



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ'NÜN KENE
ve EVCİL RUMİNANT (SİĞİR, KOYUN VE KEÇİ) KAN ve
SÜTLERİNDE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba ÖZÜPAK

**Samsun
Şubat-2017**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ'NÜN KENE
ve EVCİL RUMİNANT (SIĞIR, KOYUN VE KEÇİ) KAN ve
SÜTLERİNDE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba ÖZÜPAK

DANIŞMAN
Doç. Dr. Harun ALBAYRAK

Samsun
Şubat-2017

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tuba ÖZÜPAK tarafından Doç. Dr. Harun ALBAYRAK Danışmanlığında hazırlanan “**Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü’nün Kene ve Evcil Ruminant (sığır, koyun ve keçi) Kan ve Sütlerinde Varlığının Araştırılması**” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 02/02/2017 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hakan BULUT, Fırat Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Harun ALBAYRAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / 02 /2017

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans eğitiminin boyunca ve tezimin hazırlanma sürecinde hoşgörü, destek, bilgi ve deneyimini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Harun ALBAYRAK'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA ve Prof. Dr. Zafer YAZICI'ya, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını eksik etmeyen Emre ÖZAN'a, tezimi yazma sürecinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Dr. Nevin ÖZDAMAR'a teşekkür ederim. Bugünlere gelmemi sağlayan ve uzmanlık eğitiminin boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan anne ve babama, lisans ve yüksek lisans eğitiminin her anında bilgisi ve çalışmalarıyla desteğini bir an olsun esirgemeyen eşim Veteriner Hekim Özkan ÖZÜPAK'a, hayatıma yeni dahil olan bebeğim Zeynep ÖZÜPAK'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.15.009 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ'NÜN KENE ve EVCİL RUMİNANT (SIĞIR, KOYUN VE KEÇİ) KAN ve SÜTLERİNDE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Amaç: Kırım-Kongo Kanamalı ateşi (KKKA) vektörlerle bulaşan önemli bir zoonotik hastalıktır. Türkiye’de 2002 yılında ilk defa Tokat ilinde hastalık bildirim yapılmıştır. Bu çalışmada; KKKA Hastalığının endemik olarak görüldüğü Tokat/Reşadiye’de bulunan ruminant türlerinden (sığır, koyun ve keçi) alınan kan, süt ve kene örneklerinde KKKA virüsünün varlığının/yaygınlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada, evcil ruminantlardan (sığır, koyun ve keçi) maksatlı örnekleme metodu ile üzerlerinde kene bulunan hayvanlardan kan serumu, tam kan ve süt örnekleri toplanmıştır. Reşadiye ilçesindeki 7 köyden 42 koyun, 64 keçi ve 65 sığır olmak üzere toplam 171 hayvandan örnektoplanmış. Sığırlardan hiç kene toplanılamamasına karşın, koyunlardan 221 kene, keçilerden ise 114 kene olmak üzere toplam 335 kene toplanılmıştır. Kene örneklerinden 78 kene havuz homojenizasyonu oluşturulmuştur. Toplanan kene, tam kan ve süt örneklerinden RT-PCR metodu ile viral nükleik asit varlığı araştırıldı. Kan serumu örnekleri KKKA antikorları yönünden ELISA ile test edilmiştir.

Bulgular: Tam kan ve süt örneklerinde KKKA RNA’sı tespit edilememesine karşın, 78 kene homojenizatının 10’unda (%12,8) KKKA RNA’sı tespit edilmiştir. Altmış beş sığır kan serumunun 25’inde (%38,5), 42 koyun kan serumunun 35’inde (%83,3) ve 64 keçi kan serumunun 53’ünde (%82,8) olmak üzere toplamda 171 kan serumunun 113’ünde (%66,1) KKKA antikorları tespit edilmiştir.

Sonuç: KKKA’nın küçük ruminantlarda (koyun ve keçi) sığırlara oranla daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Hayvanların kan ve sütlerinde virüs tespit edilememesi halk sağlığı açısından önemli bulunmuştur. Kene örneklerinde virüs RNA’sının tespit edilmesi, KKKA’nın hala bölgede evcil hayvanlarda endemik olarak seyrettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ELISA; Kene; Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü; Evcil Ruminant; Süt

**Tuba ÖZÜPAK, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Şubat-2017**

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF PRESENCE OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRÜS (CCHFV) IN TICK AND BLOOD AND MILK OF DOMESTIC RUMINANT SPECIES (CATTLE, SHEEP AND GOAT)

Aim: Crimean Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) is a important zoonotic disease transported by vectors. In 2002, the disease was declared first time in Tokat province of Turkey. The objective of this study was to investigate the presence/prevalence of CCHFV in tick and milk and blood samples of domestic ruminant species (cattle, sheep and goat) in Reşadiye town of Tokat province where CCHF disease were observed as endemic.

Material and Method: In this study, milk, serum and whole blood samples were purposively collected from domestic ruminants (cattle, sheep and goat) which are bearing ticks. The material consisted of 171 domestic ruminants, including 42 sheep, 64 goats and 65 cattle, from Reşadiye town. Although no tick was collected from cattle, a total of 335 ticks were collected from sheep (n:221) and goats (n:114). A total of 78 tick pools were formed from tick samples. The presence of viral nucleic acid was investigated from collected tick, whole blood and milk samples by rRT-PCR. The serum samples were tested for the presence of specific antibodies against CCHFV by commercial ELISA kit.

Results: Although no CCHFV RNA was found from whole blood and milk samples, it was detected in 10 of 78 (12.8%) tick pools. The CCHFV antibodies were present in 25 of 65 (38.5%), 35 of 42 (83.3%) and 53 of 64 (82.8%) cattle, sheep and goat, respectively. Out of 171 serum samples examined, 113 (66.1%) were positive for CCHFV.

Conclusion: It was revealed that prevalence of CCHFV was more common in small ruminants than cattle. It was important results in terms of public health that virus can not be detected. The detection of CCHFV RNA in tick samples shows that CCHFV is still endemic in domestic animals.

Keywords: Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus; Domestic Ruminant; ELISA; Milk; Tick

**Tuba ÖZÜPAK, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, February-2017**

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	: Alanin aminotransferaz
APTT	: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
AST	: Asparat aminotransferaz
BSL-4	: Biyogüvenlik düzeyi-4
CCHF	: Crimean congo haemorrhagic fever
CK	: Kreatinkinaz
IFA	: İmmunoflorasan antikor
INR	: International normalization ratio
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
KKAV	: Kırım kanamalı ateşi virüsü
KKKA	: Kırım kongo kanamalı ateşi
KKKAV	: Kırım kongo kanamalı ateşi virüsü
PBS-T	: Phosphate buffered saline- tween 20
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PT	: Pıhtılaşma zamanı
RT-PCR	: Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
rRT-PCR	: Real-time revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
SDB	: Serum dilüsyon buffer
SPDS	: Ön serum dilüsyon solüsyonu
TMB	: Tetramethylbenzidine

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kırım- Kongo Kanamalı Ateşi	2
2.1.1. Tanım.....	2
2.1.2. Tarihçe	2
2.1.3. Etiyoloji	2
2.1.4. Epidemiyoloji	4
2.1.5. Patogenez.....	10
2.1.6. Klinik Bulgular	10
2.1.7. Teşhis.....	11
2.1.8. Tedavi	12
2.1.9. Koruma ve Kontrol	13
2.2. Amaç	13
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. ELISA Kitleri ve Konjugatlar.....	14
3.1.2. RNA Ekstraksiyonu ve PCR Kitleri, Primerler ve Prob	14
3.1.1. Örneklenen İşletmeler	15
3.1.4. Tam Kan, Serum, Süt ve Kene Örnekleri.....	15
3.2. Metot.....	16
3.2.1. Tam Kan, Serum ve Süt Örneklerinin Hazırlanması	16
3.2.2. Kene Örneklerinin Hazırlanması	17
3.2.3. ELISA Testi	17
3.2.4. RNA Ekstraksiyonu	18
3.2.5. rRT PCR	19

4. BULGULAR	20
4.1. Serolojik Çalışma Sonuçları.....	20
4.2. Moleküler Çalışma Sonuçları.....	20
5. TARTIŞMA	23
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
KAYNAKLAR	29
EKLER	35
ÖZGEÇMİŞ	36



1.GİRİŞ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV) *Bunyaviridae* familyasındaki *Nairovirüs*cinsine aittir. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA); KKKAV ile enfekte *Ixodidae*ailesi içindeki kenelerin insanları enfeste etmesi, virüsü taşıyan çiftlik hayvanı yada KKKA hastalarının doku veya kanı ile temas sonucu bulaşmaktadır (Eliot ve ark., 2000; Whitehouse, 2004; Bente ve ark., 2013).Virüsün doğadaki keneler arasında yayılması transstadial ve transovarial yolla olmaktadır. Kene, konak siklusunu evcil ve yabani hayvanlarda tamamlamaktadır. Olgunlaşmamış keneler kirpi ve tavşanları konak olarak seçerken, yetişkin keneler yaban domuzu ve çiftlik hayvanları gibi büyük memelileri tercih etmektedir (Hoogstral, 1979). KKKA virüsü insanlarda ciddi hastalık tablolarınaneden olmasına karşın, çiftlik hayvanlarında herhangi bir klinik semptom oluşturmamaktadır (Causey ve ark., 1970; Chumakov, 1974; Yu-Chen ve ark., 1985; Ergönül, 2006). Endemik bölgelerde yapılan seroepidemiyolojik çalışmalar, çiftlik hayvanlarından özellikle sığır, koyun ve keçilerde seroprevalansın yüksek olduğu bildirilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Spengler ve ark., 2016).Hastalık ilk olarak 1940'lı yıllarda Rusya'nın Kırım bölgesinde bildirilmiş olup, günümüzde Afrika, Avrupa ve Asya gibi dünyanın birçok bölgesinde rapor edilmiştir (Chumakov, 1947; Ergunay ve ark., 2010). Türkiye'de hastalık ilk olarak 2002 yılında Tokat ilinde bildirilmiş olup, bunu takip eden her yıl rapor edilmiştir. Hastalık vakaları genelde kırsal kaynaklı ve kene öyküsüne bağlı olarak rapor edilmektedir (Gunes ve ark., 2009).

Bu çalışmada,KKKAH'nın endemik olarak görüldüğü bölgelerden biri olan Tokat ili Reşadiye ilçesinde bulunan sığır, koyun ve keçilerden alınan kan, süt ve kene örnekleri kullanılarakKKKAV'nin varlığının/yaygınlığının virolojik ve serolojik olarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi

2.1.1. Tanım

KKKA; kanamalı ateş sendromlarına neden olan virüslardan birinin oluşturduğu, zoonoz karakterli, ana bulaş kaynağı keneler olan, çiftlik hayvanlarında herhangi bir klinik semptomu neden olmamasına karşın, insanlarda % 5-30 oranında mortaliteye neden olan bir hastalıktır (Eliot ve ark., 2000; Whitehouse, 2004; Flick ve Whitehouse, 2005; Ergönül, 2006).

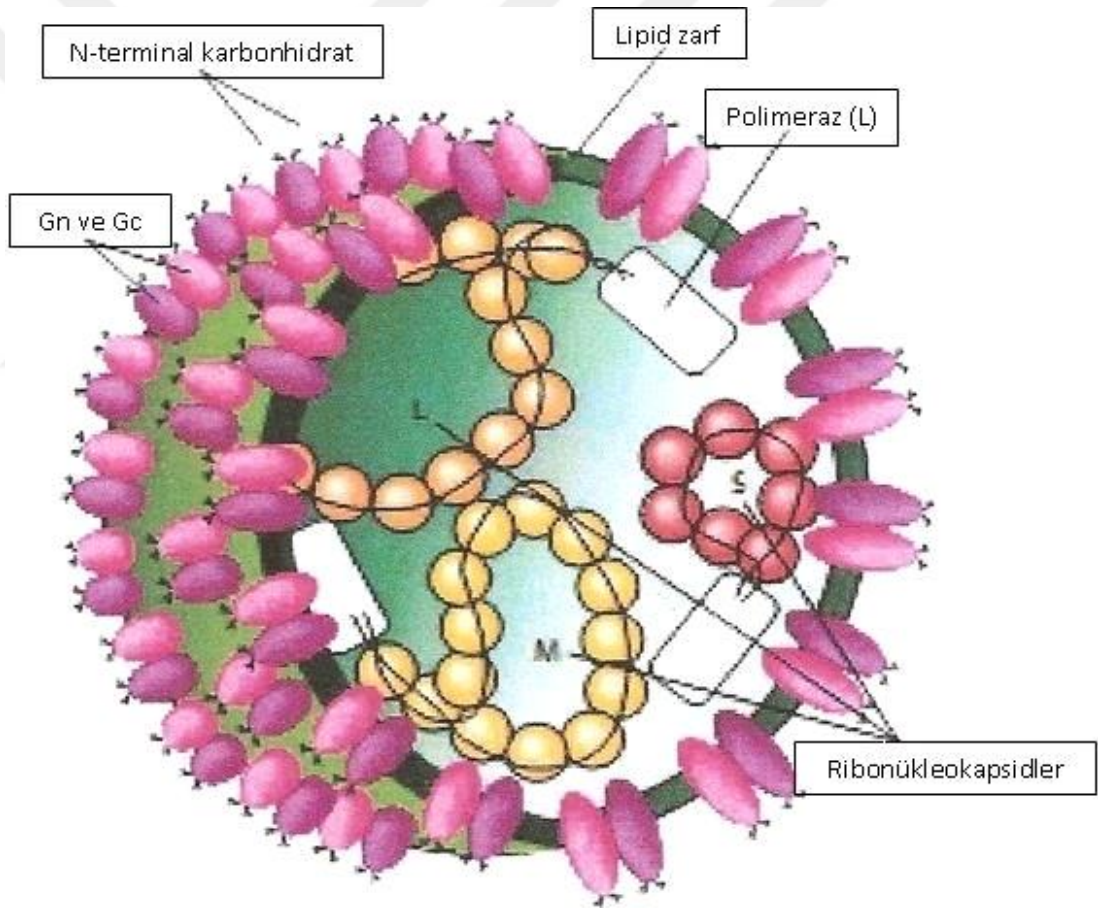
2.1.2. Tarihçe

Hastalığın ana belirtileri olan kusma, kanlı idrar ve kanamaları içeren klinik semptomlar günümüzden yüzyıllar önce 12. yüzyılda Tacikistan'da bildirilmiştir (Hoogstral, 1979). Hastalık Asya kıtasındaki farklı ülkelerde "Khungribta", "Karakhalak" ve "Khunymuny" adlarıyla isimlendirilmiştir. İlerleyen yüzyıllarda da Asya'da benzer semptomlarla insan vakaları bildirilmiştir (Ergönül, 2006; Whitehouse, 2004). Modern tıbbın gelişmesine paralel olarak hastalık ilk olarak 1944-1945 yıllarında Batı Kırım steplerinde çoğunlukla ürün toplamaya yardım eden Sovyet askerlerinden 200 kişinin etkilenmesiyle ortaya çıkmıştır (Chumakov, 1947). Kırım Kanamalı Ateş Virüsü (KKAV) 1967 yılında enfekte hastalardan alınan kanın farelere intraserebral inokülasyonu sonucunda izole edilmiştir (Butenko ve ark., 1968; Chumakov ve ark., 1968). KKAV, 1956 yılında Zaire'de ateşli bir hastadan izole edilen Kongo virüsü ile aynı virüs olduğu anlaşıldıktan sonra ismi KKKAV olarak değiştirilmiştir (Simpson ve ark., 1967; Chumakov ve ark., 1969; Gear ve ark., 1982; Whitehouse, 2004). KKKA hastalığı; Asya, Afrika, Güneydoğu Avrupa ve Orta Doğu'daki 30'dan fazla ülkede tanımlanmıştır (Whitehouse, 2004). Ülkemizde hastalık ilk kez 2002 yılının ilkbahar ve yaz aylarında özellikle, İç ve Doğu Anadolu bölgelerinin kuzeyi ile Karadeniz Bölgesi'nin güney kısımlarını kapsayan bölgelerde ortaya çıkmış olup 2003 yılında tanısı konulmuştur (Yılmaz ve ark., 2009).

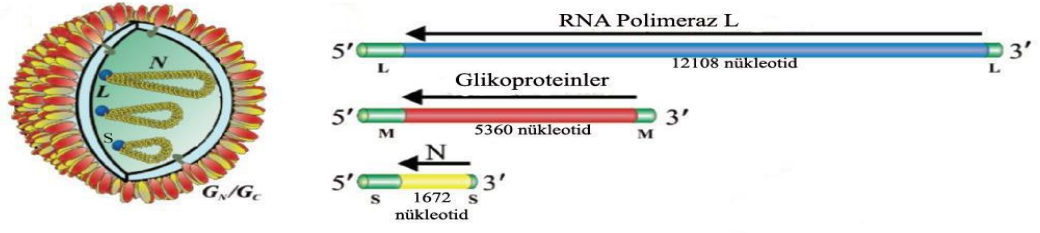
2.1.3. Etiyoloji

Hastalığa neden olan KKKA virüsü; *Bunyaviridae* ailesinden *Nairovirus* cinsine aittir. KKKAvirüsü 80-120 nm çapında olup, 5-7 nm kalınlığında çift lipid katlı zarfa

sahip RNA virüsüdür. Virüs, tek zincirli, helikal simetrik, sirküler görünümüne, negatif polariteli ve üç parçalı bir genoma sahiptir (Elliot ve ark.,2000; Schmaljohn ve Hooper, 2001). Bu üç parça large (L), medium (M) ve small (S) olarak isimlendirilmiştir (Şekil 1). Virüsün sahip olduğu segmentler dört adet yapısal protein kodlamaktadır(Nichol, 2001; Whitehouse, 2004). S segmenti 1673 nükleotid büyüklüğünde olup nükleokapsid proteini (NP) kodlamaktadır. M segmenti 5364 nükleotid büyüklüğünde olup zarf glikoproteinleri (Gn ve Gc) kodlar. L segmenti 12149 nükleotid büyüklüğünde olup RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRP) enzimini kodlamaktadır (Flick, 2007; Ozdarendeli ve ark.,2008; 2010) (Şekil 2)



Şekil 1.KKKA virüsünün şematik yapısı (Ergönül'den, 2006).



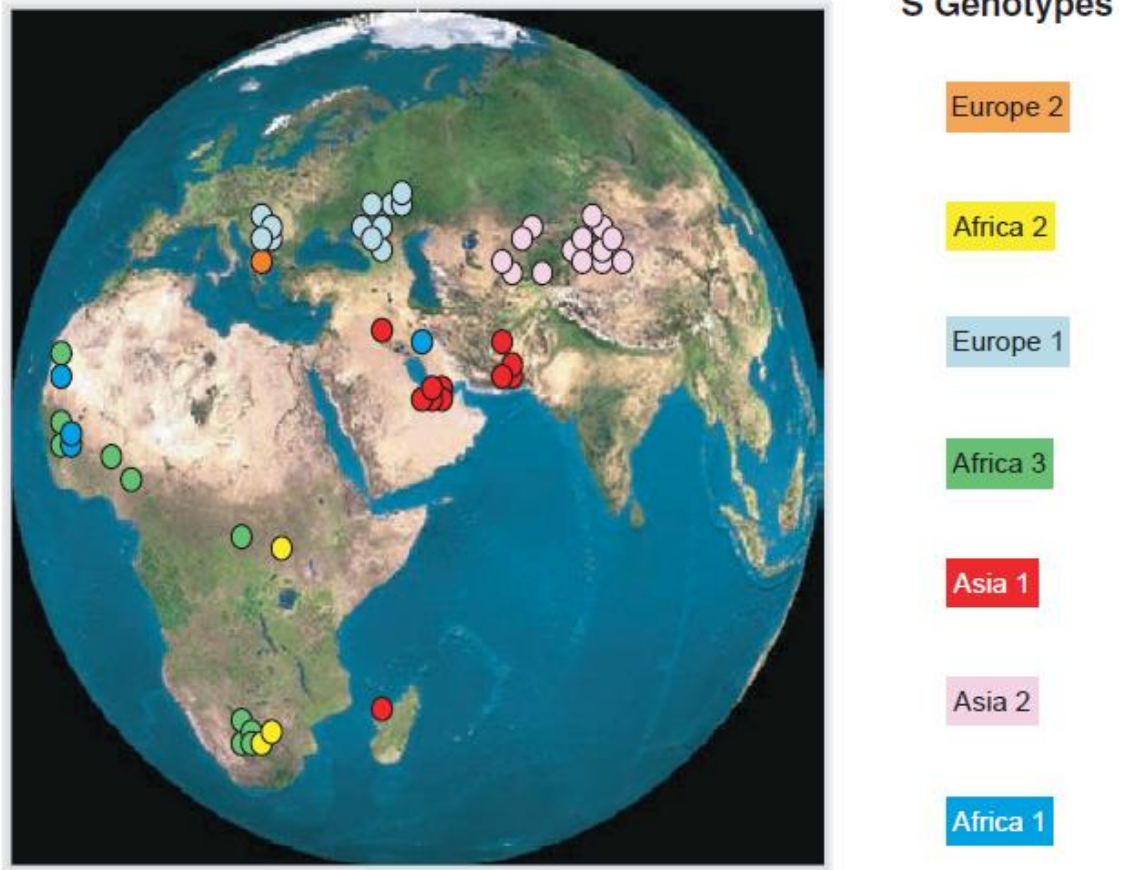
Şekil 2. KKKAV virüs kesiti ve segmentlerin şematik görünümü (Flick'den, 2007)

KKKAV çevre şartlarına karşı dayanıksız olup konakçı dışında kısa sürede inaktive olur. Virüs kanda 40⁰C'de 10 gün infektivitesini korumasına karşın, 56 ⁰C'de 30 dakikada inaktive olmaktadır. Dezenfektanlardan %1'lik hipoklorit ve %2'lik gluteraldehitvirüsün inaktive olmasını sağlamaktadır (Ergönül, 2006).

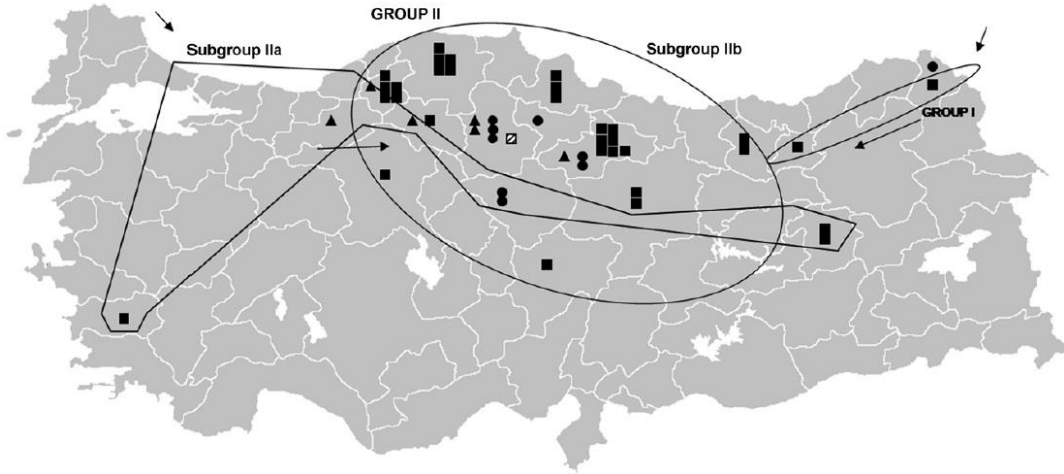
KKKAV virüsü, S segmentinin tam sekansına göre yedi ayrı gruba ayrılmıştır. Afrika ülkelerinden elde edilen izolatlar; Afrika 1, Afrika 2, Afrika 3 gruplarını, Orta Doğu'dan elde edilen izolatlar; Asia 1 grubunu, Özbekistan, Kazakistan, Tacikistan ve Çin'den elde edilen izolatlar; Asia 2 grubunu, Türkiye, Yunanistan, Rusya, Kosova, Bulgaristan ve Arnavutluk'tan elde edilen izolatlar; Avrupa 1 grubunu, Yunanistan'dan elde edilen AP 92 suşu Avrupa 2 grubunu oluşturmaktadır (Deyde ve ark., 2006; Hewson, 2007; Ozdarendeli ve ark., 2008; 2010) (Şekil 3). Özkaya ve ark. (2010) ve Kalaycıoğlu ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmalarda ise KKKAV virüsü S segmentine göre dört hat altında toplanmıştır. Türkiye virüsleri genel olarak Avrupa Hat I içinde yer almaktadır. Avrupa Hat I, iki gruba ayrılmıştır. Türkiye virüslerinin çoğu Grup II içinde bulunmaktadır. BYBRT51/08 ve ARTVN155/08 izolatları Grup I içinde yer almaktadır. CRM1/07 ve KMAG-Hu0701 izolatları ise Avrupa Hat II içinde bulunmaktadır (Şekil 4). KKKAV M ve L segmentine göre yapılan filogenetik ağaçta ise 5'er gruba ayrılmaktadır (Hewson, 2007) (Şekil 5).

2.1.4.Epidemiyoloji

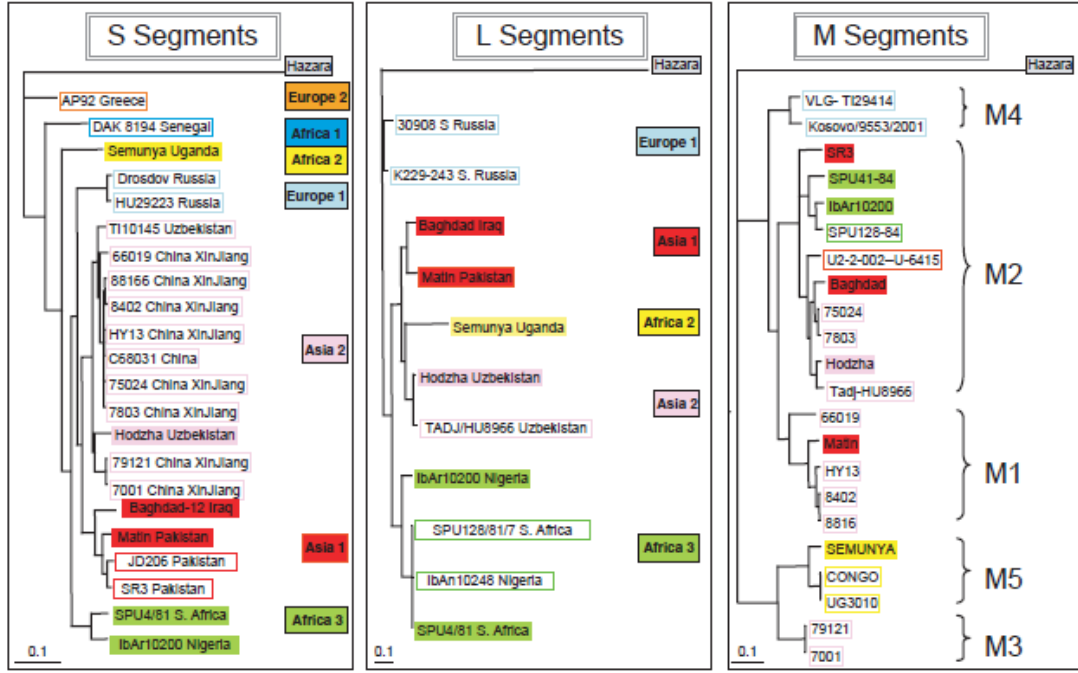
Günümüzde KKKAV, viral kanamalı ateşler içerisinde dünyada en yaygın olarak bilinen hastalık olup 30'dan fazla ülkede görülmektedir (Hoogstraal, 1979; Karti ve ark., 2004; Uyar ve ark., 2011). Olguların çoğu 1970'lerden önce Sovyetler Birliği (Astrahan, Kırım, Rostov, Özbekistan, Tacikistan, Kazakistan), Bulgaristan, Zaire ve Uganda'dan bildirilmiştir (Butenko ve Karganova, 2007; Avsic Zupanc, 2007; Burt ve ark.,2007).



Şekil 3. KKKAV genotiplerinin coğrafik dağılımı (Hewson'dan, 2007)

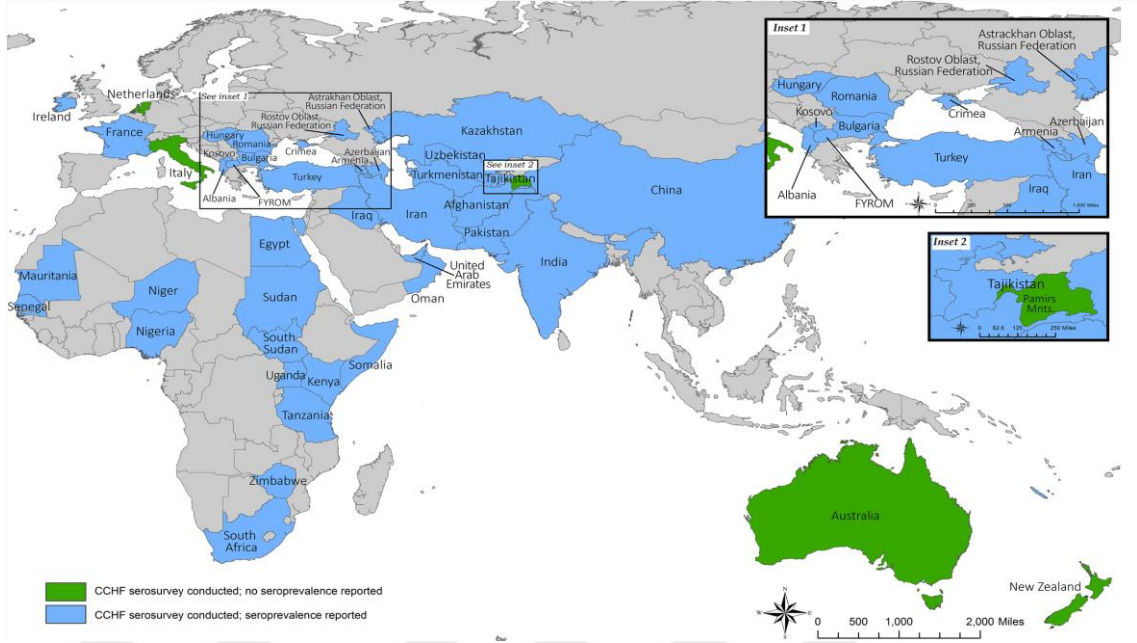


Şekil 4. Türkiye suşlarının filogenetik analiz sonuçlarına coğrafik dağılımı. Sırasıyla 2006, 2007 ve 2008 suşları ▲, ● ve ■ ile işaretlenmiştir. Çizgili gösterilen ise CRM1/07 suşudur (Ozkaya ve ark.'dan, 2010)



Şekil 5. KKKAV'larının segment sekanslarına göre coğrafik dağılımı (Hewson'dan, 2007)

1975-2000 yılları arasında Güney Afrika Cumhuriyeti, Moritanya, Tanzanya, Kongo, Burkina Faso, Senegal'den çalışmalar sunulmuş (Burt ve ark., 2007), Orta Doğu ülkelerinden Irak, Birleşik Arap Emirlikleri, Pakistan, Çin, Suudi Arabistan ve Umman Sultanlığı'ndan olgu bildirilmiştir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Saijo, 2007; Ergonul, 2012).2000 yılından sonra İran, Arnavutluk, Senegal, Pakistan, Yugoslavya, Moritanya, Kenya, Yunanistan, Bulgaristan ve Türkiye'de salgınlar bildirilmiştir (Avsic Zupanc, 2007; Burt ve ark., 2007; Chinikar, 2007; Vatansver ve ark., 2007; Ergonul, 2012). Mısır, Hindistan, Macaristan, Fransa, Portekiz ve Benin'de serolojik olarak görülmüşse de olgu olarak rapor edilmemiştir (Whitehouse, 2004; Ergönül, 2006; 2012) (Şekil 6).



Şekil 6. Kırım Kongo Kanamalı Ateşinin coğrafik olarak dağılımı (Spengler ve ark.,'dan, 2016)

Türkiye’de ilk olgu 2002 yılında Kelkit Vadisi’nde yer alan Tokat ilinde görülmüştür. 2002 yılından sonra hastalık her yıl rapor edilmiştir. Vakaların büyük çoğunluğu (%95) İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi'nin kuzeyinden, özellikle Tokat, Çorum, Sivas ve Erzurum’da görülmektedir (Şekil 7). Olguların çoğunluğu mart-ekim ayları arasında ve özellikle haziran-temmuz aylarında, kenelerin yoğun olarak aktif olduğu aylarda tespit edilmektedir (Karti ve ark., 2004; Uyar ve Çarhan, 2009; Yılmaz ve ark., 2009).



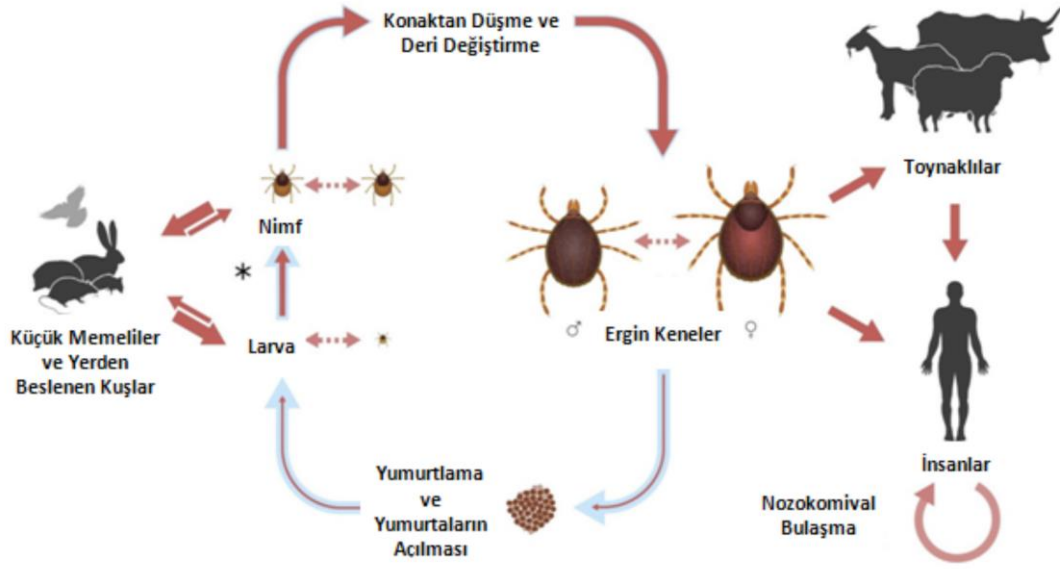
Şekil 7. KKKA olgularının yoğun olarak görüldüğü Kelkit Vadisi (Yılmaz ve ark.'dan, 2008)

KKKA'nın insanlara bulaşması ya infekte kenelerin enfestasyonu yada viremik dönemdeki hayvanlara ait enfekte doku veya kan ile bulaşma olmakla birlikte, akut hastalık dönemindeki hastaların kan ve enfektesekresyonları ile mukozal veya bütünlüğü bozulmuş deri teması ile de bulaşma mümkündür (Turell, 2007; Bente ve ark., 2013; Mertens ve ark., 2013). Hastalarda kullanılan medikal malzemelerin yetersiz sterilizasyonu hastalığın bulaşmasında rol oynamaktadır. Pişmiş et veya gıdalarla bulaşmaya dair bir veri bildirilmemiştir. Hastalığın hava yoluyla bulaştığına dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır. Anneden bebeğe hastalığın geçtiği bildirilmiştir. Ayrıca kene ısırın insanların hepsinde hastalık şekillenmemektedir (Whitehouse 2004; Ergönül, 2006; Bente ve ark., 2013; Mertens ve ark., 2013).

Hastalık açısından, tarım ve hayvancılıkla uğraşanlar, veteriner hekimler, hasta hayvanlarla teması olanlar, hastalığın görüldüğü bölgelerde görev yapan sağlık personelleri ile kamp yapanlar, deri fabrikası işçileri, mezbaşa çalışanları ve kasaplar yüksek risk altındadır (Whitehouse 2004; Ergönül, 2006; Bente ve ark., 2013; Mertens ve ark., 2013). Aktif olarak çalışan yaş gruplarında hastalık daha sık görülürken, kadınların tarımda daha fazla çalıştığı ülkelerde kadınlarda erkeklerden daha fazla görülmektedir (Van Eeden ve ark., 1985; Seçmeer ve Çelik, 2010).

Günümüze kadar KKKA virüsü, 31 kene türü ve bir sinekten (*Culicoides* spp.) izole edilmiş olup, özellikle *Ixodidae* türlerinden *Hyalomma marginatum* tarafından taşındığı rapor edilmiştir (Shepher ve ark., 1991; Durden ve ark., 1993; Gordon ve ark., 1993). *Ixodidae* türleri, gelişme dönmelerine, beslenme ve kan emme durumlarına göre 0,5-3 cm büyüklüğünde olup, vücudunun ön kısmı kan emmeye elverişli, 5 parçalı, ağız organelleri ve bunu takip eden tek parçalı gövdeden oluşmaktadır. Integument adı verilen yüzey örtüsü kitin içerir. Bu kitin tabakası erkeklerde sırt kısmında yoğun plaka iken, diğer gelişme şekilleri olan larva, nimf ve dişilerde sadece ağız organellerinin gerisinde yaka şeklinde yer alır. Bu özellik bakımından erkek ve dişi keneler birbirinden ayrılabilir (Karaer, 2006). Virüs kenelere transstadial ve transovarial olarak bulaşabilmektedir. Ergin olmayan *Hyalomma* cinsine ait keneler kirpi ve tavşan gibi küçük omurgalılarından kan emerken virüsü almakla birlikte yetişkin keneler yaban domuzu ve çiftlik hayvanları gibi büyük omurgalılarından kan emerek virüsü alır (Durdun ve ark., 1993; Albayrak ve ark., 2012). Sığır, koyun, keçi, at, eşek gibi evcil hayvanların serumlarında da antikorlar gösterilmiştir. Ancak virüs hayvanlarda klinik bir hastalığa

yol açmamaktadır. Virüsün yerden beslenen kuşlarda viremi yaptığı gösterilememiş ancak vektör keneler bu kuşlar üzerinde özellikle de karga ve kekliklerde gösterilmiştir (Shepher ve ark., 1991; Durden ve ark., 1993; Gordon ve ark., 1993) (Şekil 8).



Şekil 8. *Hyalomma* cinsi keneler tarafından KKKA virüsünün bulaşma döngüsü (Bente ve ark., 2013'den uyarlanmıştır).

KKKA virüsünün ana taşıyıcısı olan *Hyalomma marginatum* yaban hayatı ile çok yakından ilişkili olup, bozkır ikliminin diğer iklim kuşakları ile kesiştikleri bölgelerde özellikle de kuru taban örtüsüne sahip bodur ormanlık alanlarda yayılım göstermektedir (Shepher ve ark., 1991; Durden ve ark., 1993; Gordon ve ark., 1993). *Hyalomma marginatum* iki konutlu bir yaşam döngüsüne sahiptir. Larva ve nimf evreleri beslenmek için küçük yabani hayvanlar ile yerden beslenen kuşları tercih etmektedir. Larvadan nimfe dönüşme konak üzerinde gerçekleşmektedir. Bu hayvanlardan 14-26 gün boyunca kan emerek doymuş nimf halinde yere düşerler. Yaz sonu/sonbahara denk gelen bu safhada keneler ya doymuş nimf olarak, yada 4-20 gün içinde gömlek değiştirerek açerişkin (erkek-dişi) haline geldikten sonra kışı geçirebilecekleri uygun bir korunağa (Taş altları, ot balyaları vs.) girerler. Kışı doymuş nimf yada aç erişkin olarak inaktif halde geçiren keneler, havaların ısınmasıyla tekrar aktif hale gelir ve biyolojik döngülerine devam ederler. Erişkin keneler uygun bir korunağın altında etraflarından kan emebilecekleri büyük bir konağın (domuz, sığır, koyun, at vs.) geçmesini beklerler. Hayvanların yaydığı ısı, koku ve titreşimler, kenenin

konağı hissetmesini ve ona doğru yönelmesini sağlar. Uygun konağa tutunan keneler 9-14 gün boyunca kan emer ve bu sırada çiftleşirler. Çiftleşmeyi takiben erkek keneler ölür. Doyan dişi keneler toprağa düşer ve kendilerine yumurtlamaya uygun bir yer olarak ortalama 7000 yumurta bırakıp ölürlür (Shepher ve ark., 1991; Gordon ve ark., 1993; Durden ve ark., 1993; Karaer, 2006). KKKA virüsünü bulaştıran *Hyalomma* soyuna ait kenelerin nisan-ekim aylarında aktif oldukları, ikinci pik aktivite zamanının ise kasım ayı olduğu bildirilmiştir (Schmaljohn ve Hooper, 2001; Turell, 2007).

2.1.5. Patogenez

Hastalığın patogenezisi tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak virüsündirekt ya da dolaylı olarak kapillarendoteli hedef alarak mononükleer hücrelerin aktivasyonunu sağladığı ve bazı sitokin ve kemokinlerin salınımını uyardığı bildirilmiştir (Bray, 2007; Ergonul, 2007; Bente ve ark., 2013).

Bu kemokinlerendotelyumu hedef alarak harabiyet meydana getirmektedir. Endotel hücrelerdeki virüs varlığında tubuloretiküler cisimciklerinin saptanması kapillar damarlardaki fonksiyon bozukluğuna yol açar ve bu durum klinik ve patolojik değişikliklerle sonuçlanır. Kapillar geçirgenlikteki artış ve pıhtılaşma fonksiyonlarındaki bozukluklar kanamaya sebebiyet verir (Bray, 2007; Ergonul, 2007; Bente ve ark., 2013).

2.1.6. Klinik Bulgular

Hastalık hayvanlarda insanlara göre daha yaygın olmakla birlikte asemptomatik ve subklinik seyretmektedir (Woodall ve ark., 1965; Causey ve ark., 1970; Albayrak ve ark., 2012). KKKA virüsü insanlarda belirtisiz infeksiyondan şiddetli kanamalı ateşe ve ölüme kadar değişiklik gösteren hastalık tablosu oluşturmaktadır. Hastalık klinik seyrine göre 4 döneme ayrılmaktadır (Whitehouse, 2004; Ergönül, 2006).

İnkubasyon Dönemi:Hastalık etkeninin insanlarda ortaya çıkışı; virüsün giriş yoluna, alınan virüs miktarına ve konağın immunitesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu süre kene ısırmasından sonra yaklaşık 2-14 gün arasında değişmekle birlikte genellikle 1-3 gündür (James ve Gear, 1982; Gürbüz ve ark., 2009; Midilli ve ark., 2009; Gönen, 2011; Işıkkay, 2013).

Prehemorajik Dönem: Ani yüksek ateş, kas ağrısı, baş ağrısı ve baş dönmesi ile karakterizedir. Ateş ortalama 4-5 gün sürer. Bu dönemde ishal, bulantı, kusma, boyun, yüz ve göğüste hiperemive konjunktivitis görülmektedir (James ve Gear, 1982; Gürbüz ve ark., 2009; Midilli ve ark., 2009; Gönen, 2011; Işıkay, 2013).

Hemorajik Dönem: Kanama bulguları mukoza ve ciltte peteşilerden geniş hematomlara kadar değişiklik göstermektedir. Kanama beyin, vagina ve dış etinde görülebilir. En sık kanayan bölgeler gastrointestinal sistem ve solunum sistemidir (James ve Gear, 1982; Gürbüz ve ark., 2009; Midilli ve ark., 2009; Gönen, 2011).

Konvalesan Dönem: Bu dönemde taşikardi, hafıza kaybı, görme ve işitme kaybı, nefes almada güçlük gibi birçok sistemi etkileyen bulgular görülebilir. Ölüm genellikle hastalığın 2. haftasında görülebilmekte ve bu oran % 8-80 arasındadır (James ve Gear, 1982; Gürbüz ve ark., 2009; Midilli ve ark., 2009; Gönen, 2011).

2.1.7. Teşhis

Erken teşhis; hastalığın tedavisi açısından ve sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların önlenmesinde önem taşır. Ayırıcı teşhiste benzer semptomları taşıyan enfeksiyöz hastalıklardan ayırımı gereklidir (Zeller, 2007).

Laboratuvar teşhisi: Kan örneklerinden virüs ve virüse karşı oluşan antikorların varlığına bakılarak yapılmaktadır. KKKA hastalığının seyrinde şekillenebilecek laboratuvar değişiklikleri; lökopeni, anemi, trombositopeni, Aspartat amino transferaz (AST) ve Alanin amino transferaz (ALT) düzeylerinde artış, pıhtılaşma zamanında (PT), aktive parsiyeltromboplastin zamanı (aPTT) ve uluslararası normal oran (INR) süresinde uzama, fibrin yıkım ürünlerinde artma ve fibrinojende azalma görülmektedir. Ayrıca kas tutulmalarına bağlı olarak keratinkinaz (CK) ve AST yükselmektedir. Oral alım bozukluğu ve renal tutulmalara bağlı proteinüri, oligüri, azotemi ve hematüri gözlemlenmektedir (James ve Gear, 1982; Gürbüz ve ark., 2009; Midilli ve ark., 2009; Gönen, 2011; Uyar ve ark., 2011).

Virüs izolasyonu: KKKA virüsü; virüs izolasyonu, biyogüvenlik düzeyi- 4 (BSL-4) laboratuvarlarında yapılmak zorundadır (Whitehouse,2004; Mourya ve ark., 2012). Hücre kültüründen virüs izolasyonu basit ve hızlı olmasına rağmen bu yöntemin duyarlılığı yeni doğan farelere homojenize olmuş kenelerin veya akut hastaların kanının intrakraniyal ve intraperitoneal inokulasyonundan daha düşük olduğu bildirilmiştir (Whitehouse, 2004; Uyar ve ark., 2011; Mourya ve ark., 2012).

Serolojik Testler: IgG ve IgM antikorları, hastalığın başlamasından yaklaşık 7 gün sonra Enzyme linked immuno assay (ELISA) ve immunoflorasan antikor (IFA) teknikleri ile belirlenebilmektedir. IgM düzeyi hastalıktan yaklaşık 4 ay sonra belirlenemezken, IgG düzeyi hastalıktan en az 5 yıl sonra dahi belirlenebilmektedir (Bakir ve ark., 2005; Uyar ve ark., 2011; Albayrak ve ark., 2012; Hasan, 2012).

Ülkemizde 2008 yılında yapılan bir çalışmada KKKA virüsü taşıyan hastaların laboratuvar teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve IgM ELISA kullanılmıştır. Hastalarda semptomların başlamasını takiben ilk 5 gün içinde % 83,4 oranında PCR pozitif bulundu. Ancak semptomların başlamasını takiben 6-10 gün içerisinde bu oran % 67,5 olarak belirlendi. Semptomları takiben 5 gün sonra PCR pozitiflik azalırken KKKA virüsü -IgM oranı % 95 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda hastalığın teşhisinde; semptomların başlamasını takiben ilk 5 gün içinde pozitiflik PCR ile daha yüksek oranda belirlenirken, 5 gün sonrasında ise ELISA-IgM ile daha yüksek oranda belirlendiği rapor edilmiştir (Uyar ve ark., 2011).

ELISA testi genellikle daha az spesifik olup, IFA ve nötralizasyon testine göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Uyar ve ark., 2011).

Moleküler Teşhis Yöntemleri: Bu teşhis yönteminde rRT PCR kullanılmaktadır. Bu metot ile kenelerden ve klinik örneklerden virüsün genetik yapısı ortaya konulmaktadır. rRT-PCR yöntemi; kanda virüs yükünü gösterebilmesi ve virüsün nükleik asit yapısını saptaması nedeniyle daha kullanışlıdır. rRT PCR tekniği ile hastalığın 16. gününe kadar viral RNA, serum örneklerinde saptanmaktadır (Whitehouse, 2004; Zeller, 2007; Ozkaya ve ark., 2010; Albayrak ve ark., 2012).

2.1.8. Tedavi

KKKA hastalığının spesifik bir tedavisi bulunmamaktadır. KKKA kendiliğinden iyileşen bir özelliğe sahip olup, orta ve ağır seyreden hastalarda tedavi gerekebilir. Tedavinin temelini, trombosit süspansiyonu, taze donmuş plazma ve eritrosit süspansiyonu gibi kan ürünleri ile destek tedavisi oluşturmaktadır (Mirazimi, 2007; Mirazimi ve ark., 2010).

Hastalığın tedavisinde kullanılabilecek uygun antiviral ajan olmamasına rağmen, ribavirin'in KKKA virüslerine invitro etkili olduğunun gösterilmesi ve fare deneylerinde viremiyi azalttığına gösterilmesi üzerine tartışmalı da olsa hem profleksidehemde tedavide kullanıldığı bildirilmiştir (Ergonul, 2008; Işıkkay, 2013).

Ribavirin'in özellikle hastalığın erken dönemlerinde etkili olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (Fisher ve ark., 1995; Ergönül ve ark., 2004; Yapıcı ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada aşı sonrası sağlıklı donörlerden elde edilen immunglobülinlerin tedavide kullanıldığı ve başarılı sonuçlar elde edildiği, intravenöz immunglobulin uygulamalarının durumu ciddi olan hastalarda etkili olduğu bildirilmiştir (Öngürü ve Bodur, 2012).

2.1.9. Koruma ve Kontrol

Hastalıktan korunmada en etkili yöntem hastalığı bulaştıran kenelerle mücadele etmektir. Ayrıca endemik bölgelerde bulunan kişilerin hastalık yönünden bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Akut hastalık sürecinde hastanın vücut sekresyonu ve kanı ile bulaşma riski olduğu için, ilgili sağlık personelinin gerekli koruyucu önlemleri alması gerekmektedir. Vücuda yapışmış olan kenelerin uygun bir şekilde alınıp, öldürülmesi hakkında insanların bilinçlendirilmesi sağlanmalıdır. Kenelerin yaşaması için elverişli olan ortamlarda, diğer canlılara zarar vermeden insektisit uygulamalarına başvurulabilir (Ser ve Çetin, 2016).

2.2 Amaç

Bu çalışmanın amacı KKKK hastalığının endemik olarak görüldüğü bölgelerden olan Tokat/Reşadiye'de bulunan sığır, koyun ve keçilerden alınan kan, süt ve kene örneklerinde KKKAV'nin varlığının/yaygınlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile evcil ruminantların virüsün sirkülasyonundaki rolünün ortaya konulması hedeflenmektedir. Ayrıca, bu hayvanlardan elde edilen sütün, KKKAV'si yönünden halk sağlığı açısından bir tehdit oluşturup oluşturmadığı yönünde bilgi üretilmeside hedeflenmektedir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

“Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü’nün Kene ve Evcil Ruminant (Sığır, Koyun ve Keçi) Kan ve Sütlerinde Varlığının Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tez konusu T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu’nun 25.02.2015 tarih ve 36 sayılı izni ile yürütülmüştür.

3.1.1. ELISA Kitleri ve Konjugatlar

Ticari olarak temin edilen Vector Best, D-5052, VectoCrimean-CHF-IgG (Vectorbest, Novosibirsk, Rusya) kiti küçük modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. Test sisteminin konjugatı (anti-human IgG peroksidaz) sığır, koyun ve keçi konjugatları (rabbit anti-cow IgG peroksidaz; rabbit anti-sheep IgG peroksidaz ve rabbit anti-goat IgG peroksidaz) ile değiştirildi. Kullanılan konjugat ticari bir firmadan (ID.Vet, Grabels, Fransa) çoklu tür konjugat olarak temin edildi.

3.1.2. RNA Ekstraksiyonu ve rRT PCR Kitleri, Primerler ve Prob

RNA ekstraksiyonu ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Qiagen, RNeasy Mini kit, Cat No: 74106, Hilden, Almanya) kullanıldı. Yine çalışmalarda ticari olarak temin edilen tek aşamalı PCR kiti (Rotor-Gene Probe RT-PCR kit, Cat No: 204574, Qiagen, Hilden Almanya), primerler ve prob kullanıldı. rRT-PCR metodu için kullanılan primerler ve probun orjinleri ile lokalizasyonları ile ilgili bilgiler Tablo 1’de sunuldu. Amplifikasyonlarda, S segmentine özgül primerler ve prob kullanıldı. Testte pozitif referans ve konsantrasyonu ortaya koymak için virüsün tüm S segmentini içeren plazmid (pGEM-T Easy vektör, Promega, ABD) ve negatif kontrol olarakta distile su kullanıldı.

Tablo 1. Primer ve probların dizini ve lokalizasyon bölgeleri (Özan’dan, 2017)

Primer ve Prob Adı	Dizin 5’-3’	Lokalizasyon Bölgesi S segmentinde (bp)
F1	5’GCTGAGCTGAAGGTTGATGTTTC 3’	386-407
R2	5’ ATGCCTTCCTCCACTTGAGA 3’	445-465
P2	FAM-5’GAACAACCTTGCCAATTACCAACAGGC-3’ TAMRA	415-441

3.1.3. Örneklenen İşletmeler

Bu çalışmada Tokat iline bağlı Reşadiye ilçesinde bulunan ve Sağlık Bakanlığı verilerine göre önceki yıllarda insanlarda KKKA vakaları bildirilen 7 köyde (Nebişeyh, Yuvacık, Akdoğan, İbrahimşeyh, Keçiköy, Uluköy ve Hasanşeyh) bulunan koyun, keçi ve sığır işletmelerinden tam kan, serum ve süt örnekleri toplandı (Şekil 9). Koyun ve keçilerden kene örnekleri de toplanılmasına karşın, yoğun kimyasal mücadele nedeniyle sığır işletmelerinde kene tespit edilemediğinden dolayı örnekleme yapılamadı.

3.1.4. Tam Kan, Serum, Süt ve Kene Örnekleri

Serolojik ve virolojik testler için, Reşadiye ilçesindeki 7 köyde bulunan 42 koyun, 64 keçi ve 65 sığır olmak üzere toplam 171 hayvandan antikoagulanlı (EDTA) tüplere tam kan, silikonlu tüplere serum ve 12 ml hacimli falkon tüplere de süt örnekleri toplandı (Tablo 2). Yoğun kimyasal ilaç mücadelesi nedeniyle sığır işletmelerinde bulunan hayvanlardan kene toplanılamamasına karşın, 42 koyundan 221 kene, 36 keçiden ise 114 kene olmak üzere toplamda 106 koyun ve keçinin 78'inden 335 kene toplandı. Toplanan kenelerin tür ve hayvanlara göre dağılımı Tablo 3'de sunuldu.



Şekil 9. Reşadiye İlçesinin köylerinin coğrafik dağılımı

Tablo 2. Toplanan numunelerin köylere göre dağılımı (()* kene toplanan hayvan sayısını ifade eder)

	KOYUN	KEÇİ	SİĞİR
NEBİŞEYH	22 (22)*	—	—
YUVACIK	—	32(11)*	—
AKDOĞMUŞ	—	32(25)*	—
İBRAHİMŞEYH	20 (20)*	—	—
KEÇİKÖY	—	—	16
ULUKÖY	—	—	5
HASANŞEYH	—	—	44
TOPLAM	42 (42)*	64(36)*	65
GENEL TOPLAM: 171 hayvan (78'inin üzerinden kene toplandı)			

Tablo 3.Hayvan türlerine göre kenelerin dağılımı

Kene Türü	Koyun	Keçi	Toplam
<i>Dermacentor marginatus</i>	28	14	42
<i>Hyalomma detritum</i>	63	34	97
<i>Hyalomma marginatum</i>	82	40	122
<i>Rhipicephalus bursa</i>	48	26	74
Toplam	221	114	335

3.2. Metot

3.2.1. Tam Kan,Serum ve Süt Örneklerinin Hazırlanması

Antikoagulan madde içeren (ethylenediaminetetraacetic acid) tüplere alınan defibrine kan örneği 1500 devirde (rpm) 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Stok tüplere aktarılan plazma sıvıları, test edilinceye kadar -20⁰C'de saklandı. Aynı şekilde silikonlu tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra 10 dakika 1500 devirde (rpm) santrifüj edilerek serumlar ayırt edildi. Stok tüplere aktarılan serumlar, test edilinceye kadar -20⁰C'de saklandı. Soğuk zincirde laboratuvara getirilen süt örnekleri 2 ml hacimli tüplere porsiyonlanarak test yapıncaya kadar -20⁰C'ye kaldırıldı.

3.2.2. Kene Örneklerinin Hazırlanması

Soğuk zincir altındalaboratuvara getirilen kene örnekleri, kene anahtarına göre tür ve cinsiyet ayrımı yapıldı. Tür ayrımını takiben, aynı hayvan üzerinden toplanan tüm keneler (1-13 arasında)MagNa Lyser cihazının yeşil boncuklar içeren 2ml hacimli ve içerisinde steril PBSbulunan tüplere yerleştirildi. MagNa Lyser cihazı aracılığıyla 3 dakika7000 devirde (rpm)homojenize edildi. Elde edilen homojenizatlar 10 dakika4400 devirde (rpm)santrifüj edildi. Süpernatantlar, biyogüvenlik kabini içerisinde steril 2 ml hacimli mikro tüplere aktarıldı. Örnekler analiz yapıncaya kadar -80⁰C' de saklandı.

3.2.3. ELISA Testi

Testler, yapılan küçük değişikliklerle birlikte üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.Özetle, ticari bir firmadan temin edilen insan antikor kitinin Vector Best, D-5052, VectoCrimean-CHF-IgG (Vectorbest, Novosibirsk, Rusya)hayvan antikorlarına validasyonu yapıldı. Test sisteminin konjugatı (anti-human IgG peroksidaz) sığır, koyun ve keçi konjugatları (rabbit anti-cow IgG peroksidaz, rabbitanti-sheep IgG peroksidaz ve rabbitanti-goat IgG peroksidaz) ile değiştirildi. Kullanılan konjugat ticari bir firmadan (IDvet, Grabels, Fransa) çoklu tür konjugat olarak temin edildi.Serum örnekleri ve antikor test kiti reaktifleri kullanılmadan önce oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra kısa bir vorteks yapıldı. Test edilecek serum örnekleri için yapılan işlemler pozitif/negatif kontrol olarak kullanılan serumlara için de uygulandı. Serum örnekleri yardımcı bir 96 kuyucuklu mikrotitrasyon pleytinde 10 katlı olarak ön serum dilisyon solüsyonu (SPSD) ile sulandırıldı. Yardımcı pleyt gözlerine 90 µl SPSD konuldu ve üzerine 10 µl serum örneği eklenerek pipete edildi. Pipetasyon sonrası SPSD'nin kıpkırmızı rengi, sarıya dönüştü. Yardımcı pleytte sulandırılan serum örnekleri, 10 katlı olarak serum dilüsyon buffer (SDB) ile tekrar sulandırıldı. Testin yapılacağı pleyte 90 µl SDB konuldu ve üzerine 10 µl yardımcı pleyteki serum örneklerinden konuldu. Böylece serum örnekleri 100 kat sulandırılmış oldu. Pleytin üzeri yapışkan bir film ile kapatılarak, orbital çalkalayıcıda 37 ⁰C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı.Yıkama solüsyonu, konsantre PBS-T'nin distile su ile 25 kat sulandırılmasıyla elde edildi. İnkubasyon sonrası yapışkan film çıkarıldıktan sonra pleytler ELISA yıkayıcı yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkandı. Çoklu tür konjugat, 50 katlı olarak sulandırılmış yıkama solüsyonu ile sulandırıldı.Sulandırılmış çoklu tür konjugat tüm gözlere 100 µl konuldu. Pleytin üzeri yapışkan film ile

kapatılarak, orbital çalkalayıcıda 37 °C'de 30 dakika inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası yapışkan film çıkarıldıktan sonra pleytler ELISA yıkayıcı ile yıkama solüsyonu kullanılarak tekrar 5 kez yıkandı. Yıkama sonrası, tüm gözlere 100 µl tetramethylbenzidine (TMB) solüsyonu konuldu. Oda sıcaklığında (18-25°C'de) 10 dakika karanlıkta bekletildi. Süre sonunda üzerine 100 µl stop solüsyonu konuldu. ELISA okuyucuda, ana filtre 450 nm ve referans filtre 650 nm seçilerek okuma yapıldı.

Test geçerliliği için, negatif kontrollerin ortalaması 0,250 optik dansite (OD) değerini aşmaması, pozitif kontrollerin ortalaması ise 1,000 OD değerinden daha yüksek olması istenilmektedir. Yapılan testlerde kullanılan kontroller bahsedilen şartlara uygun olarak tespit edildi. Serum örneklerinin değerlendirilmesi, Schuster ve ark.'nın (2016) uyguladığı şekilde yapıldı. Serum örnekleri, 0,500 OD değerine eşit ve altında ise negatif, 0,600-0,700 OD değerleri arasında ise şüpheli ve 0,800 değerinin üzerinde ise pozitif kabul edildi.

3.2.4. RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Qiagen, RNeasy Mini kit, Cat No: 74106, Hilden, Almanya) ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı. Özetle; çalışmaya başlamadan önce kit reaktifleri 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Steril mikro tüp içerisine 400 µl virüs şüpheli materyal (plazma, süt ve kene homojenizatı süpernatantı) konuldu. Bunun üzerine 600 µl (hacminin %1 oranında beta merkaptotanol-β-ME içeren) RLT buffer konuldu. Örnek vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Üzerine 600 µl %70'lik etanol ilave edildi ve pipetasyon ile karışması sağlandı. Karışımın 700 µl'si 2 ml hacimli toplama tüpü içerisine yerleştirilen RNeasy spin kolonuna transfer edildi ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atılarak aynı işlem kalan karışım bitene kadar tekrarlandı. Bu işlemler sonunda spin kolonun yer aldığı toplama tüpü değiştirildi ve spin kolona 700 µl RW1 buffer konularak 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü tekrar değiştirilerek spin kolonu 500 µl RPE buffer konuldu ve tekrar 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü değiştirildikten sonra spin kolona tekrar 500 µl RPE buffer konuldu ve 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. İşlem sonunda spin kolon 1,5 ml hacimli toplama tüpü içerisine yerleştirildi. Spin kolona RNase içermeyen steril distile sudan 50 µl konuldu ve

10000rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünün tabanında biriken RNA örneği rRT PCR çalışmalarında kullanılmaya kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.5. rRT PCR

rRT PCR işlemleri LightCycler 2.0 (Roche, Rotkreuz, İsviçre) cihazında gerçekleştirildi. rRT PCR için ticari olarak temin edilen tek aşamalı PCR kiti üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı (Rotor-Gene Probe RT-PCR kit, Cat No: 204574, Qiagen, Hilden Almanya). Reaksiyon toplam hacmi 25 µl olarak hesaplandı. Reaksiyona giren bileşenlerin hacmi ise; 12,5 µl 2x Rotor-Gene Probe PCR master miksi, 5,25 µl distile su, 0,8 µl’şer primerler (konsantrasyonu 10 pmol), 0,4 µl prob (konsantrasyonu 10 pmol), 0,25 µl enzim miksi ve 5 µl RNA olarak hesaplandı. Örnekler, buz aküsü üzerinde hazırlanarak cihaza özel cam kapillarlara konulduktan sonra cihazın karoseline yerleştirildi. Cihazda ısıl koşullar şu şekilde ayarlandı: revers transkripsiyon basamağı için 50 °C’de 10 dakika, reverse transkriptaz enzim inaktivasyonu için 95 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Bunu takiben 40 siklus boyunca, ön denatürasyon için 95 °C’de 5 saniye, annealing basamağı için 60 °C’de 10 saniye inkübasyona bırakıldı. Son olarak ise soğutma basamağında 40 °C’de 30 saniye bekletildi. Sonuçlar gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranında takip edildi.

4. BULGULAR

4.1. Serolojik Çalışma Sonuçları

Tokat ili Reşadiye ilçesindeki 7 köyden toplanan altmış beş sığır kan serumunun 25'inde (%38,5), 42 koyun kan serumunun 35'inde (%83,3) ve 64 keçi kan serumunun 53'ünde (%82,8) olmak üzere toplamda 171 kan serumunun 113'ünde (%66,1) KKKAV antikoru tespit edilmiştir. Sığır serumlarının toplandığı köylerden; Keçiköy'de toplanan 16 serumun tamamında (%100), Uluköy'de toplanan 5 serumun 3'ünde (%60) ve Hasanşeyh Köyü'nde toplanan 44 serumun 6'sında (%13,6) KKKAV antikoru bulundu. Koyun serumlarının toplandığı köylerden; Nebişeyh Köyü'nde toplanan 22 serumun 17'sinde (%77,3), İbrahimşeyh Köyü'nde toplanan 20 serumun 18'inde (%90) KKKAV antikoru rastlanıldı. Keçi serumlarının toplandığı köylerden; Yuvacık Köyü'nde toplanan 32 serumun 21'sinde (%65,6), Akdoğmuş Köyü'nde toplanan 32 serumun ise tamamında (%100) KKKAV antikoru tespit edildi. Çalışma sonuçları Tablo 4'te sunuldu.

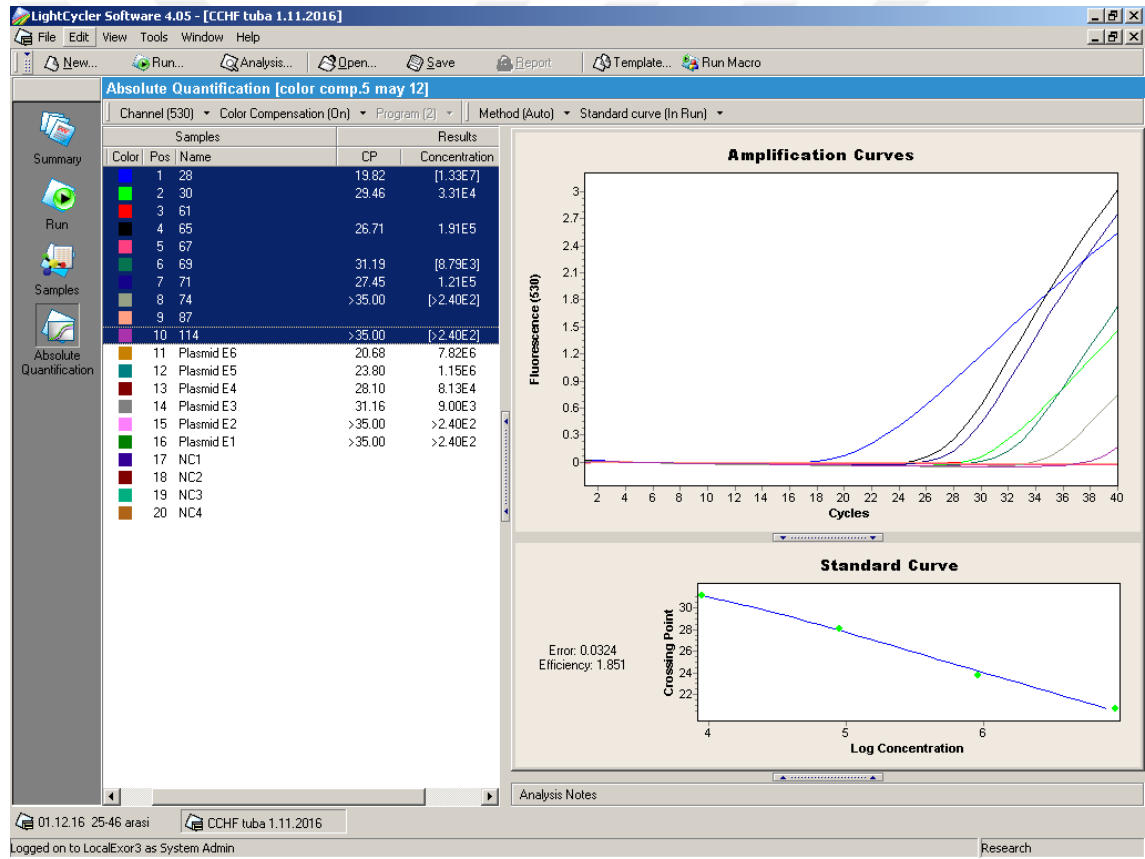
Tablo 4. Köylere göre KKKAV'nin seroprevalansı

	KOYUN (%)	KEÇİ (%)	SİĞİR(%)
NEBİŞEYH	17/22 (77,3)	—	—
YUVACIK	—	21/32 (65,6)	—
AKDOĞMUŞ	—	32/32 /(100)	—
İBRAHİMŞEYH	18/20 (90)	—	—
KEÇİKÖY	—	—	16/16 (100)
ULUKÖY	—	—	3/5 (60)
HASANŞEYH	—	—	6/44 (13,6)
TOPLAM	35/42 (83,3)	53/64 (82,8)	25/65 (38,5)

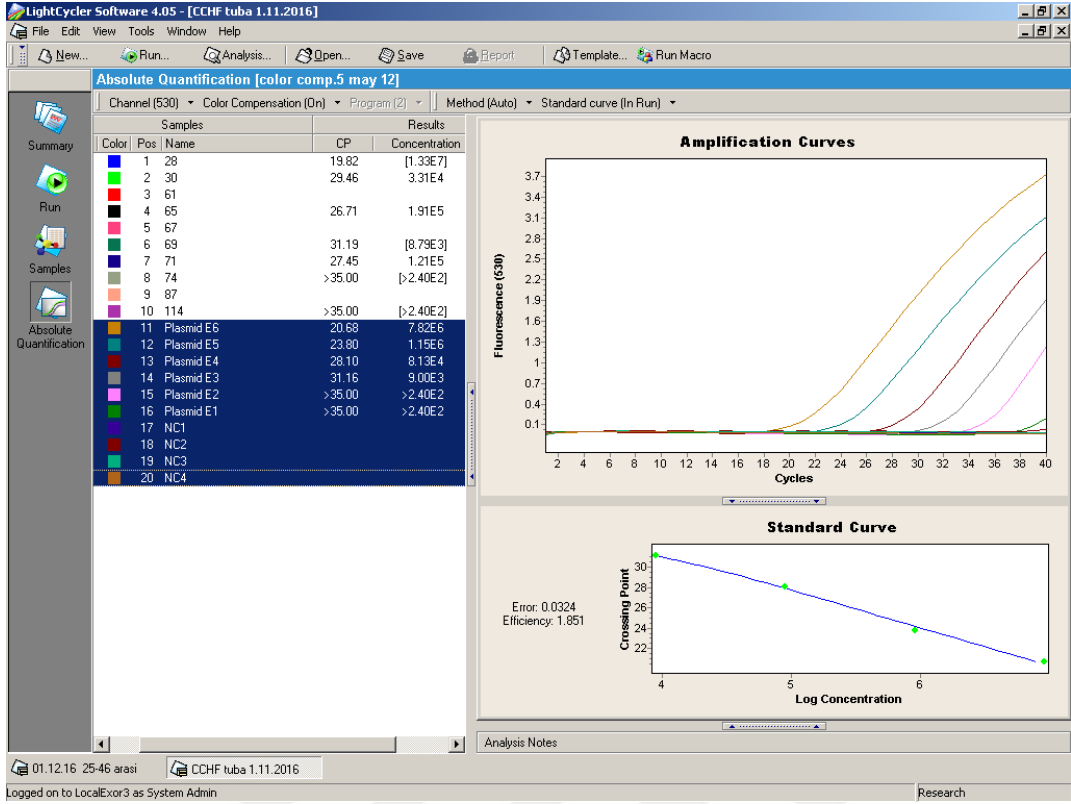
4.2. Moleküler Çalışma Sonuçları

rRT PCR sonuçlarına göre, sığır koyun ve keçilerden toplanan 171 plazma ve süt örneklerinin hiçbirisinde KKKAV RNA'sına rastlanılmadı. 78 koyun ve keçiden toplanan kenelerden yapılan kene homojenizatlarının 10'unda (%12,8) KKKAV RNA'sı tespit edildi. Pozitif kene homojenizatlarının 4'ü Nebişeyh Köyü'nde

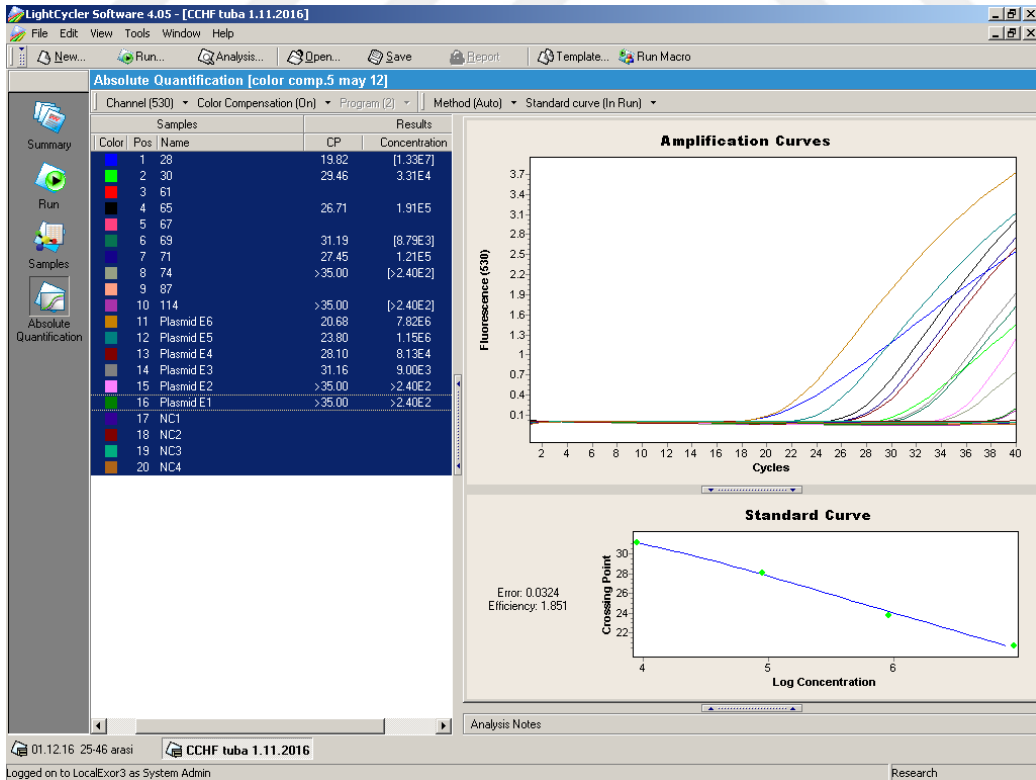
koyunlardan toplanan kenelerde, 1'i İbrahimşeyh Köyünde koyunlarda toplanan kenelerde, 4'ü Akdoğmuş Köyü'nde keçilerden toplanan kenelerde, 1'i ise Yuvacık Köyü'nde keçilerden toplanan kenelerde tespit edildi. Üzerlerinde toplanan kenelerde KKKAV RNA'sı tespit edilen koyun ve keçilerin 8'inde KKKAV'una karşı antikor varlığı da tespit edilmesine karşın, Nebişeyh Köyü'ndeki 1 koyun ile Yuvacık Köyü'nde bulunan 1 keçide antikor tespit edilememiştir. Test sonucunda kene homojenizatlarından $2,66 \times 10^6$ - $4,8 \times 10^1/\mu$ arasında viral kopya sayısı tespit edildi. Saha örneklerinde en yoğun C_T değeri 19,82 olarak kaydedildi. Bu örnek Nebişeyh Köyü'nde bir koyun üzerinden toplanan 1 aç 2 doymuş kene örneğinden elde edilen homojenizatta tespit edildi (Şekil 10-12).



Şekil 10. Saha örneklerinin rRT PCR'da oluşturduğu ışımaya eğrileri ve sonuçları



Şekil 11. Pozitif Kontrol plazmidlerle elde edilen şıma eğrileri



Şekil 12. Saha örneklerine plazmidlerin birlikte oluşturduğu şıma eğrileri ve sonuçları

5. TARTIŞMA

KKKA hastalığının dünya üzerinde Avrupa, Asya ve Afrika'da bulunan bir çok ülkede varlığı bilinmektedir (Ergönül, 2006). Hastalık etken ispatına dayalı olarak ilk defa 1944 yılında Rusya'da bildirilmesine karşın, Türkiye'de 2002 yılında ilk defa bildirilmiştir (Ergönül, 2006; Tonbak ve ark., 2006). 2002-2014 yılları arasında toplam 9069 insan vaka sayısı bildirilmiş olup, bunlardan 440'ı hayatını kaybetmiştir. Türkiye'de mortalite oranı yaklaşık %5 oranında seyretmektedir (Ser ve Çetin, 2016).KKKA hastalığının konaklar arasında yayılmasındaki en önemli rolü keneler üstlenmektedir. Epidemiyolojik çalışmalara göre virüs 31 kene türünden izole edilmiştir. Bu kene türlerinin bazılarının biyolojik vektör olduğu ispatlanmış olsa da, pek çoğu için hala mekanik vektör olmadan öte bir bilimsel veri bulunmamaktadır. Biyolojik vektörlerde virüs hem transstadial hemde transovarial olarak nakledilmektedir. *Ixodidae* ailesi içerisinde yer alan sert kenelerden *Hyalomma marginatum* türü keneler virüse biyolojik vektörlük yapmakla beraber, hastalığın endemik olduğu bölgelerde bol miktarda olduğu tespit edilmiştir (Hoogstraal, 1979). Endemik bölgelerde yaygın olarak bulunan vektör kenelerden dolayı KKKAV bölge insanı için önemli bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Virüs evcil ruminantlarda subklinik seyretmekle birlikte, yaban hayatta da tavşan, domuz, kirpi gib hayvanlar virüsün sirkülasyonunda rol oynamaktadır. Enfeksiyonun viremi safhasında bu hayvanlardan kan emen keneler için virüs kaynağı oluşturmaktadır. Yine evcil ruminantların viremi safhasında mezbaha da kesilmesi, muayene edilmesi ve cerrahi girişimlerde bulunulması, mezbaha çalışanları, veteriner hekimleri ile veteriner sağlık çalışanları ve hayvan bakıcıları için önemli risk teşkil etmektedir (Causey ve ark., 1970; Chumakov, 1974).Bu nedenlerden dolayı hastalığın viremik fazında olan hayvan oranını ve hastalığı geçiren hayvan sayısını belirlemek ve kene ile hayvandaki virüs varlığı ve miktarı arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek amacıyla hayvanlardan tam kan, serum ve kene örnekleri toplanmıştır.

Hastalığa yakalanan ve kesin teşhisi yapılmamış hastalarda, nazokomiyal bulaşma yönünden sağlık personeli için büyük risk oluşturmaktadır. Hastalığın etkin bir tedavisinin bulunmaması, korunmaya yönelik ruhsatlandırılmış bir aşısının da olmaması erken teşhisi önemli kılmaktadır (Spik ve ark., 2005). KKKKA hastalığının teşhisinde hücre kültüründe virüs izolasyonu, antijen tespiti, antikor tespitine dayalı testler olan

IFA, ELISA gibi testler, moleküler test metotlarından RT-PCR ve rRT-PCR ile klinik ve biyokimyasal parametreler kullanılmaktadır. Virüs izolasyonunun 4-7 gün sürmesi hastalığın erken teşhisini geciktirmesinden ve moleküler metotlara göre daha az duyarlı bulunmasından dolayı rutin ve hızlı teşhiste tercih edilmemektedir. Ayrıca KKKAV'nin izolasyon çalışmalarının yüksek güvenlikli laboratuvarlarda (biyogüvenlik seviyesi-4) yapılması zorunluluğundan dolayı hücre kültüründe virüs izolasyon çalışmalarını oldukça sınırlandırmaktadır (Shepherd ve ark., 1986; Swanepoel ve ark., 1989; Nichol, 2001; Zeller, 2007). Klinik ve biyokimyasal parametrelere dayalı olarak kesin teşhis yapılamaması da bu yöntemlerin zayıf tarafını oluşturmaktadır. Moleküler metotlardan olan rRT-PCR'in hastalığın akut döneminde kısa zamanda erken ve güvenilir sonuç veriyor olması, kullanım için yüksek güvenlik laboratuvar koşullarına gerek duyulmaması nedenlerinden dolayı rutin teşhis ve araştırmalarda tercih sebebi olmaktadır (Zeller, 2007). Bu nedenlerden dolayı etkenin teşhisinin konulmasında rRT-PCR metodu tercih edilmiştir.

Hastalığın bulaşma kaynaklarının başında kene tutunma öyküsü gelmektedir. Bu oran ülkelere göre farklı olmakla birlikte %69 oranına kadar çıkmaktadır. Diğer bulaşma şekli ise nazokomiyal bulaşma olmaktadır. Bunların dışında da nedeni belli olmayan vakalar bulunmaktadır (Yılmaz ve ark., 2009). Bu çalışmada, KKKA hastalığı yönünden endemik bir bölge olan ve insan ölüm vakalarının gözlemlendiği Tokat ili Reşadiye ilçesinde ruminantlardan elde edilen sütlerin KKKA hastalığının bulaşmasında rol alıp almadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bilindiği üzere süt insanların ihtiyaç duyduğu besin maddelerini dengeli bir biçimde içinde barındıran önemli bir hayvansal gıda maddesidir. Süt gerek meme bezlerinde üretilme sürecinde gerekse sağım sırasında ve sonrasında birçok mikroorganizma ile kontamine olabilmektedir. Süte uygun ısıl koşulların uygulanmaması durumunda önemli hastalıklarında bulaş kaynağını teşkil etmektedir (Serpen, 2007).

KKKA hastalığına yakalanmış insanlardan emzirme yoluyla bebeklerine virüs geçtiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır (Erbay ve ark., 2008). Aynı şekilde koyunlarda da vertikal yolla virüsün bulaşmadığı bildirilmekle birlikte, kolostrumla yoğun bir şekilde pasif antikör transferi yapıldığı bildirilmiştir (Gonzalez ve ark., 1998). Buna karşın Akdeniz (2010), antijen ELISA test metodunu kullanarak yaptığı çalışmada koyun sütlerinde %7,3, inek sütlerinde ise %0,96 oranında antijen pozitifliği tespit

etmiştir. Hem insanlarda hem de hayvanlarda KKKA virüsü viremi fazında kandan pek çok metotla tespit edilmiştir (Nichol, 2001; Zeller, 2007; Albayrak ve ark.,2010; 2012). Bu çalışmada hem kan hem de sütte KKKAV'ye ait RNA tespiti yapılamamıştır. Her iki örnek çiftinde birden virüsün tespit edilemeyişi, örnekleme zamanıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Koyunlarda yapılan deneysel çalışmada vireminin 4-7 gün arasında sürdüğü, bazen bu sürenin 2-4 güne kadar kısaldığı ve bazı hayvanlarda ise vireminin hiç oluşmadığı bildirilmiştir (Gonzalez ve ark., 1998). Aynı şekilde 10 hayvandan toplanan kenelerde virüs tespit edilmesine karşın, bu hayvanların süt ve kanlarında virüs tespit edilememesi, ya vireminin oluşmadığını ya oluşan vireminin tespit limitleri altında kaldığını ya da enfekte kenelerin ikinci konak olarak kullandıkları bu hayvanlara yeni tutunmuş olabileceği düşünülmektedir. Literatür verileri ışığında, bu çalışmada kan ve süt örneklerinde virüs RNA'sı tespit edilememesine karşın, aynı hayvanlardan toplanan kenelerde virüs RNA'sın tespit edilmesi, virüsün süt ve kana geçmesindeki zamanlamaya bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir. Hastalıkta hayvanlarda vireminin kısa sürmesine karşılık kanda virüs miktarının 4,7log LD₅₀/ml'ye kadar yükselmesi bulaşmada hala yüksek bir risk taşıdığını göstermektedir (Gonzalez ve ark., 1998). Bu çalışmada da her ne kadar süt ve kanda virüs tespit edilememesine karşın, kene örneklerinden elde edilen homojenizatlarda 2,66x10⁹/ml'ye kadar varan yoğun bir viral yükün tespit ediliyor olması, muhtemelen uygun viremi döneminde yapılacak örneklemelerde virüsün kanda da yukarıdaki miktarlar oranında tespit edilebileceğini ve insan sağlığını tehdit edecek miktarlarda olacağı düşünülmektedir.

Türkiye'de ve hastalığın endemik olarak görüldüğü ülkelerde ruminantlarda hastalığın seroprevalansına dair veriler bilinmektedir. Sırasıyla sığırlar, koyun ve keçiler en fazla üzerinde çalışılan hayvan türleridir. Bunun en büyük nedeni ise; çiftlik hayvanlarından elde edilecek epidemiyolojik verilerin, KKKA hastalığının insanlar için o bölgede ne oranda risk teşkil edeceğini ortaya koymada bir öngörü sağlamasından dolayıdır. Bugüne kadar 34 farklı ülkede 75 çalışmayla 39684 sığır serumu, 25 farklı ülkede 49 çalışmayla 17244 koyun serumu ve 15 farklı ülkede 33 çalışmayla 4617 keçi serumu test edilmiştir. Tüm dünyada yapılan çalışmaların ortalaması alındığında sığırlarda %19,33, koyunlarda %23,85, keçilerde ise %28,07 seropozitiflik tespit edilmiştir (Spengler ve ark., 2016). Dünyadaki diğer ülkelere baktığımızda; sığırlarda en yüksek seroprevalans %79,1 oranıyla Afganistan'da, bunu takiben %71 oranıyla

Bulgaristan izlemektedir. Koyunlarda en yüksek seroprevalans %77,5 oranıyla İran'da, %75 oranıyla Afganistan ve %74 oranıyla Bulgaristan'da rapor edilmiştir. Keçilerde ise en yüksek oran %63,3 oranıyla Bulgaristan'da, %49,6 oranla Irak'ta bildirilmiştir. Aynı şekilde sınır komşularımızdan olan İran'da da keçilerde %46'ya, sığırlarda %30'a varan seropozitiflikler görülmüştür (Spangler ve ark., 2016). Albayrak ve ark. (2012) aynı bölgede koyun ve keçilerde yaptıkları çalışmada Reşadiye ilçesinde %26,92 oranında seropozitiflik tespit ettiklerini, hastalığın endemik olduğu Orta Karadeniz Bölgesi genelinde ise bu oranın %74,28'e yükselirken, koyunlarda %85,71, keçilerde ise %66,6 olarak bildirmiştir. Tuncer ve ark.'nın (2014) hastalığın endemik olarak görülmediği Marmara Bölgesinde yaptıkları çalışmada seropozitivite oranını sığırlarda %13, koyunlarda %31,8 ve keçilerde %66 olarak tespit etmişlerdir. Kırbaş ve ark. (2010) Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerinde yaptıkları çalışmada sığırlarda %17, koyunlarda ise %37 seropozitiflik saptamışlardır. Tokat ilinde seropozitiflik oranı sığırlarda %40, koyunlarda ise %45 olarak tespit etmişlerdir. Vatanserver ve ark. (2007)'nin Tokat ilinde yapmış oldukları çalışmada ise sığırlarda %79 seropozitiflik saptamışlardır.

Serolojik çalışmalar örneklenen hayvan sayısı, örneklenen hayvanların yaşı, örnekleme zamanı, bakım ve beslenme koşulları ve bireysel farklılıklar gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörlerin hep birarada veya ayrı ayrı olması koşulunda serolojik çalışma sonuçları da o oranda etkilenmektedir. Bu çalışmada, seropozitiflik oranı sığırlarda %38,5, koyunlarda %83,3 ve keçilerde %82,8 olarak tespit edilmiştir. Türkiye ve dünyada yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda küçük ruminantlardaki seropozitiflik oranı sığırlardan daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada da benzer sonuç elde edilmiştir. Küçük ruminantlarda sığırlara oranla daha yüksek oranda seropozitifliğin tespit ediliyor olmasının en büyük nedeni, küçük ruminantların meralarda sığırlara oranla daha fazla kalması ve buna bağlı olarakta kene tutunmalarına daha fazla maruz kalmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı şekilde sığırlarda seropozitifliğin bazı ülkelerde küçük ruminantlardaki seropozitiflik oranına eş veya daha fazla olmasının nedenide, o ülkelerde sığırların küçük ruminantlar gibi bakım ve besleme rejimine tabi tutulmaları olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar bir araya getirildiğinde, KKKAV'ye karşı bir tür duyarlılığından ziyade virüse maruz kalma zamanından söz etmenin daha doğru olacağı düşünülmektedir. Aynı bölgede Albayrak

ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmaya göre koyun ve keçilerde seropozitiflik oranının oldukça yükselmiş olması, virüsün bölgede artan oranda sirküle olduğuna işaret etmektedir. Yine aynı bölgede Kırbaş ve ark. (2010) ile Vatansever ve ark.(2007)'nin sığırlardaki yaptığı çalışmalarla kıyaslandığında, yıllara göre sığırlarda seropozitiflik oranında tedrici bir azalmanın olduğu görülmektedir. Bu orandaki azalmanın en büyük nedeninin, 2002 yılında ilk insan ölüm vakasını takiben ilerleyen yıllarda artan insan ölüm vakalarıyla birlikte kırsalda kene mücadelesi için Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın yetiştiricilere kimyasal ilaç dağıtması ve eğitim programları düzenleyerek farkındalık ortaya koyması yer aldığı düşünülmektedir. Küçük ruminatlarda yeterince kimyasal yolla kene mücadelesi yapılmaması, küçük rumianatlarda yıllara oranla artan bir seropozitifliğin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, KKKA hastalığının endemik olarak seyrettiği Tokat ili Reşadiye ilçesinde örneklenen hayvanların kan ve sütlerinde virüs tespit edilememesine karşın, bu hayvanlardan toplanan kenelerde virüsün yüksek miktarlarda tespit ediliyor olması, virüsün hala sahada sirküle olduğuna işaret etmektedir. Kan ve sütte tespit edilememesinin ana nedeninin örnekleme zamanı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, gıda maddesi olarak yeri doldurulamayan sütün tüketilmesi sırasında halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaması için muhakkak ısıtma işlem basamaklarına dikkat edilmelidir. Aynı şekilde kenelerde yüksek miktarda virüs tespit edilmesi, hayvan bakıcıları, yetiştiricileri, kırsalda yaşayanlar, mezbaha personeli ve hayvan sağlığı çalışanları için büyük risk oluşturmaktadır. Bu nedenle hayvanlarda, özellikle de şimdiye kadar ihmal edilen küçük ruminantlarda kene mücadelesine önem verilerek hayvanların dış parazitlerinden korunmasına dikkat edilmeli ve rutin kontroller belli program dahilinde uygulanmalıdır. Yıllara oranla sığırlarda seropozitifliğin düşüyor olması, yıllardır sığırlarda bakanlık destekli keneyle kimyasal mücadelenin etkili olduğu tezini doğrulamaktadır. Bu konudaki kamu desteğinin artırılarak devam ettirilmesi sağlanmalıdır. Viremik dönemde kesime sevk edilen hayvanlar, mezbaha personeli ve veteriner sağlık çalışanları için büyük risk oluşturmaktadır. Bu nedenle KKKA hastalığının bu bulaşma yoluna dikkat çekilmeli, personele eğitim verilerek farkındalık oluşturulmaya çalışılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akdeniz G. Çiğ inek ve koyun sütlerinde Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antijeni araştırılması. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas, Uzmanlık Tezi, 2010; 47-50.
- Albayrak H, Ozan E, Kurt M. Serosurvey and molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in northern Turkey. *Trop Anim Health Pro* 2012;44:1667-1671.
- Avsic Zupanc T. Epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;75-88.
- 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;54:385-389.
- Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res* 2013;100:159-189.
- Bray M. Comparative pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever and Ebola hemorrhagic fever. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;221-231.
- Burt FJ, Paweska JT, Swanepoel R. Crimean-Congo hemorrhagic fever in South Africa. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;131-141.
- Butenko AM, Chumakov MP, Rubin VN, Stolbov DN. Isolation and investigation of Astrakhan strain of Crimean hemorrhagic fever virus and data on serodiagnosis of this infection. *Mater 15 Nauchn Sess Inst Poliovirus Ensefalitov* 1968;3:88-90.
- Butenko AM, Karganova GG. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Russia and Other countries of the former Soviet Union. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;99-114.
- Causey OR, Kemp GE, Madbouly MH. Congo virus from domestic livestock, African hedgehogs and arthropods in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1970;19:846-850.
- Chinikar S. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;89-98.

- Chumakov MP. A new virus disease- Crimean hemorrhagic fever. *Nov Med* 1947;4:9-11.
- Chumakov MP, Butenko AM, Shalunova NV, Martyanova LI, Smirnova WE, Bashkirtsev VN, Zavodova TI, Rubin SG, Tkachenko EA, Karmy-Sheva VY, Reingold VN, Popov GV, Savinov AP. New data on the virus causing Crimean hemorrhagic fever (CHF). *Vopr Virusol* 1968;13:377.
- Chumakov MP, Smirnova SE, Tkachenko EA. Antigenic relationships between Soviet strains of Crimean hemorrhagic fever virus and the Afro-Asian Congo virus strains. *Mater 16 Nauchn Sess Inst Poliovirus Ensefalitov* 1969;2:152-154.
- Chumakov MP. On 30 years of investigation of Crimean hemorrhagic fever. *Tr Inst Polio Virusn Entsefalitov Akad Med Nauk* 1974;22:5-18.
- Deyde VM, Krishtova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol* 2006;80: 8834-8842. x
- Durden LA, Logan TM, Wilson ML. Experimental vector incompetence of a soft tick for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Med Entomol* 1993;30:493-496.
- Elliott RM, Bouloy M, Calisher CH, Goldbach R, Moyer JT, Nichol ST, Pettersson R, Plyusnin A, Schmaljohn CS. *Bunyaviridae*. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, editors. *Virus taxonomy. Seventh report international committee for the taxonomy of viruses*. 1st Ed., San Diego, Academic Press. 2000;599-630.
- Erbay A, Çevik MA, Önguru P, Gözel G, Akinci E, Kubar A, Bodur H. Breastfeeding in Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Scand J Infect Dis* 2008;40(2):186-188.
- Ergönül O, Celikbaş A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, Esener H. Characteristics of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy. *Clin Infect Dis* 2004;39:284-287.
- Ergönül Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006;6: 203-214.
- Ergonul O. Clinical and pathologic features of Crimean-Congo hemorrhagic fever. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;207-220.
- Ergonul O, Whitehouse CA. Introduction and historical perspectives. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;3-11.
- Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antivir Res* 2008; 78:125-131.
- Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol* 2012;2(2):215-220.

- Ergunay K, Whitehouse CA, Ozkul A. Current status of human arboviral diseases in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010;11(6):731-741.
- Fisher-Hoch SP, Khan JA, Rehman S, Mirza S, Khurshid M, McCormick JB. Crimean-Congo haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet* 1995; 346:472-475.
- Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Curr Mol Med* 2005;5(8):753-760.
- Flick R. Molecular biology of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;35-44.
- Gear JH, Thomson PD, Hopp M, Andronikou S, Cohn RJ, Ledger J, Berkowitz FE. Crimean-Congo hemorrhagic fever in South Africa. Report of fatal case in the Transvaal. *S Afr Med J* 1982;62:576-580.
- Gonzalez JP, Camicas JL, Cornet CP, Wilson ML. Biological and clinical responses of West African sheep to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus experimental infection. *Res Virol* 1998;149:445-455.
- Gordon SW, Linthicum KJ, Moulton JR. Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two tick species. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:576-580.
- Gönen İ. Clinical and laboratory findings of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in emergency department at hospital admission. *J Microbiol Infect Dis* 2011;1(1):1-4.
- Gunes T, Engin A, Poyraz O, Elaldi N, Kaya S, Dokmetas I, Bakir M and Cinar C. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in high-risk population, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2009;15:461-464.
- Gürbüz Y, Sencan I, Tütüncü E. Case of nosocomial transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever from patient to patient. *J Infect Dis* 2009;13(3):103-107.
- Hasan S. Using of ELISA in diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, case report. *Bioscience methods* 2012;3(6):41-42.
- Hewson R. Molecular epidemiology, genomics and phylogeny of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;45-55.
- Hoogstral H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. *J Med Entomol* 1979;15:307-417.
- Işıkyay S. Crimean-Congo hemorrhagic fever: A casereport. *JAEMCR* 2013;4: 25-28.
- James H, Gear S. Crimean Congo Hemorrhagic Fever. *Soc Am J* 1982;62:576-589.

- Kalaycıoğlu AT, Durmaz R, Uyar Y, Unaldı O, Aksekili E, Ozkul A, Korukoglu G, Ertek M. Lack of genetic diversity in Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Turkey: Assessment of present and future patterns of disease. *J Med Virol* 2012;84:471-478.
- Karaer Z. Kırım-Kongo kanamalı ateşi ve keneler. *Vet Hekim Dern Derg* 2006;77(2):12-19.
- Kırbaş A, Özdemir H, Aksözek A. Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo kanamalı ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması. *Fırat Univ Sağlık Bilim Derg Vet* 2010;24(3):137-142.
- Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res* 2013;98:248-260.
- Midilli K, Gargili A, Ergonul O, Elevli M, Ergin S, Turan N, Sengöz G, Ozturk R, Bakar M. The first clinical case due to AP92 like strain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and a field survey. *BMC Infect Dis* 2009; 9(90):1-7.
- Mirazimi A. Old and new treatment strategies. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;258-260.
- Mirazimi A, Lindgren G, Karlberg H. Comparison of antiviral activity of recombinant and natural interferons against Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Open Virol J* 2010;4:38-41.
- Mourya DT, Yadav PG, Shete AM, Gurav YK, Raut CG, Jadi RS, Pawar SD, Nichol ST, Mishra AC. Detection, isolation and confirmation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human, ticks and animals in Ahmadabad, India, 2010-2011. *Plos Neg Trop Dis* 2012;6(5):e1653.
- Nichol ST. The bunyaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* vol 1. 4th Ed., Philadelphia, Lippincott 2001;1603-1633.
- Nichol ST, Devendra TM, Pragya D. Detection, Isolation and Confirmation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human. *Neglected Trop Dis* 2010;2:193-201.
- Ozdarendeli A, Aydin K, Tonbak S, Aktas M, Altay K, Koksali I, Bolat Y, Dumanli N, Kalkan A. Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strains in Turkey. *Arch Virol* 2008;153:37-44.
- Ozdarendeli A, Canakoglu N, Berber E, Aydin K, Tonbak S, Ertek M, Buzgan T, Bolat Y, Aktas, M, Kalkan A. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. *Virus Res* 2010;147(2):288-293.
- Ozkaya E, Dincer E, Carhan A, Uyar Y, Ertek M, Whitehouse CA, Ozkul A. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Turkey: Occurrence of local topotype. *Virus Res* 2010;149:64-70.

- Öngürü P, Bodur H. Kırım-Kongo kanamalı ateşi. *Deney Klin Tıp Derg* 2012;29:175-18.
- Özan E. Kırım Kongo kanamalı ateşi(kkka) hastalığının endemik olduğu bazı illerde (Samsun, Sivas, Tokat) kesilen ruminant türlerinde kkka virüs varlığının virolojik ve serolojik olarak araştırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi, 2017;30-60.
- Saijo M. Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur autonomous region of Western China. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;115-130.
- Schmaljohn CS, Hooper JW. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th Ed., Philadelphia, Lippincott 2001;1581-1602.
- Schuster I, Mertens M, Mrenoshki S, Staubach C, Mertens C, Brüning F, Wernike K, Hechinger S, Berxholi K, Mitrov D, Grochup MH. Sheep and goats as indicator animals for the circulation of CCHFV in the environment. *Exp Appl Acarol* 2016;68:337-346.
- Seçmeer G, Çelik İH. Kırım-Kongo kanamalı ateşi. *J Pediatr Inf* 2010;4:152-159.
- Ser Ö, Çetin H. Kırım Kongo kanamalı ateşi'nin güncel durumu. *TAF Prev Med Bull* 2016;15:1-11.
- Serpen A. Süt ile insana bulaşan hastalıklar ve süt hijyeni. *Süt Dünyası Gıda Tar Hay Derg* 2007;9:1-4.
- Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Sherpherd SP. 1986. Comparison of methods for isolation and titration of Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 1986;24(4):654-656.
- Simpson DI, Knight EM, Courtious G. A hitherto undescribed virus occurring in Africa I. Human isolations-clinical notes. *East Afr Med J* 1967;44:86-92.
- Spengler JR, Bergeron E, Rollin PE. Seroepidemiological studies of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in domestic and wild animals. *PLOS Neglect Trop D* 2016;DOI:10.1371/journal.pntd.0004210.
- Spik K, Shurtleff A, McElroy AK, Guttieri MC, Hooper JW, SchmalJohn C. Immunogenicity of combination of DNA vaccines for Rift Valley virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus and Crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine* 2005; 24(21):4657-4666.
- Swanepoel R, Gill DE, Shepherd AJ, Leman PA, Mynhardt JH, Harvey S. 1989. The clinical pathology of Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis* 1989;11 (Suppl. 4): S794-S800.

- 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;44(11):4120-4124.
- Tuncer P, Yesilbag K, Alpay G, Dincer E, Girisgin AO, Aydın L, Uyar Y, Ozkul A. Crimean-Congo hemorrhagic fever infection in domestic animals in Marmara region, Western Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2014;61:49-53.
- Turell MJ. Role of ticks in the transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;143-154.
- Uyar Y, Çarhan A. Kırım-Kongo kanamalı ateşinin ülkemizdeki epidemiyolojisi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2009;66(2):13-16.
- Uyar Y, Christova I, Papa A. Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) in Anatolia and Balkan Peninsula. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2011;68(3):139-151.
- Van Eeden PJ, Joubert JR, Van de Wal BW, King JB, de Kock A, Groenewald JH. A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part I. Clinical features. *S Afr Med J* 1985;68:711-717.
- Vatanserver Z, Uzun R, Estrada-Pena A, Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;59-74.
- Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004;64:145-160.
- Woodall JP, Williams MC, Simpson DIH, Ardoin P, Lule M, West R. The Congo group of agents. *Rep East Afr Virus Res Ins* 1965;14:34-36.
- Yapıcı K, Demir C, Karahocagil MK, Uluç HH, Ceylan A, Akdeniz H. Kırım-Kongo kanamalı ateşi: 12 olgunun değerlendirilmesi. *Van Tıp Derg* 2010;17(2): 46-49.
- 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(6):1179-1182.
- Yilmaz GR, Buzgan T, Torunoglu MA, Safran A, Irmak H, Com S, Uyar Y, Carhan A, Ozkaya E, Ertek M. A preliminary report on Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey, March -June 2008. *Euro Surveill* 2008;13(27-39):470-471.
- Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, Safran A, Uzun R, Cevik MA, Torunoglu MA. The epidemiology of Crimean-congo haemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *Int J Infect Dis* 2009;13(3):380-386.
- Zeller H. Laboratory diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Balkans. In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever-a global perspective*. 1st Ed., Dordrecht, Springer, 2007;233-243.



T.C.
GIDA TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Tarih/Sayı: 25/02/2015/1/38
Karar No : 37

ETİK KURUL RAPORU

Kurulduğunda 24/02/2015 tarihinde başkanlığı yapılan Doç.Dr.Hayvan ALBAYRAK'ın yürütücülüğünde bulunan Kurum konuyla ilgili uzmanları evcil ruminant (sığır,koyun,kedi) süt ve süt ürünlerinde araştırılması konusundaki araştırma projesi kurulan 25/02/2015 tarihli oturumunda değerlendirilmiştir.

Kararı: Proje'nin yürütülmesi uygun görülmüştür.

Üye	Üye	Üye	Üye	Üye	Üye	Başkan
						
GÖKBERK ŞERDAR	GÖKBERK ŞERDAR	N. ALI UZUN	YAKAR DERMİZ	MURAT GÜR	R. YURTSEVEN	Dr. Nezihan ÖZKANCI
(Katılmadı)	(Katılmadı)	(Katılmadı)	(Katılmadı)	(Katılmadı)	(Katılmadı)	(Katılmadı)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:Tuba ÖZÜPAK

Doğum Yeri: Mamak/ ANKARA

Doğum Tarihi :10.10.1989

Medeni Hali:Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Kırıkkale Üniversitesi - 2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: GTHB İlçe Müdürlüğü Reşadiye / TOKAT- 2013;
GTHB İlçe Müdürlüğü Selim / KARS-2014

E-posta: tbky_06@hotmail.com