıp hazırlanan RNA preparasyonlarından RT basamağı gerçekleştirildi. Buna göre;



- 1) Reagent Mix i hazırlandı: 12 reaksiyon için, liyofilize Dithiothreitol (DTT) içeren tüpe 125 µl RT-Mix eklendi ve en az 5-10 sn vortekslenildi.
- 2) Reagent Mix içeren tüpe 6 µl Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV) eklendi. 3 sn vortekslenip, 5-7 sn santrifüjlendi ve her bir tüpe 10 µl dağıtıldı.
- 3) Uygun tüpe 10 µl RNA örneği pipetlendi. Pipet kullanarak dikkatle karıştırıldı.
- 4) Tüpler BioRad marka MyCycler Thermalcyclers'a yerleştirip 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 5) TE-buffer ile her bir cDNA içeren örnek 1:2 seyreltildi ( Her bir tüpe 20 µl TE-buffer eklendi).

### 3.3.3. Amplifikasyon

Sacace Biotechnologies firmasının Congo-Crimea 281/504 IC Ampification Kit kullanılarak üretici talimatlarına göre aşağıdaki gibi RT basamağı sonrası elde edilen cDNA'lerden amplifikasyon basamağı gerçekleştirildi. Buna göre;

- 1) Gerekli miktarda PCR-Mix-1 tüpleri hazırlandı. Biri amplifikasyonun negatif kontrolü için diğeri amplifikasyonun pozitif kontrolü için iki ek tüp içeriyordu.
- 2) Her tüpe 10 µl PCR-Mix-2 eklendi ve 1 damla mineral yağ damlatıldı (yaklaşık 25 µl).
- 3) Uygun tüpe ters transkripsiyon basamağından sonra elde edilen cDNA örneğinden 10 µl eklendi.
- 4) Amplifikasyonun negatif kontrolü için tüpe 10 µl DNA-buffer eklendi.
- 5) PCR-Mix-1 tüpleri kapatılıp BioRad marka MyCycler Thermalcyclers'a transfer edildi ve sıcaklık 95°C 'ye ulaşınca aşağıdaki döngü programı uygulandı (Tablo 9).

**Tablo 9.** PCR Döngü Programı

BioRad MyCycler V.1.065 Programı			
Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
1	95°C	Pause	
2	95°C	15 dk	1
3	95°C	15 sn	42
	58°C	30 sn	
	72°C	30 sn	
4	72°C	2 dk	1
5	10°C	Saklama	

### 3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Jel Görüntüleme

DNA moleküllerinin analizinde en basit ve en yaygın yöntemlerden biri jel elektroforezidir. Etidyum Bromür boyasının kullanımı ile ultraviyole (UV) ışık altında, görüntüleme cihazında DNA'nın jel üzerindeki yerini belirledik. Jel aşağıdaki gibi hazırlandı;

- 1) %2 lik 80 ml. Agaroz jel hazırlanışı: 1,6 g. Agaroz balonjojeye konulup üzerine 80 ml. 1X Tris Borate EDTA (TBE) buffer sızdırarak konuldu.(10X TBE den 100 ml + 900 ml. deiyonize distile su)
- 2) Çalkalama, karıştırma yapmadan mikrodalgaya yerleştirip eritildi. Baloncuk oluşmamasına gayret edilerek kaynadığında alındı.
- 3) Elektroforez tankında kalıp hazırlanıp DNA'nın yerleştirileceği kuyucukları oluşturmak için tarak yerleştirildi.
- 4) Jel biraz soğuyunca içine 50 µl Etidium Bromür yavaşça ortasına eklendi. Hafifçe sallayarak karışması sağlandı.
- 5) Etidyum Bromürlü jel kalıba döküldü. Jel donunca kalıp lastikleri çıkarılıp, tankın içine yerleştirildi. 1X TBE buffer jeli yüzeyini 1 cm aşacak şekilde elektroforez tankına dolduruldu. Jel bufferdayken tarak çıkarıldı.
- 6) Brom Fenol Blue (BFB) yükleme boyasının hazırlanışı: 10X Brom Fenol Blue boyasını 1X 'e seyreltildi (50 µl 10X Brom Fenol Blue boyası + 450 µl Distile su).
- 7) Her numune için 1X BFB den 3 µl tüplere konuldu. Üzerlerine 9 µl amplifikasyon ürünü eklendi. Pipetle karıştırıldı.
- 8) Karışımın tümü pipete alındı (toplam 12 µl).
- 9) Herbiri jel üzerindeki kuyucuklara sırayla yerleştirildi.
- 10) DNA Ladder çalışma solüsyonu hazırlanışı: 100 µl konsantre DNA Ladder üzerine 20 µl 6X BFB ilave edilir, bu çalışma çalışma solüsyonu olarak kullanılır.
- 11) 7 µl DNA Ladder son kuyucuğa konuldu.
- 12) 100 V'da 60 mA 'de 60-90 dakika yürütüldü.

### 3.4. SONUÇLARIN ANALİZİ VE YORUMLANMASI

GENELİNE Image SCI-Image Analysis System Jel görüntüleme sisteminde UV altında fotoğraflandı ve yorumlandı.

Sonuçların analizi, %2'lik agaroz jelde yürütülen DNA'nın spesifik bantlarının varlığına veya yokluğuna dayanır. Spesifik çoğaltılmış DNA fragmentinin uzunluğu;

- 281 bp bantın görülmesi KKKAV pozitifliğini gösterir.
- 504 bp bantın görülmesi İnternal Kontrolü gösterir (Şekil 18.).



**Şekil 18.** Görüntülenmiş jel elektroforez. (1-11 numaralar: hastalar, NC: Negatif Kontrol, PC: Pozitif Kontrol, M: 100bp Marker, IC: İnternal Kontrolü, T: Test Sonucu)

İşaretleyici olarak 100 bp marker kullanıldı.

Moleküler çalışmalarımızı temiz oda adı verilen bölümde gerçekleştirdik. Bu bölüm, reagent hazırlama, örnek hazırlama ve PCR amplifikasyon olarak üç kısımdan oluşmaktadır. Örnek hazırlama odasında ayrıca hepafiltreli laminer kabin 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.

### 3.5. HEMOGRAM TESTLERİNİN ÇALIŞILMASI

Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Ill., USA) cihazında çalışılmıştır. Normal platelet sayısı  $>150.000/\text{mm}^3$  olarak belirlendi ve bunun altındaki değerler trombositopeni olarak kabul edildi.

Lökosit normal değerleri  $4.000-10.000 \text{ mm}^3$  arası kabul edildi. Lökosit sayısı  $<4.000 \text{ mm}^3$  ise lökopeni, lökosit sayısı  $>10.000$  ise lökositoz olarak kabul edildi.

### 3.6. ALT-AST, CK ÖLÇÜMÜ VE NORMAL DEĞERLERİ

ALT, AST ve CK testleri hasta serumlarından “Dimension® Clinical Chemistry System “ metodu kullanılarak DADE BEHRING RxL Max(Dade Behring Inc. Newark, DE 19714, USA) cihazında çalışılmıştır. ALT, AST ve CK normal değerleri sırasıyla aşağıdaki Tablo-10, Tablo-11 ve Tablo-12’de gösterilmiştir.

**Tablo 10.** ALT normal değerleri

Yaş	Alt değer	Üst değer	Cinsiyet
0-5 gün	6	50	*
5 gün-17 yaş	5	45	*
17 yaş ve üzeri	10	40	Erkek
17 yaş ve üzeri	7	35	Kadın

\*cinsiyet farkı yoktur

**Tablo 11.** AST normal değerleri

Yaş	Alt değer	Üst değer	Cinsiyet
0-5 gün	35	140	*
5 gün-9 yaş	15	35	*
9 yaş-18 yaş	5	45	*
18 yaş ve üzeri	10	37	*

\*cinsiyet farkı yoktur

**Tablo 12.** CK normal değerleri

Yaş	Alt değer	Üst değer	Cinsiyet
0-1 gün	130	1200	*
1-4 gün	87	725	*
4 gün-18 yaş	5	130	*
18 yaş ve üzeri	39	308	Erkek
18 yaş ve üzeri	26	192	Kadın

\*cinsiyet farkı yoktur

## 2.7. ARAŞTIRMA VERİLERİNİN ANALİZİ

Araştırma verileri bilgisayar ortamında Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) V.15 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sürekli veriler normal dağılım özelliği göstermemeleri nedeniyle ortancaları ve çeyrekler arası aralıkları (interquartil range) ile gösterilmiştir. PCR(+) ve PCR(-) iki grupta yer alan ve normal dağılım göstermeyen değişkenler arasında istatistiksel anlamlı farklılık olup olmadığını ortaya koymada Man Whitney-U testi kullanılmıştır. Kategorik verilerin her iki gruptaki dağılım farklılıklarının incelenmesinde Ki-kare analizi kullanılmıştır. PCR standart test olarak kabul edildiğinde ELISA yönteminin spesivite ve sensitivite ile pozitif ve negatif prediktif değerleri standart formüller kullanılarak hesaplanmıştır (137).

## 4. BULGULAR

İncelemesi yapılan toplam 141 kan örneğinin PCR ile 84'ü Pozitif, 57'si de Negatif olarak bulundu. ELISA ile test edilen 64 örneğin 30'u pozitif, 34'ü de negatif bulundu.

### 4.1. ÖLÜM ORANLARI

PCR ile KKKAV saptanan 84 adet hastanın grubundan 5'i (% 5.95) bu hastalık sebebiyle ölmüştür (Tablo 13).

**Tablo 13.** Çalışma Ölüm Oranları

	PCR (-) n=57		PCR(+)n=84		Toplam n=141	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
ÖLEN	2	3.5	5	5.95	7	4.96
SAĞKALAN	55	96.5	79	94.05	134	95.04
Toplam	57	100	84	100	141	100

### 4.2. SOSYO-DEMOGRAFİK DEĞİŞKENLER

PCR pozitif Kırım Kongo Kanamalı Ateşi vakaları ile PCR negatif bulunan şüpheli vakaların bazı sosyo-demografik değişkenlere göre (cinsiyet, yaş grupları, meslek) dağılımı tablo-14'de gösterilmiştir.

Gruplar arasında cinsiyet dağılımları (Tablo 14 ve Şekil 19) ve yaş gruplarına göre dağılımda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı, ancak grupların meslek dağılımlarının anlamlı olarak farklı olduğu Tablo-14'den görülebilmektedir. Çocukluk döneminde olanlar PCR(+) KKKVA vakalarının (%32.2) 'sini oluştururken, PCR(-) şüpheli vakaların ise %77.8'ini çocukluk çağında olanlar oluşturmaktadır ve gruplar arası farklılık bu gruptan kaynaklanmaktadır.

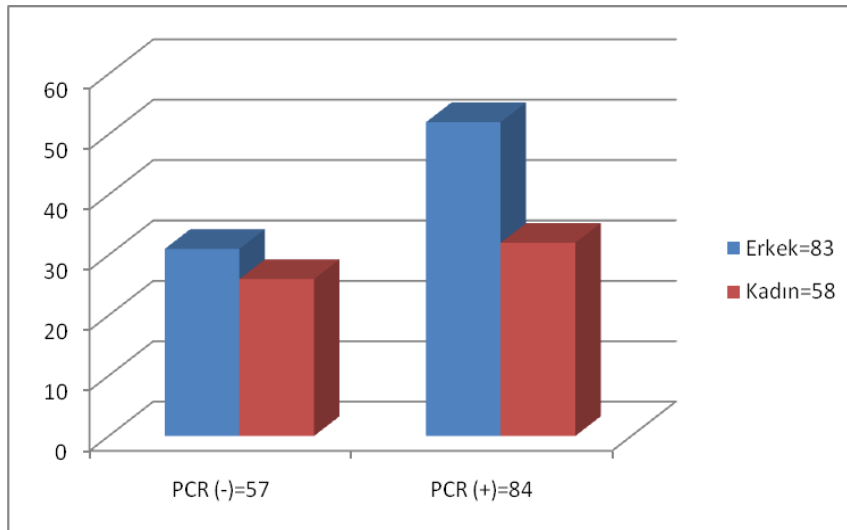
PCR(+) KKKVA vakalarında yaş ortalaması ( $40.1 \pm 20.3$ ), PCR(-) bulunan şüpheli olgularda ise ( $36.0 \pm 19.9$ ) dur. Grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p=0.156$ ).

**Tablo 14.** PCR (+) KKKA Vakaları ile PCR (-) Şüpheli Vakaların Bazı Sosyo-Demografik Değişkenlere Göre Dağılımı.

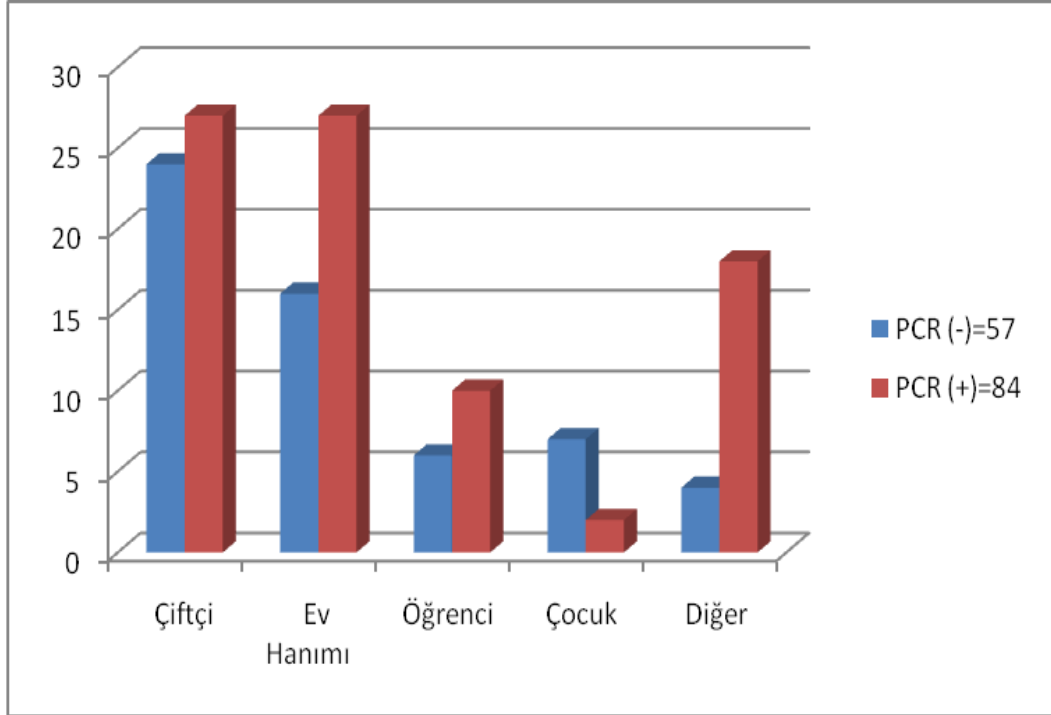
	PCR (-) Şüpheli Vakalar		PCR(+) KKKA Vakaları		Toplam		P
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet							0.388
Erkek	31	37.3	52	62.6	83	100.0	
Kadın	26	44.8	32	55.1	58	100.0	
Yaş grupları							0.552
1-15	10	55.6	8	44.4	18	100.0	
16-25	10	38.5	16	61.5	26	100.0	
26-45	17	43.6	22	56.4	39	100.0	
46-65	16	36.4	28	63.6	44	100.0	
66+	4	28.6	10	71.4	14	100.0	
Meslek							0.027
Çiftçi	24	47.1	27	52.9	51	100.0	
Ev Hanımı	16	37.2	27	62.8	43	100.0	
Öğrenci	6	37.5	10	62.5	16	100.0	
Çocuk*	7	77.8	2	32.2	9	100.0	
Diğer**	4	18.2	18	81.8	22	100.0	
Toplam	57	100.0	84	100.0	141	100.0	

\* Okul öncesi dönem, Farklılığı oluşturan satır

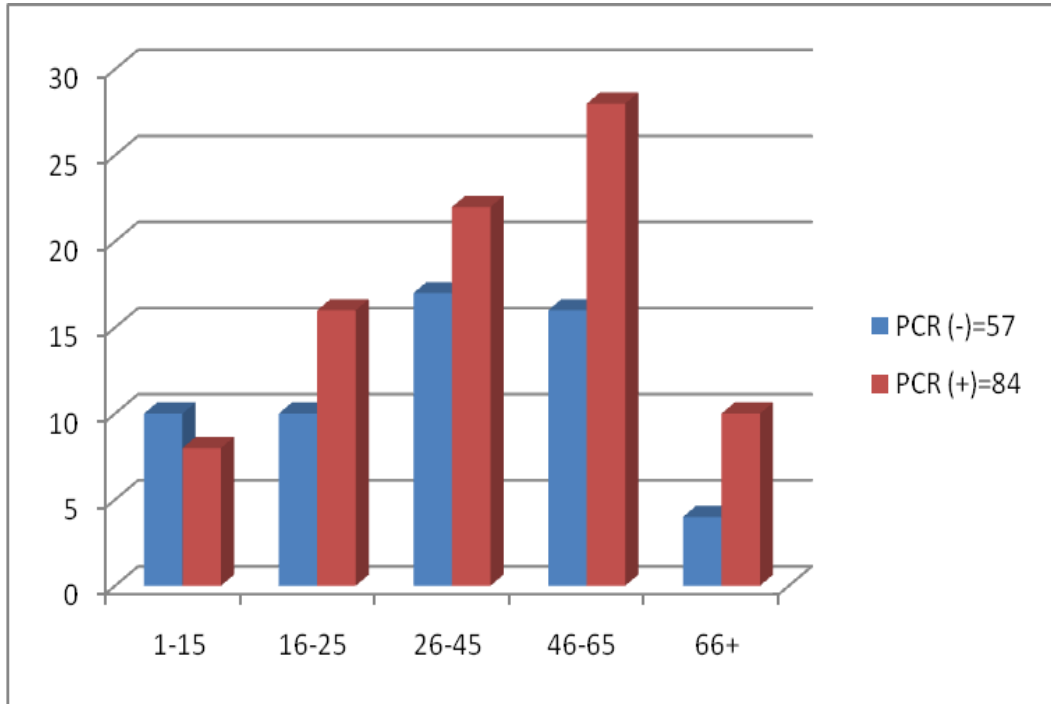
\*\* işçi, memur, emekli, serbest çalışan vb.



**Şekil 19.** PCR Pozitif ve Negatif Hastaların Cinsiyet Dağılımı



Şekil 20. PCR Pozitif ve Negatif Hastaların Mesleki Dağılımı



Şekil 21. PCR Pozitif ve Negatif Hastaların Yaş Grupları Dağılımı



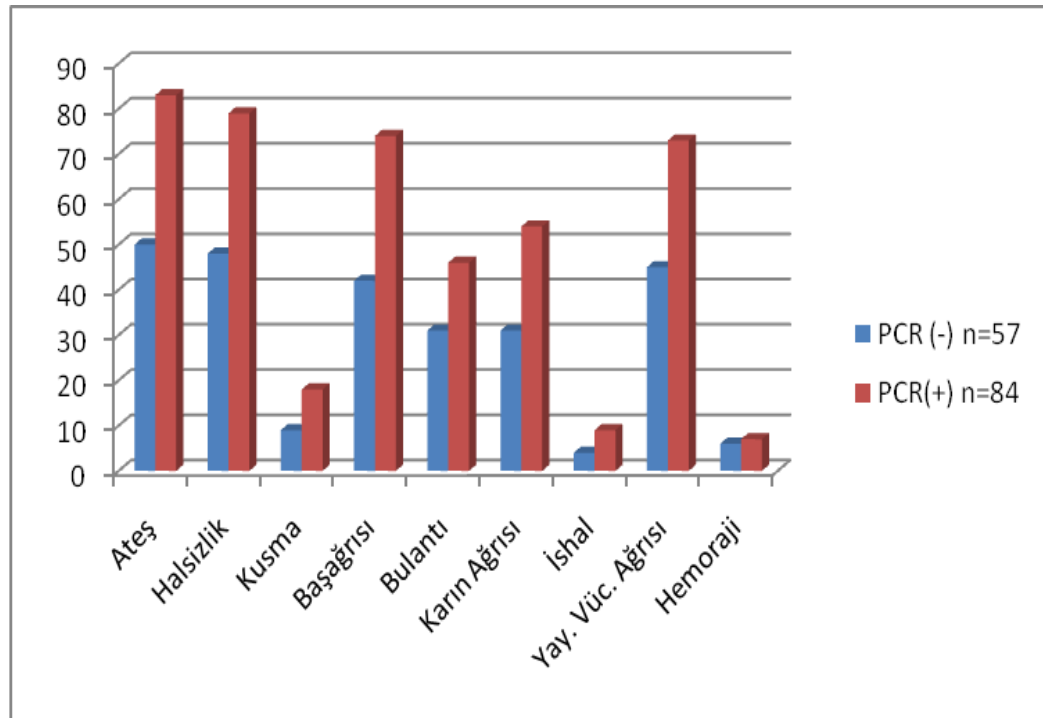
### 4.3. HASTALIĞIN KARAKTERİSTİK BULGULARI

Klinik yakınmalar arasında ateşin (%98.8), PCR pozitif KKKA hastalığı olan kişilerde en sık görülen semptom olarak tespit edildiği Tablo-15'te görülmektedir (P=0.036).

**Tablo 15.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasındaki Klinik Yakınmalarının Dağılımı.

SEMPTOM	PCR (-) n=57		PCR(+)n=84		Toplam		p
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Ateş	50	90.9	83	98.8	133	95.7	0.036
Halsizlik	48	87.3	79	95.2	127	92.0	0.088
Kusma	9	16.4	18	21.4	27	19.4	0.305
Baş ağrısı	42	76.4	74	88.1	116	83.5	0.057
Bulantı	31	56.4	46	54.8	77	55.4	0.496
Karın Ağrısı	31	56.4	54	64.3	85	61.2	0.224
İshal	4	7.3	9	10.8	13	9.4	0.349
Yay. Vüc. Ağrısı*	45	81.8	73	86.9	118	84.9	0.280
Hemoraji	6	10.9	7	8.3	13	9.4	0.410

\*Yaygın vücut ağrısı



**Şekil 22.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasındaki Klinik Yakınmalarının Dağılımı.

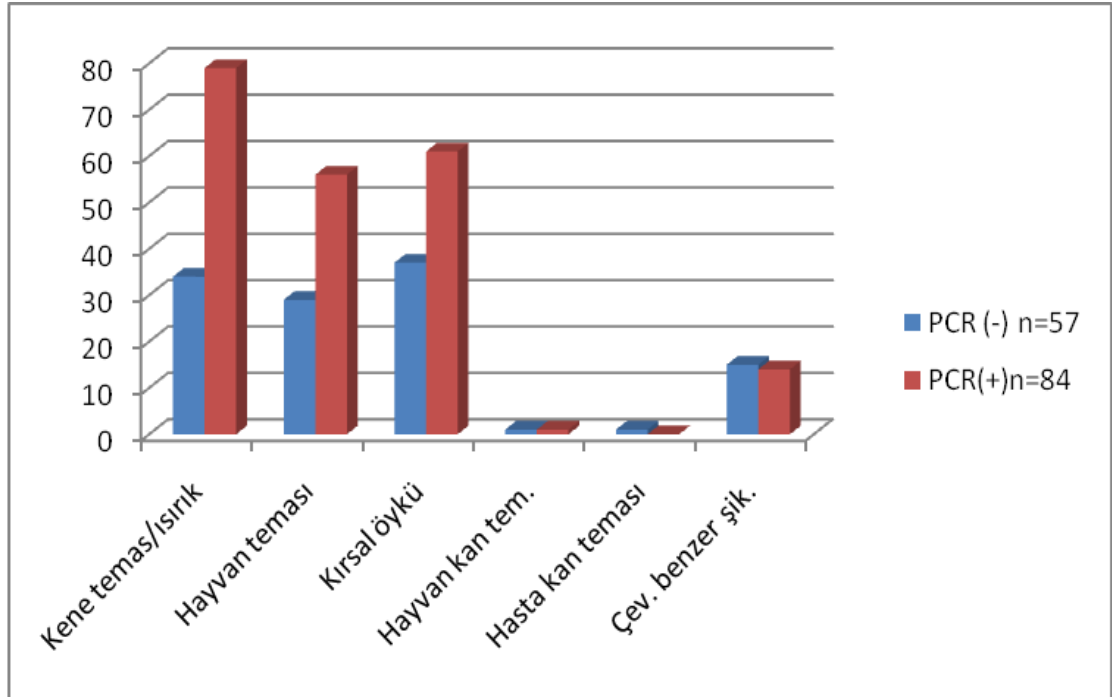
#### 4.4. ÖYKÜ- RİSK FAKTÖRLERİ

PCR pozitif grupta kene teması (%94) öyküde en önemli faktör idi (Tablo 16).

**Tablo 16.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasında Öykülerinde Var Olan Risk Faktörlerinin Dağılımı.

ÖYKÜ	PCR (-) n=57		PCR(+)n=84		Toplam(n=141)		p
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Kene temas/ısırtık	34	59.6	79	94.0	113	80.1	0.0001
Hayvan teması	29	50.8	56	66.6	85	60.2	0.071
Kırsal öykü	37	64.9	61	72.6	98	69.5	0.312
Hayvan kan tem.	1	1.7	1	1.2	2	1.4	0.637
Hasta kan teması	1	1.7	0	0	1	0.7	0.396
Çev. benzer şik.*	15	26.3	14	17.8	29	20.5	0.099

\*Çevrede benzer şikayetler



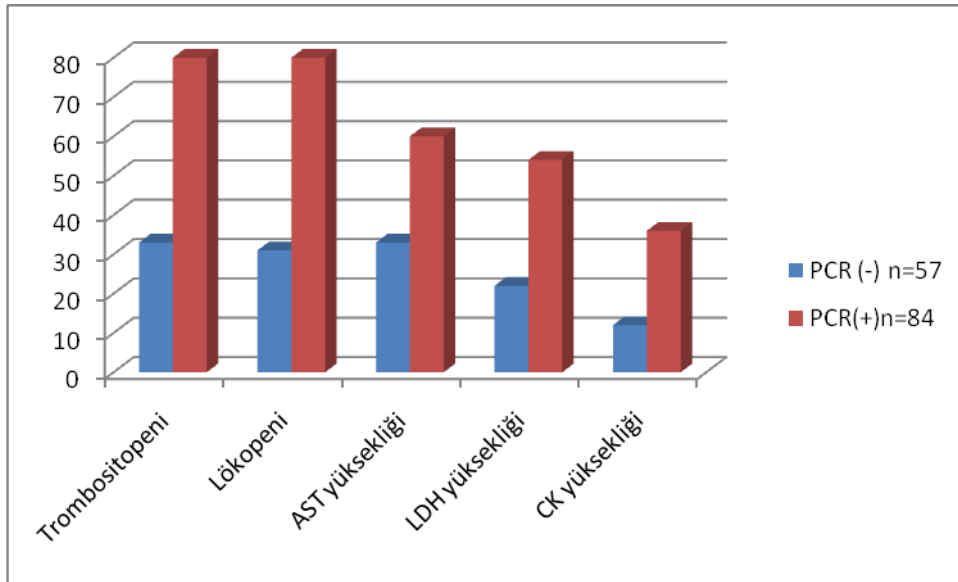
**Şekil 23.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olguların İlk Başvuru Sırasında Öykülerinde Var Olan Risk Faktörlerinin Dağılımı.

#### 4.5. HEMATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

PCR pozitif grupta trombositopeni, lökopeni ve AST, LDH, CK yüksekliği dikkat çekmektedir (Tablo 17).

**Tablo 17.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olgulara İlk Başvuru Sırasında Yapılan Hematolojik ve Biyokimyasal İncelemelerde Normal Sınırlar Dışında Gözlenen Bazı Parametrelerin Dağılımı.

	PCR (-) n=57		PCR(+)n=84		Toplam(n=141)		p
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Trombositopeni	33	57.8	80	95.2	113	80.1	0.0001
Lökopeni	31	54.3	80	95.2	111	78.7	0.0001
AST yüksekliği	33	57.8	60	71.4	93	65.9	0.003
LDH yüksekliği	22	38.5	54	64.2	76	53.9	0.001
CK yüksekliği	12	21.0	36	42.8	48	34.0	0.011



**Şekil 24.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olgularda İlk Başvuru Sırasında Yapılan Hematolojik ve Biyokimyasal İncelemelerde Normal Sınırlar Dışında Gözlenen Bazı Parametrelerin Dağılımı.

Tablo-18’de PCR pozitif grupta trombositopeni ve lökopeni belirgin bir şekilde izlenmiştir. Aynı tabloda AST düzeyinin ALT düzeyinden daha anlamlı bir şekilde yükseldiği dikkati çekmektedir ( $P<0.05$ ).

**Tablo 18.** Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Olguları ile PCR Negatif Bulunan Şüpheli Olgulara İlk Başvuru sırasında yapılan hematolojik ve biyokimyasal incelemelerde gözlenen bazı parametreler.

	PCR (-) n=57		PCR(+)n=84		p
	Median	IQR*	Median	IQR*	
Trombosit sayısı	149.000/mm <sup>3</sup>	(81.500-247.500)	103.500/mm <sup>3</sup>	(59.500-182.250)	0.014
Lökosit sayısı	4.200/mm <sup>3</sup>	(2.900-6.450)	3.350/mm <sup>3</sup>	(2.225-4.925)	0.008
ALT düzeyi	36 U/L	(23-57)	50.5 U/L	(29.25-83.50)	0.071
AST düzeyi	41 U/L	(28.50-78.50)	73.5 U/L	(42.50-154.50)	0.010

\*İnter quartil range

#### 4.6. PCR VE ELISA SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRMASI

Hastalarımızın 64 tanesi ELISA yöntemi ile test edilmiştir. PCR yöntemi ile pozitif bulunan 23 hasta, ELISA yöntemi ile araştırıldığında negatif bulunmuştur.

**Tablo 19.** PCR ve Ulusal Referans Laboratuvar ELISA Sonuçlarının Karşılaştırması

	PCR (+)	PCR (-)	TOPLAM
ELISA (+)	17 (%42.5)	13 (%54.1)	30
ELISA (-)	23 (%57.5)	11(%45.9)	34
TOPLAM	40 (%100)	24 (%100)	64

Tablo-19’a göre PCR yöntemini altın standart olarak kabul ederek ELISA yöntemi için hesaplanan Sensivite, Spesivite ve Prediktif değerler;

- ELISA Sensivite : % 42.5
- ELISA Spesivite: % 45.8
- ELISA Pozitif Prediktif Değer (PPV): % 56.6
- ELISA Negatif Prediktif Değer (NPV): % 32.3

olarak bulunmuştur.

#### 4. TARTIŞMA

KKKA virüsünün kan ve ya doku örneklerinden ilk birkaç gün içerisinde tespitinde hücre kültür yöntemleri kullanılabilir. Bu yöntemin deneyimli personel, birkaç gün zaman ve yüksek biyo güvenlik seviyesi (BSL-4) laboratuvar koşulları gerektiriyor olması uygulanmasını kısıtlar (124). Çalışmamızda uyguladığımız RT-PCR yöntemi daha düşük biyo güvenlik seviyesinde çalışma imkanı verdiği gibi zaman açısından 6-8 saat gibi bir zamanda kesin sonuç verebilmiştir.

Çalışmamızda incelemeye aldığımız 141 hasta serum örneklerinin 84 (%59.5) tanesini uyguladığımız RT-PCR yöntemi ile pozitif bulduk. Ancak bu oran, çalışmanın sağlık bakanlığının belirtmiş olduğu kriterlere uyularak, seçilmiş hasta grubunda yapıldığından genel popülasyonu yansıtmamaktadır.

PCR pozitif bulduğumuz gruptaki hastaların öykülerinde kene teması/ısırişık öyküsü %94 ( $P < 0.05$ ), kırsal öykü %72.6, hayvan teması %66.6 olarak en sık görülen risk faktörleri idi. Kene teması öyküsü bu hastalık ile özdeşleşmiş görünmektedir ve hemen tüm yayınlarda bildirilmiştir (1, 2, 6, 21, 138). Tonbak ve arkadaşlarının (72) çalışmasında ülkemizdeki başlıca hastalığı bulaştıran *Hyalomma* cinsi kenelerin bölgemizde yaygın olduğunu görmekteyiz.

İran, Pakistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Güney Afrika Cumhuriyeti gibi birçok ülkede sağlık çalışanlarına KKKAV bulaşı (Tablo 1) defalarca bildirilmiştir (139, 140, 141). Bizim de çalışma grubumuz içinde sadece 1 laboratuvar çalışanı hasta kanı ile teması olmuş, semptomları, hematolojik ve biyokimyasal parametreleri desteklemesine rağmen PCR negatif bulunmuştur.

PCR pozitif hasta grubunda, %62.6 erkek, %55.1 kadın cinsiyeti tespit edildi. İstatistiksel olarak cinsiyet açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi ( $P > 0.05$ ). Bizim bulduğumuz cinsiyet oranları, Türkiye’de 2002-2007 yılları arasında değerlendiren Yılmaz ve arkadaşlarının (61) çalışması ile uyumlu idi. İran’da yapılan bir çalışmada ise KKKKA doğrulanmış hastalardaki oran daha farklı olarak erkek cinsiyeti için %80 bulunmuştur (141). Aynı çalışmada kırsal alanda yaşam %38.8 bulunmuştur.

PCR(+) KKKKA vakalarında yaş ortalaması ( $40.1 \pm 20.3$ ), PCR(-) bulunan şüpheli olgularda ise ( $36.0 \pm 19.9$ ) dur. Grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p=0.156$ ). İran’da yapılan bir çalışmada KKKKA hastalığı %55.7 oranında 21-40 yaş arasında saptanmıştır (143).

Meslek olarak çiftçi, ev hanımları ve öğrenciler kırsalda yaşamın fazla olduğu bölgemizde sık görülen gruplardır. Ev hanımı grubunu aslında, çiftçilik ağırlıklı yaşayan bölge halkında dolaylı olarak bu gruptaki kadınlar da çiftçi grubuna dahil edilmeliydiler. Ancak hastalardan alınan bilgiler ayrıymış gibi göstermektedir. Dolayısıyla ağırlıklı meslek grubu çalışmamızda çiftçilik olarak kabul edilmektedir. Ülkemiz genelinde de bu iki grup en sık görülen meslek grubudur (61). Çalışmamıza benzer mesleki bulguları İran'da yapılan çalışmalarda da görmekteyiz (143). Genel bilgiler tabloda 1'de görüldüğü üzere birçok salgında tarım çalışanları mesleki ağırlığı oluşturmaktadır. Kene teması temel risk faktörü olduğu düşünüldüğünde bu vektör ile teması en muhtemel mesleki kesim olan çiftçiler ve ya diğer bir deyimle tarım çalışanları başlıca risk altındaki gruptur (Tablo 14).

CDC, web sitesinde hastalığın semptomlarını baş ağrısı, yüksek ateş, kas eklem ağrıları, karın ağrısı, kusma ve çeşitli kanamalar olarak tariflemiştir (144). Bizim çalışmamızda ön plandaki semptomlar ise: ateş (%98.8), halsizlik (%95.2), yaygın vücut ağrısı (%86.9) ve baş ağrısı (%88.1) olmuştur. Hemoraji (%8.3) ise en az gözlenen semptom idi. Türkiye 2002- 2007 yıllarının analizini yapan bir çalışma olan Yılmaz ve arkadaşlarının (61) çalışmasında ateş %89.4, halsizlik %92.3, kas ağrısı %67,9, baş ağrısı %68.1 gibi bizim çalışmamıza benzer oranlar ve hemorajiler %23 olarak bizden yüksek bulmuşlardır. İran'da yapılan bir çalışmada ateş %96.5, kas ağrısı %90.2 ve hemorajiler %89 gözlenmiştir (142). Hemoraji oranının bizim çalışmamızda düşük oluşu dikkat çekicidir. Bu durum bize, çalışmamızdaki hastaların, çoğunlukla hemorajik döneme girmeden (inkübasyon ve prehemorajik dönem) önce sağlık kuruluşlarına başvuru yaptıklarını göstermektedir.

Hematolojik parametrelerden trombositopeni (median=103.500/mm<sup>3</sup>) ve lökopeni (median=3.350/mm<sup>3</sup>) anlamlı görüldü (P<0.05). Bu iki bulgu KKKA hastalığı için, birçok çalışmada belirgin bir bulgu olarak gösterilmiştir (145). Ülkemizden Bakır (51) ve Yılmaz'ın (61) çalışmalarındaki hematolojik bulgular da bizim bulgularımız ile oldukça uyumlu idi. Çalışmamız sonuçlarına göre trombositopeni ve lökopeni birlikteliği, klinisyene diğer hematolojik hastalıklar yanı sıra KKKA hastalığını ayırıcı tanıda düşünmesi gerektiğini göstermektedir.

Biyokimyasal parametrelerde; AST (%71.4), LDH (%64.2) ve CK (%42.8) yüksekliği anlamlı idi (P<0.05). PCR pozitif hasta grubunda AST ve ALT için istatistiksel analiz yapıldığında AST'nin (median=73.5U/L ve P<0.05) ALT'den (median=50.5U/L ve P<0.05) daha anlamlı yükseldiği gözlemlendi. Bakır (51) ve Swanepoel (112) çalışmalarında KKKA hastalığı doğrulanmış hastalarda AST'nin benzer şekilde daha yüksek olduğunu

göstermişlerdir. AST ve ALT yüksekliği gözlenen hastalarda, karaciğeri tutan hastalıklar yanı sıra KKKA hastalığını mutlaka araştırmak gereklidir. AST yüksekliği KKKA hastalığı için daha anlamlıdır.

Hastalığın şiddetli kategoride olup olmadığını gösteren ve değişik araştırmacılar tarafından öne sürülen bazı laboratuvar parametrelerinin olduğu ve bu parametrelerin kullanılması halinde ölümün yüksek olasılıkla önceden tahmin edilebileceği bildirilmiştir. Bu parametrelerden biri Swanepoel ve arkadaşları (112) tarafından tanımlanmıştır. Buna göre hastalık semptomlarının başlamasından sonraki ilk 5 gün içinde;

- 1- Kan lökosit sayısı  $\geq 10.000/\text{mm}^3$ ,
- 2- Kan trombosit sayısı  $\leq 20.000/\text{mm}^3$ ,
- 3- Aspartat Aminotransferaz (AST) değeri  $\geq 200$  U/L,
- 4- Alanin Aminotransferaz (ALT) değeri  $\geq 150$  U/L ve

5-Aktive parsiyel tromboplastin (aPTT)  $\geq 60$  sn veya fibrinojen seviyesi  $\leq 110\mu\text{g/dl}$  kriterlerinden en az birisi varsa hastanın şiddetli kategoride olduğu ve hastalıkta %90 ölümü gösterebileceği bildirilmiştir. Oysaki bizim çalışmamızda bu kriterlere uyan birçok hastamız var iken ölüm oranımız %5.95'tir. Ölen hastalarımızda ise AST/ALT yüksekliği ve  $20.000/\text{mm}^3$  altında trombositopeni mevcut idi. Ergönül ve arkadaşları (108) serum AST ve ALT yüksek seviyelerinin ( $>700$  ve  $>900$  U/L) şiddetli olguların göstergesi olabileceğini vurgular iken, Bakır ve arkadaşları (51) da INR, AST, LDH ve CK yüksekliğini ölen hastalarda gözlemlemişlerdir. Yine Çevik ve arkadaşları (134) da kanda  $20.000/\text{mm}^3$  ve altında trombositopeni ile birlikte somnolans ve melenanın ölümü gösteren bağımsız parametreler olduğunu ileri sürmektedirler. Fışgın ve arkadaşları (146) trombosit sayısının düşüklüğünü, AST (2555 U/L) ve ALT (1675 U/L) aşırı yüksekliğini kötü prognoz kriteri olabileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda KKKA hastalığı teşhisi ile ölen hastaların trombositopeni, lökopeni, aşırı AST ve ALT yükseklikleri mevcut olup, bu bulgular Çevik (134) ve Fışgın'ın (146) çalışmaları ile uyumlu idi.

Çalışma sonucunda bulduğumuz ölüm oranları (%5.95) Türkiye ortalama KKKA hastalığı ölüm oranlarına (2007 yılı için %4.6) yakın bir değerdir (12). Oysa dünyada önemli salgınların olduğu ülkelerde bu oranlar daha yüksek bulunmuştur. Son on yıl içerisinde meydana gelen salgınlardan, 2003 İran salgınında ölüm oranı %18, 2001 Kosova salgınında %33, 2004 Moritanya salgınında %29 gibi çalışmamızın çok üzerinde ölüm oranları görülmektedir (Tablo 1). Bu önemli farkın sebepleri; gelişmiş serolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin uygulanması sonucu hastaya müdahalede hız kazanılmış

olması, yeterli sayıda ve yetişmiş sağlık personelinin ülkemizde bulunması, destek tedavisi ve hasta bakım şartlarının daha iyi olması nedeniyle olabilir. Benzer şekilde komşu ülke İran'da da serolojik ve moleküler teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi neticesinde ölüm oranlarının 2000 yılında %20 iken 2007'de %2'lere kadar düştüğü bildirilmiştir (143).

PCR negatif grupta, her ne kadar endemik bölgeden geliyor olması ve klinik tablosu KKKA hastalığını düşündürmüş olsa bile, ölen 2 hastanın ise birinde sebep bakteriel sepsis, diğerinde ise özefagus malignitesi olduğu gözlenmiştir.

Eş zamanlı alınan kan örneklerinin, 64'ünde ulusal referans laboratuvarında ELISA yöntemi ile antikor aranması yapılmıştır. ELISA yöntemi ile negatif bulunan 23 hasta PCR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Bu durum, akut dönemde kanda bulunan antikor miktarının ELISA testi tarafından tespit edilecek düzeyde olmadığını göstermektedir. Çünkü vücuda giren viral ajana karşı ilk oluşmaya başlayan IgM türünden antikorların kanda ölçülebilecek seviyeye kadar gelebilmesi, viral bulaşın ortalama yedinci gün ve sonrasında olabilmektedir (2,128). Japonya'da yapılan bir çalışmada hastaların 1. 5. ve 9. gün serumları alınarak RT-PCR ile KKKA virusunun varlığı tespit edilmiş ve serum örneklerinde KKKA virüsüne karşı oluşan IgM ve IgG antikorları aranmıştır. Birinci gün serumlarının hiçbirisinde ne IgM ne de IgG antikorları bulunamamıştır. Beşinci günden itibaren IgM ve IgG pozitifliği tespit edilebilmiştir (127). Burt (16) ve Duh'un (147) ayrı ayrı yapmış oldukları çalışmalarda da virüse karşı en erken IgM cevabını hastalığın dördüncü günü elde etmişlerdir. Burt ve arkadaşlarının (148) diğer bir çalışmasında PCR pozitif iken antikor pozitifliğini ancak yine dördüncü günde, hem IgM hem de IgG cevabını tüm örneklerde sekizinci günde tespit etmişler ve antikor pozitif iken virüsün vücuttan temizlenmesini gösteren PCR negatifleşmesini ise altıncı günden itibaren tespit etmişler, on üçüncü günde hiçbir PCR pozitifliği bulamamışlardır.

Bakır ve arkadaşlarının (51) ülkemizde yaptığı bir çalışmada hem ELISA hem de PCR yöntemi ile araştırılan hastalarında, ELISA negatif PCR pozitif 3 vaka tespit etmişlerdir. Hastalığın ölümcül seyrettiği bireylerde ve ilk birkaç günde, ölçülebilir bir antikor yanıtının olmayabileceği, ancak doku ve kandan virüsün belirlenebileceği belirtilmiştir (147, 149). Çalışmamızda PCR pozitif grupta ölen 5 hastanın 3'ünde, antikor cevabı öncesi döneme tekabül eden, ilk başvurusunda alınan kan örneklerinde ELISA testi çalışılmış ve sonuçları negatif bulunmuştur. Bu hastalarda ELISA testinin tekrarı sağlanamamıştır.

Yukarıdaki bilgilere uyumlu olarak, Çin'de yapılan bir çalışmada KKKA teşhisinde ELISA yönteminin PCR yönteminden daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir (115).



ELISA ile karşılaştırıldığında, uyguladığımız RT-PCR yöntemi hastalık etkeni virüs genomik partiküllerini kan veya dokuda, akut dönemde viremi gelişiminden itibaren tespit edebilmektedir. Virüse karşı gelişen antikorları ELISA yöntemi ancak akut dönem sonrasında gösterebilmektedir. Akut dönem içerisinde kesin tanıyı RT-PCR ile koyabilme avantajı bize erken tanı ve tedavi imkanı sağlarken mortaliteyi de azaltma imkanı verebilecektir. Erken tanı koyulması, özellikle hastalık için büyük risk altında olan sağlık çalışanlarına, virüs bulaşını azaltacaktır (150).

PCR pozitif 84 hasta numunesinden 40 tanesi, PCR negatif 54 hasta numunesinden 24 tanesi ELISA ile test edildi. ELISA Sensivite : % 42.5, Spesivite: % 45.8, PPV: % 56.6, NPV: % 32.3 bulundu. PCR pozitif grupta ELISA yöntemi ile çalışılan 40 numunenin 23 tanesi (%57.5) negatif idi. PCR negatif grupta ELISA yöntemi ile çalışılan 24 numunenin 13 tanesi (%56.5) ise pozitif idi. Çalışmamız, akut dönemde PCR pozitif 40 hastanın 23'ünde (%57.5) ELISA yönteminin KKKA hastalığını tespit etmede yetersiz kaldığını göstermiştir. ELISA yöntemi ile %57.5 oranında tanı konulamayan hasta grubu göz önüne alındığında, tanı için ELISA iyi bir test yöntemi olmasına rağmen, bu hastalığın erken tanısında duyarlılığının yüksek olması nedeniyle RT-PCR yöntemi öncelikle tercih edilmesi uygun olacaktır.

Üretici firma verilerine göre çalışmamızda kullandığımız PCR ticari kitin duyarlılığı  $10^3$  kopya/ml'dir. Kullandığımız kitin duyarlılığı, göz önüne alınırsa, viral yükün gelişen immün cevapla azalması ve ya daha az sayıda bir virüs yükü ile enfekte olunması durumunda uyguladığımız PCR yöntemi ile virüs tespitinin mümkün olmadığı görülmektedir. Ayrıca PCR yöntemi ile başka tür virüs tespiti çalışmalarında, PCR inhibisyonu yaklaşık %2.1 olarak bulunmuş ve bu da yöntemin etkinliğini olumsuz etkilemiştir (151). Daha hassas tanı metodlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

PCR negatif grupta 13 numunede ELISA pozitifliği gözlenmesi, (her ne kadar erken dönem başvuruları çoğunlukta olsa da) bu gruptaki hastaların inkübasyon ve prehemorajik dönem sonrası sağlık kuruluşuna başvurduğunu düşündürmektedir. PCR'nin negatif olduğu bu dönem antikor oluşumunu takiben viral temizlenmeyi akla getirmektedir. Bu veriyi PCR negatifleşmesini altıncı günden itibaren tespit eden Burt ve arkadaşlarının çalışması da desteklemektedir (148). Duh (147) ve Wölfel (92) yaptıkları çalışmalarda düşük viral yük ile IgG yüksekliğinin ters yönde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. PCR negatif ve ELISA pozitif bulduğumuz grupta bu verilere bağlı olarak viral temizlenmeyi veya hastaların  $10^3$  kopya/ml'den (Virüs saptama düzeyi=  $10^3$  kopya/ml) daha az virüs düzeyi ile enfeksiyona sahip olduklarını düşündürmüştür.

**Sonuç olarak;** PCR, yüksek duyarlılığı nedeniyle akut dönem (inkübasyon ve prehemorajik) içerisinde, KKKK virüsünü tespit etmede altın standart olarak değerlendirilebilir. Ortalama yedinci günden itibaren viral temizlenme başladığından, bu dönem sonrası PCR ile virüs tespiti ihtimali kısmen azalmaya başlayacaktır. PCR'ye ek olarak ELISA testinin uygulanması daha fazla hastaya tanı konmasını sağlayacaktır. Çalışmamızda da görüleceği gibi akut dönemde tek başına ELISA testinin uygulanması KKKK hastalığının tanısında yetersiz kalabilmektedir. Hastalığın erken tanısında, erken dönemde RT-PCR yöntemi uygulanmalı, ileri evrelerde ELISA yöntemi ile tanı desteklenmelidir.

## 6. SONUÇLAR

1. Şüpheli vaka tanımına uyan hastaların %59.5'inde virüs tespit edilmiştir.
2. KKKA hastalığı ölüm oranı %5.95 olarak tespit edildi.
3. Hastalık cinsiyet ayırımı yapmamaktadır ( $P>0.05$ ).
4. Hastalık kırsal kesimde tarım çalışanlarında sık görülmektedir.
5. Kene teması ( $P<0.05$ ), kırsal öykü ve hayvan teması en sık bulunan risk faktörleridir.
6. PCR(+) KKKA vakalarında yaş ortalaması ( $40.1 \pm 20.3$ ), PCR(-) bulunan şüpheli olgularda ise ( $36.0 \pm 19.9$ ) dur. Grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p=0.156$ ).
7. Hastalıkta öne çıkan semptomların ateş (%98.8), halsizlik (%95.2), yaygın vücut ağrısı (%86.9) ve baş ağrısı (%88.1) olduğu bulundu. En az gözlenen semptom ise hemoraji (%8.3) idi.
8. Hastalıkta trombositopeni ve lökopeni ( $P<0.05$ ) birlikteliği ve AST (%71.4), LDH (%64.2) ve CK (%42.8) yüksekliği anlamlı idi ( $P<0.05$ ). Bu bulgulara eşlik eden ateş varlığında ayırıcı tanıda KKKA hastalığı düşünülmelidir.
9. Altın standart kabul ettiğimiz PCR yöntemi ile ELISA yöntemi karşılaştırıldığında ELISA Sensivite : % 42.5, Spesivite: % 45.8, PPV: % 56.6, NPV: % 32.3 bulundu.
10. Hastalığın erken tanısında, erken evrelerde altın standart RT-PCR yöntemine güvenilmeli ve ileri evrelerde ELISA yöntemi ile tanı desteklenmelidir.

## 5. KAYNAKLAR

1. 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.
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
4. Harxhi A, Pilaca A, Delia Z, Pano K, Rezza G. Crimean-Congo hemorrhagic fever: a case of nosocomial transmission. *Infection.* 2005 Aug;33(4):295-6.
5. Ergonul O, Akgunduz S, Kocaman I, Vatansever Z, Kortten 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](http://www.who.int/csr/disease/crimean_congoHF/en) son erişim: 19/02/2009
8. Elaldı N. Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi Epidemiyolojisi. *Klimik Dergisi* 2004;17 (3):151-155
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. Enfeksiyon 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. <http://www.bt.cdc.gov/Agent/Agentlist.asp> son erişim: 19/02/2009
14. Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Prehaud C, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever

- virus. *J Clin Microbiol.* 2002 May;40(5):1587-91.
15. 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.
  16. Burt FJ, Leman PA, Abbott JC, Swanepoel R. Serodiagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Epidemiol Infect.* 1994 Dec;113(3):551-62.
  17. Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, Besirbellioglu BA, Bodur H, Basustaoglu AC, Guney C, Avci IY, Sener K, Setteh 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.
  18. Bodur H. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi ve DAS yönetimi. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. Antalya 2007. S.509-520
  19. Watts D.M., Ksiasek T.G., Linthicum K.J. and Hoogstraal H. Crimean-Congo Hemorrhagic fever. In T.P. Monath, ed. *The arboviruses: epidemiology and ecology*, vol.2. CRC, Boca Raton, FL,USA, 1988 177-260
  20. Simpson DIH, Knight EM, Courtois G, Williams MC, Weinbern MP, Kibukamusoke JW. Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. Human isolations-clinical notes. *East Afr Med J* 1967; 44: 87.
  21. Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Curr Mol Med.* 2005 Dec;5(8):753-60.
  22. 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.
  23. 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.
  24. 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
  25. Chamberlain J, Cook N, Lloyd G, Mioulet V, Tolley H, Hewson R. Co-evolutionary patterns of variation in small and large RNA segments of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol.* 2005; 86(Pt 12): 3337 - 3341.
  26. Gear JH, Thomson PD, Hopp M, Andronikou S, Cohn RJ, Ledger J, Berkowitz FE.

- Congo-Crimean haemorrhagic fever in South Africa. Report of a fatal case in the Transvaal. *S Afr Med J* 1982; 62: 576-80
27. Swanepoel, R, et al. Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 120-32
  28. Saluzzo JF, Aubry P, McCormick J, Digoutte JP. Haemorrhagic fever caused by Crimean Congo haemorrhagic fever virus in Mauritania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 268
  29. Saluzzo JF, Digoutte JP, Cornet M, Baudon D, Roux J, Robert V. Isolation of Crimean-Congo haemorrhagic fever and Rift Valley fever viruses in Upper Volta. *Lancet* 1984; 1: 1179.
  30. Chapman LE, Wilson ML, Hall DB, LeGuenno B, Dykstra EA, Ba K, Fisher-Hoch SP. Risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever in rural northern Senegal. *J Infect Dis* 1991; 164: 686-92
  31. Al-Tikriti SK, Al-Ani F, Jurji FJ, Tantawi H, Al-Moslih M, Al-Janabi N, Mahmud MI, Al-Bana A, Habib H, Al-Munthri H, Al-Janabi S, AL-Jawahry K, Yonan M, Hassan F, Simpson DI. Congo/Crimean haemorrhagic fever in Iraq. *Bull World Health Organ* 1981; 59: 85-90
  32. Tikriti SK, Hassan FK, Moslih IM, Jurji F, Mahmud MI, Tantawi HH. Congo/Crimean haemorrhagic fever in Iraq: a seroepidemiological survey. *J Trop Med Hyg.* 1981 Jun;84(3):117-20.
  33. Tantawi HH, Al-Moslih MI, Al-Janabi NY, Al-Bana AS, Mahmud MI, Jurji F, Yonan MS, Al-Ani F, Al-Tikriti SK. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Iraq: isolation, identification and electron microscopy. *Acta Virol* 1980; 24:464-7.
  34. Burney MI, Ghafoor A, Saleen M, Webb PA, Casals J. Nosocomial outbreak of viral hemorrhagic fever caused by Crimean Hemorrhagic fever-Congo virus in Pakistan, January 1976. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 941-7.
  35. El-Azazy OM, Scrimgeour EM. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in the western province of Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 275-8.
  36. Baskerville A, Satti A, Murphy FA, Simpson DI. Congo-Crimean haemorrhagic fever in Dubai: histopathological studies. *J Clin Pathol* 1981; 34: 871-4.
  37. Suleiman MN, Muscat-Baron JM, Harries JR, Satti AG, Platt GS, Bowen ET, Simpson DI. Congo/Crimean haemorrhagic fever in Dubai. An outbreak at the Rashid Hospital. *Lancet* 1980; 2: 939-41.

38. Scrimgeour EM. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Oman. *Lancet*. 1996 Mar 9;347(9002):692.
39. Feng CH. Preliminary study on antigenicity of Xinjiang hemorrhagic fever virus. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 1983 Apr;4(2):92-5.
40. Athar MN, Baqai HZ, Ahmad M, Khalid MA, Bashir N, Ahmad AM, Balouch AH, Bashir K. Short report: Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Rawalpindi, Pakistan, February 2002. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69: 284-7.
41. Bushra Jamil, Rumina S. Hasan, Arif R. Sarwari, Jane Burton, Roger Hewson, Christopher Clegg Crimean-Congo hemorrhagic fever: experience at a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 99, Issue 8, August 2005, Pages 577-584
42. Mardani M, Jahromi MK, Naieni KH, Zeinali M. The efficacy of oral ribavirin in the treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1613-8.
43. Nabeth P, Thior M, Faye O, Simon F. Human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Senegal. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1881-2.
44. Drosten C, Minnak D, Emmerich P, Schmitz H, Reinicke T. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Kosovo. *J Clin Microbiol* 2002;40:1122-3.
45. Papa A, Bozovic B, Pavlidou V, Papadimitriou E, Pelemis M, Antoniadis A. Genetic detection and isolation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Kosovo, Yugoslavia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 852-4
46. Papa A, Christova I, Papadimitriou E, Antoniadis A. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Bulgaria. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1465-7.
47. Papa A, Bino S, Llagami A, Brahimaj B, Papadimitriou E, Pavlidou V, Velo E, Cahani G, Hajdini M, Pilaca A, Harxhi A, Antoniadis A. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Albania, 2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 603-6.
48. Dunster L, Dunster M, Ofula V, Beti D, Kazooba-Voskamp F, Burt F, Swanepoel R, DeCock KM. First documentation of human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Kenya. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1005-6.
49. Nabeth P, Cheikh DO, Lo B, Faye O, Vall IO, Niang M, Wague B, Diop D, Diallo M, Diallo B, Diop OM, Simon F. Crimean-Congo hemorrhagic fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2143-9.
50. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in

- Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 19: 1379-1384.
51. 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.
  52. 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.
  53. Shanmugam J, Smirnova SE, Chumakov MP. Presence of antibody to arboviruses of the Crimean Haemorrhagic Fever-Congo (CHF-Congo) group in human beings and domestic animals in India. *Indian J Med Res.* 1976 Oct;64(10):1403-13.
  54. Darwish MA, Imam IZ, Omar FM, Hoogstraal H. Results of a preliminary seroepidemiological survey for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Egypt. *Acta Virol* 1978; 22: 77.
  55. Filipe AR, Calisher CH, Lazuick J. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Virol* 1985; 29: 324-8.
  56. Horvath LB. Precipitating antibodies to Crimean haemorrhagic fever virus in human sera collected in Hungary. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1976; 23:331-5.
  57. 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
  58. Drosten C, Kümmerer BM, Schmitz H, Günther S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res.* 2003 Jan;57(1-2):61-87.
  59. Papa A, Maltezou HC, Tsiodras S, Dalla VG, Papadimitriou T, Pierroutsakos I, Kartalis GN, Antoniadis A. A case of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Greece, June 2008. *Euro Surveill.* 2008 Aug 14;13(33). pii: 18952.
  60. Swanepoel R, Leman PA, Burt FJ, Jardine J, Verwoerd DJ, Capua I, Brückner GK, Burger WP. Experimental infection of ostriches with Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Epidemiol Infect.* 1998 Oct;121(2):427-32
  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. 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.
63. 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.
64. 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.
65. Akyazi R, Ecevit O, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2006,21(3): 340-349 *J. of Fac. of Agric. OMU*, 2006,21(3): 340-349
66. Barker SC, Murrell A, 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129 Suppl: S15-36.
67. Turell M, 2007. Role of Ticks in the Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. Ergonul O, Whitehouse C, eds. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective*. Dordrecht: Springer, 2007: 143-154.
68. Dohm DJ, Logan TM, Linthicum KJ, Rossi CA, Turell MJ. Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by *Hyalomma impeltatum* (Acari: Ixodidae) after experimental infection. *J Med Entomol*. 1996 Sep;33(5):848-51.
69. Zeller HG, Cornet JP, Diop A, Camicas JL. Crimean-Congo hemorrhagic fever in ticks (Acari: Ixodidae) and ruminants: field observations of an epizootic in Bandia, Senegal (1989-1992). *J Med Entomol*. 1997 Sep;34(5):511-6.
70. Vatansever Z. Vektör Kenelerin Ekolojisi. II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Kasım 2008. Ankara. 27-36
71. Yay M, Yazar S, Aydın L, Şahin İ. Kayseri Yöresinde Sığır ve Koyunlarda Kene Türlerinin Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü. Journal of Health Sciences)* 13(2) 25-29, 2004

72. Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, Dumanli N, Ozdarendeli A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov;44(11):4120-4.
73. 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.
74. Ergonul O, Whitehouse CA, eds. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective*, Dordrecht: Springer, 2007 pages 323-328
75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=11571&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock-> son erişim: 19/02/2009
76. Fuller F, Bishop DH. Identification of virus-coded nonstructural polypeptides in bunyavirus-infected cells. *J Virol.* 1982 Feb;41(2):643-8.
77. <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch056.htm> son erişim: 19/02/2009
78. 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
79. 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.
80. 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.
81. Elliott RM. Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med.* 1997 Sep;3(9):572-7.
82. Papa A, Ma B, Kouidou S, Tang Q, Hang C, Antoniadis A. Genetic Characterization of the M RNA Segment of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains, China. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(1): 50 – 53
83. Gentsch JR, Bishop DL. M viral RNA segment of bunyaviruses codes for two glycoproteins, G1 and G2. *J Virol.* 1979 Jun;30(3):767-70.
84. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol.* 2002 Jul;76(14):7263-75

85. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, Feldmann H, Flick R. Intracellular localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus glycoproteins. *Virology*. 2005 Apr 25;25:42.
86. 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.
87. Flick R, Flick K, Feldmann H, Elgh F. Reverse genetics for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*. 2003 May;77(10):5997-6006.
88. 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.
89. 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
90. 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.
91. 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
92. 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.
93. Duh D, Nichol ST, Khristova ML, Saksida A, Hafner-Bratkovic I, Petrovec M, Dedushaj I, Ahmeti S, Avsic-Zupanc T. The complete genome sequence of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated from an endemic region in Kosovo. *Virology*. 2008 Jan 15;375:7.
94. 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

95. Lukashev AN. Evidence for recombination in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol.* 2005 Aug;86(Pt 8):2333-8
96. Ustaçelebi Ş, Us D. Genel Viroloji. Ankara 2008. Sayfa: 118-121
97. 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.
98. 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.
99. Geisbert TW, Jahrling PB. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med.* 2004 Dec;10(12 Suppl):S110-21
100. Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000 Jul;11(5):461-83.
101. Nallagatla SR, Hwang J, Toroney R, Zheng X, Cameron CE, Bevilacqua PC. 5' triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science* 2007;318(5855):1455-8.
102. Degols G, Eldin P, Mechti N. ISG20, an actor of the innate immune response. *Biochimie* 2007;89(6-7):831-5.
103. Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schumann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Mühlberger E, Mirazimi A, Weber F. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS ONE.* 2008 Apr 30;3(4):e2032.
104. Childs KS, Andrejeva J, Randall RE, Goodbourn S. Mechanism of mda-5 Inhibition by paramyxovirus V proteins. *J Virol.* 2009 Feb;83(3):1465-73. Epub 2008 Nov 19
105. Gürbüz Y, Sencan I, Oztürk B, Tütüncü E. A case of nosocomial transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever from patient to patient. *Int J Infect Dis.* 2008 Oct 21.

106. Doganci L, Ceyhan M, Tasdeler NF, Sarikayalar H, Tulek N. Crimean Congo hemorrhagic fever and diffuse alveolar haemorrhage. *Trop Doct.* 2008 Oct;38(4):252-4.
107. Celikbaş A, Ergönül O, Dokuzoğuz B, Eren S, Baykam N, Polat-Düzgün A. Crimean Congo hemorrhagic fever infection simulating acute appendicitis. *J. Infect.* 2005 May;50(4):363-5.
108. 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.
109. Joubert JR, King JB, Rossouw DJ, Cooper R. A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part III. Clinical pathology and pathogenesis. *S Afr Med J.* 1985 Nov 9;68(10):722-8.
110. Booth TF, Gould EA, Nuttall PA. Structure and morphogenesis of Dugbe virus (Bunyaviridae, Nairovirus) studied by immunogold electron microscopy of ultrathin cryosections. *Virus Res.* 1991 Nov;21(3):199-212.
111. David-West TS. Method for accelerated identification of arboviruses after inoculation of mice. *Appl Microbiol.* 1972 Mar;23(3):437-40.
112. 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.
113. Connolly-Andersen AM, Magnusson KE, Mirazimi A. Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2158-64. Epub 2006 Dec 13.
114. Blackburn NK, Besselaar TG, Shepherd AJ, Swanepoel R. Preparation and use of monoclonal antibodies for identifying Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1987 Sep;37(2):392-7.
115. 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.
116. 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.

117. Swanepoel R, Struthers JK, McGillivray GM. Reversed passive hemagglutination and inhibition with Rift Valley fever and Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 May;32(3):610-7.
118. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP. Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol*. 1986 Oct;24(4):654-6.
119. Saluzzo JF, Le Guenno B. Rapid diagnosis of human Crimean-Congo hemorrhagic fever and detection of the virus in naturally infected ticks. *J Clin Microbiol*. 1987 May;25(5):922-4.
120. Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Jul;40(7):2323-30.
121. Wolk D, Mitchell S, Patel R. Principles of molecular microbiology testing methods. *Infect Dis Clin North Am*. 2001 Dec;15(4):1157-204.
122. Rys PN, Persing DH. Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol*. 1993;31(9):2356-60
123. Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ*. 2004;28(1-4):44-50.
124. 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
125. Burt FJ, Swanepoel R, Braack LE. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibody to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the sera of livestock and wild vertebrates. *Epidemiol Infect*. 1993 Dec;111(3):547-57.
126. 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

- Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *J Med Virol.* 2005 Feb;75(2):295-9.
- 127.** Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever serologically diagnosed by recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 May;10(3):489-91.
- 128.** Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody response in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis.* 1989 May-Jun;11 Suppl 4:S801-6.
- 129.** Shepherd AJ, Swanepoel R, Gill DE. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and reversed passive hemagglutination for detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antigen. *J Clin Microbiol.* 1988 Feb;26(2):347-53.
- 130.** 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.
- 131.** Ahmed AA, McFalls JM, Hoffmann C, Filone CM, Stewart SM, Paragas J, Khodjaev S, Shermukhamedova D, Schmaljohn CS, Doms RW, Bertolotti-Ciarlet A. Presence of broadly reactive and group-specific neutralizing epitopes on newly described isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol.* 2005 Dec;86(Pt 12):3327-36.
- 132.** Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2008 Apr;78(1):125-31. Epub 2007 Dec 3.
- 133.** Watts DM, Ussery MA, Nash D, Peters CJ. Inhibition of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro by ribavirin. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Nov;41(5):581-5.
- 134.** Cevik MA, Elaldi N, Akinci E, Ongürü P, Erbay A, Buzgan T, Uzun R, Kubar A, Bodur H. A preliminary study to evaluate the effect of intravenous ribavirin treatment on survival rates in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect.* 2008 Oct;57(4):350-1. Epub 2008 Aug 22.
- 135.** Jabbari A, Besharat S, Abbasi A, Moradi A, Kalavi K. Crimean-Congo hemorrhagic fever: case series from a medical center in Golestan province, Northeast of Iran (2004). *Indian J Med Sci.* 2006 Aug;60(8):327-9.
- 136.** <http://www.kirim-kongo.saglik.gov.tr/S2.pdf> son erişim: 19/02/2009

137. Mehmetoglu İ. Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı. Konya 2004. s: 359-363
138. Mardani Smego, Jr., Raymond A. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Prevention and Control Limitations in a Resource-Poor Country Clin Infect Dis. 2004 Jun 15;38(12):1731-5. Epub 2004 May 24.
139. Rahnavardi M, Rajaeinejad M, Pourmalek F, Mardani M, Holakouie-Naieni K, Dowlatshahi S. Knowledge and attitude toward Crimean-Congo haemorrhagic fever in occupationally at-risk Iranian healthcare workers. J Hosp Infect. 2008 May;69(1):77-85.
140. Lakhani A, Mahmood H, Laeeq A, Mansoor S, Lodhi S, Majid S, Kizilbash Q, Altaf A. Viral hemorrhagic fever in Pakistan: awareness among health care personnel. J Pak Med Assoc. 2002 May;52(5):214-7
141. Smego RA Jr, Sarwari AR, Siddiqui AR. Crimean-Congo hemorrhagic fever: prevention and control limitations in a resource-poor country. Clin Infect Dis. 2004 Jun 15;38(12):1731-5. Epub 2004 May 24.
142. Alavi-Naini R, Moghtaderi A, Koochpayeh HR, Sharifi-Mood B, Naderi M, Metanat M, Izadi M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeast of Iran. J Infect. 2006 May;52(5):378-82. Epub 2005 Sep 21.
143. 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.
144. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/cCHF.htm> son erişim: 19/02/2009
145. Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Arch Iran Med. 2007 Apr;10(2):204-14.
146. Tasdelen Fisgin N., Tanyel E., Tulek N. P1043 Risk factors among patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever. 17th ECCMID / 25th ICC, March 2007, Pages S280
147. 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.



- 148.** 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.
- 149.** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/en/> son erişim: 19/02/2009
- 150.** Ergonul O, Zeller H, Celikbas A, Dokuzoguz B. The lack of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibodies in healthcare workers in an endemic region. *Int J Infect Dis*. 2007 Jan;11(1):48-51.
- 151.** 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.