



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA)
HASTALIĞININ ENDEMİK OLDUĞU BAZI İLLERDE
(SAMSUN, SİVAS, TOKAT) KESİLEN RUMİNANT
TÜRLERİNDE KKKA VİRUS VARLIĞININ VİROLOJİK VE
SEROLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Emre ÖZAN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA)
HASTALIĞININ ENDEMİK OLDUĞU BAZI İLLERDE
(SAMSUN, SİVAS, TOKAT) KESİLEN RUMİNANT
TÜRLERİNDE KKKA VİRUS VARLIĞININ VİROLOJİK VE
SEROLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Emre ÖZAN

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Aykut ÖZKUL**

**ANKARA
2017**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Hastalığının Endemik Olduğu Bazı İllerde (Samsun, Sivas, Tokat) Kesilen Ruminant Türlerinde KKKA Virus Varlığının Virolojik ve Serolojik Olarak Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Emre ÖZAN

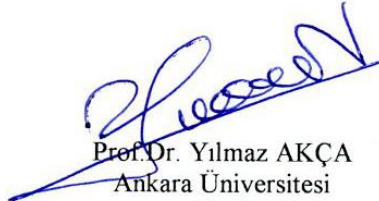
Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalında
Emre ÖZAN tarafından hazırlanan “Kırım Kongo Kanamalı Ateş (KKKA) Hastalığının
Endemik Olduğu Bazı İllerde (Samsun, Sivas, Tokat) Kesilen Ruminant Türlerinde KKKA
Virus Varlığının Virolojik ve Serolojik Olarak Araştırılması” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul / ~~red~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.09.2017


Prof. Dr. Yılmaz AKÇA
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Zafer YAZICI
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Mehmet Tolga TAN
Adnan Menderes Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1.GİRİŞ	1
1.1.Tarihçe	2
1.2.Etiyoloji	4
1.2.1.Sınıflandırma	4
1.2.2.Virusun Yapısı ve Özellikleri	8
1.2.2.1.Genetik Farklılıklar	15
1.2.2.2.Replikasyon	18
1.3.Epidemiyoloji	21
1.3.1.Bulaşma	21
1.3.1.1.Kene İlişkili Bulaşma	22
1.3.1.2.Hayvan İlişkili Bulaşma	24
1.3.1.3.Nosokomial Bulaşma	29
1.3.1.4.Risk Grupları, İnsan Davranışları ve İklim Değişiklikleri	30
1.3.2.Enfeksiyonların Coğrafik Dağılımı	33
1.3.2.1.İnsan Enfeksiyonlarının Coğrafik Dağılımı	33
1.3.2.2.Hayvan Enfeksiyonlarının Coğrafik Dağılımı	36
1.4.Klinik Bulgular ve Hastalığın Seyri	38
1.5.Patogenez	41
1.6.Teşhis	41
1.6.1.Virus İzolasyonu	42
1.6.2.Serolojik Testler	43
1.6.3.Moleküler Tabanlı Teşhis Yöntemleri	44
1.7.Tedavi	45
1.8.Koruma ve Kontrol	45
2.GEREÇ ve YÖNTEM	49
2.1.Gereç	49
2.1.1.Serolojik ve Virolojik Çalışmalarda Kullanılan Örnekler	49
2.1.2.Örnekleme Yapılan Mezbahalar	51
2.1.3.Virus ve Hücre Kültürü	51
2.1.4.Testlerde Kullanılan Kontrol Numuneleri	52
2.1.5.ELISA Kitleri, Konjugatlar ve Validasyon	52
2.1.6.Kantitatif rt RT-PCR, Primer-Problar ve Plazmid	53
2.1.7.Tek Aşamalı RT-PCR ve Dizi Analizi	54
2.2.Yöntem	54
2.2.1.ELISA ile IgG Varlığının Araştırılması	54

2.2.2.Virus Nötralizasyon Testi	56
2.2.3.RNA Ekstraksiyonu	56
2.2.4.Kantitatif rt RT-PCR ile KKKAV Varlığının Araştırılması	57
2.2.5.Viral Yük Tespiti	58
2.2.6.Tek Aşamalı RT-PCR ve Dizi Analizi	58
2.2.7.Sonuçların İstatistiksel Olarak İncelenmesi	59
3.BULGULAR	60
3.1.KKKAV Seroprevalansının Belirlenmesi	60
3.2.Virus Varlığının Belirlenmesi ve Viral Yük Tespiti	68
3.3.Pozitif Örneklerin Tek Aşamalı RT-PCR ile Test Edilmesi ve Dizi Analizi	72
4.TARTIŞMA	73
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	91
ÖZET	95
SUMMARY	96
KAYNAKLAR	97
EKLER	104
Ek-1 Etik Kurul İzin Yazısı	104
Ek-2 Etik Kurul Revizyon Kabul Yazısı	105
Ek-3 Doktora Tez Konusunun Çalışılması Hakkında Bakanlık İzin Yazısı	106
ÖZGEÇMİŞ	107

ÖNSÖZ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığının dünya genelinde 30'dan fazla ülkede varlığı bilinmekte olup, ülkemizde de ilk insan vakasının meydana geldiği 2002 yılından bu yana endemik olarak görülmektedir. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre ülkemizde 2002-2016 yılları arasında 10 219 adet insan vakası meydana gelmiştir. Hastalığın görüldüğü ülkelerde vaka-ölüm oranı %2-30 arasında seyrederken, ülkemizde ise bu oran %4,71 olarak kayıtlara geçmiştir.

KKKA enfeksiyonları hayvanlarda klinik belirti göstermeden seyrederken insanlarda asemptomatik veya orta şiddetli hastalık tablosundan, ölümle sonuçlanabilen şiddetli kanamalı hastalık tablosuna kadar değişen tarzda klinik seyir izleyebilmektedir. KKKA enfeksiyonlarının asıl bulaşma kaynağı olarak keneler kabul edilmekle birlikte, enfekte insan veya hayvanların dokuları, kanları ve diğer vücut sıvılarına temasında bulaşma açısından önemli olduğu bilinmektedir. Ayrıca meydana gelen insan vakaları açısından nosokomial bulaşma da önemli yer tutmaktadır.

Evcil ve yabani hayvanlarda KKKA virus antikorlarının durumu, ilgili bölgede enfeksiyonun varlığı veya yokluğu ile risk bölgelerinin belirlenmesi için önemli bilgiler elde etmemizi sağlamaktadır. Ancak günümüze kadar ülkemiz hayvanlarında yapılan çok az sayıda seroepidemiyolojik çalışma bulunmaktadır. Bunun yanında İran gibi ülkelerde hastalığın asıl bulaşma yolu olarak gösterilen hayvan ilişkili bulaşmanın ülkemiz açısından ne kadar önemli olduğu bir soru işaretidir. Son konak olan insanların kesim gibi olası viremideki hayvanların kanlarına en fazla maruz kaldığı durumlarda temas edebileceği maksimum viral yük miktarı bilinmemektedir. Son olarak hayvanlardaki viral miktarını ortaya koymak amacıyla moleküler temelli bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan tez çalışması ile bahsedilen bu konulardaki bilgi eksikliğinin giderilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Lisans ve doktora eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, tecrübesi ve bilgi birikimi ile karşılaştığım sorunları çözmemde yardımcı olan, mütevazı kişiliğini, bilimsel yaklaşımlarını ve çalışma azmini örnek aldığım danışman hocam Sayın Prof.Dr.Aykut ÖZKUL'a ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Yılmaz AKÇA'ya, doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr.Feray ALKAN, Sayın Prof.Dr.Seval Bilge DAĞALP, Sayın Prof.Dr.Mehmet Taner KARAOĞLU ve Sayın Prof.Dr.Tuba Çiğdem OĞUZÖĞLU'ya ve tez izleme komitesindeki olumlu katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr.Hakan YARDIMCI'ya ve doktora eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen tüm doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince her türlü kolaylığı sağlayan ve desteğini esirgemeyen Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Sayın Uzman Veteriner Hekim İsmail AYDIN'a, her zaman desteğini yanımda hissettiğim Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç.Dr.Harun ALBAYRAK'a, ELISA testlerinde kullanılan çoklu tür konjugatları temin ettiğim ID.vet firmasından Dr.Loic COMTET'e, tez çalışmam sırasında istatistiksel analizleri yapmamda yardımcı olan Dr.Mestan EMEK'e ve yoğun iş tempolarına rağmen tez çalışmam sırasında bana her türlü desteği veren Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Viroloji Laboratuvarı'nda görevli mesai arkadaşlarım Sayın Veteriner Hekim Hamza KADI, Sayın Veteriner Sağlık Teknikeri Abdullah ÇAVUNT ve Sayın Veteriner Sağlık Teknisyeni Mustafa BULUT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora eğitimim süresince en büyük yardım ve desteği gördüğüm aileme, eşim Aysu ÖZAN'a ve kızım Ayşe Beren ÖZAN'a çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

5'-pppRNA	RNA 5' bölgesi trifosfat grubu
AGID	Agar jel immunodifüzyon
BHK-21	Baby hamster kidney
BioNJ	Biological Neighbor Joining metodu
CER	Chicken embryo related
CHF	Crimean hemorrhagic fever
CPE	Sitopatik etki
cRNA	Komplementer RNA
DIC	Yaygın intravasküler koagulasyon
DMEM	Dulbecco's modified minimal essential medium
dNTP	Deoksi nukleotid tri phosphate
DUGV	<i>Dugbe orthonairovirus</i>
ELISA	Enzim linked immunosorbent assay
ER	Endoplazmik retikulum
Gc	Glikoprotein C
Gn	Glikoprotein N
GPC	Glikoprotein presürkor
HAZV	<i>Hazara orthonairovirus</i>
HI	Hemaglutinasyon inhibisyon
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IFA	İndirekt immunofloresan testi
IFN	İnterferon
IgG	İmmunoglobulin G
IgM	İmmunoglobulin M
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KFT	Komplemet bağlama testi
KKKA	Kırım Kongo Kanamalı Ateşi
KKKAV	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus</i>

L	KKKAV'nin large segmenti
LLC-MK2	Rhesus monkey kidney epithelial
M	KKKAV'nin medium segmenti
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
mRNA	Mesajcı RNA
MVB	Multiveziküler cisimler
NCRs	Tamamlayıcı kodlamayan bölgeler
nm	Nanometre
NP	Nükleokapsid proteini
NSDV	<i>Nairobi sheep disease orthonairovirus</i>
NSM	Yapısal olmayan M proteini
NSs	Yapısal olmayan proteinler
OD	Optik dansite
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
ORF	Açık okuma çerçevesi
PBS-T	Sulandırılmış yıkama solüsyonu
qrt RT-PCR	Kantitatif rt RT-PCR
RdRp	Viral RNA'ya bağlı RNA polimeraz
rt RT-PCR	Real time RT-PCR
RIG-I	Retinoik asitle indüklenebilen gen I
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein kompleksi
RT-PCR	Revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
S	KKKAV'nin small segmenti
SKI-1	Subtilisin kexin isozyme-1
SDB	Serum dilüsyon solüsyonu
SPSD	Ön serum dilüsyon solüsyonu
SW-13	Human adrenal carcinoma
TMB	Tetramethylbenzidine
Vero	African green monkey kidney
VNT	Virus nötralizasyon testi

vRNA

Viral RNA



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. KKKA virionunun şematik olarak gösterilmesi	8
Şekil 1.2. KKKAV'nin segmentlerinin büyüklükleri ve protein kodlama Yönləri	9
Şekil 1.3. KKKAV'nin segmentleri tarafından kodlanan protein ürünlerinin prosesi	10
Şekil 1.4. KKKAV'nin S segmentine göre filogenetik analizi	13
Şekil 1.5. Ülkemiz KKKAV izolatlarının, S segmentine göre filogenetik analizi	14
Şekil 1.6. KKKAV'nin hücre içi replikasyon siklusu	20
Şekil 1.7. KKKAV vakalarının coğrafik dağılımı	34
Şekil 1.8. Sağlık Bakanlığı verilerine göre KKKAV vaka ve ölüm sayıları	35
Şekil 1.9. Evcil ve yabani hayvanlarda yapılan çalışmalara göre ülkelerin KKKAV yönünden seropozitiflik durumları	37
Şekil 1.10. KKKA'nın klinik ve laboratuvar seyri	40
Şekil 3.1. Yaşlara göre seroprevalans oranlarının dağılımı	65
Şekil 3.2. Örnekleme yapılan dişi ve erkek sığır oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı ile tespit edilen seroprevalans oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı	67
Şekil 3.3. Plazmid seri sulandırmaları ve düşük viral yüke sahip pozitif örnekle yapılan qrt RT-PCR	69
Şekil 3.4. Bazı örnekler ile plazmid sulandırmalarının qrt RT-PCR görüntüleri	71
Şekil 3.5. KKKAV S Segmentine göre filogenetik ağaç	72

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. 1945-2006 yılları arasında rapor edilen KKKAV salgınları	4
Çizelge 1.2. ICTV kararlarına göre, KKKAV'nin yıllara göre sınıflandırılması	5
Çizelge 1.3. <i>Bunyavirales</i> takımı içerisinde sınıflandırılan virus aile ve cinsleri	6
Çizelge 1.4. <i>Nairoviridae</i> ailesinde bulunanlar başlıca viruslar	7
Çizelge 1.5. KKKAV hatlarının coğrafik dağılımı	12
Çizelge 1.6. Evcil hayvanlarda tür bazlı bildirilen toplam uluslararası KKKAV seroprevalans çalışmaları	26
Çizelge 1.7. Türkiye'de hayvanlarda yapılan seroprevalans çalışmaları	38
Çizelge 2.1. 2013-2014 yıllarında toplanan kan örneklerinin, ay, il, ilçe, mezbaha ve hayvan türlerine göre dağılımı	50
Çizelge 2.2. Toplanan kan örneklerinin il, ilçe, mezbaha, ve hayvan türlerine göre dağılımı	51
Çizelge 2.3. qrt RT-PCR yönteminde kullanılan primer ve problemlerin dizilimi	53
Çizelge 2.4. Tek aşamalı RT-PCR yönteminde kullanılan primerlerin dizilimi	54
Çizelge 3.1. KKKAV'nin seroprevalans oranlarının, il, mezbaha ve hayvan türlerine göre dağılımı	61
Çizelge 3.2. Sığır ve koyun örneklerinde toplam seroprevalans oranlarının illere ve mezbahalara göre dağılımı	62
Çizelge 3.3. KKKAV'nin seroprevalans oranlarının aylara ve hayvan türlerine göre dağılımı	63
Çizelge 3.4. Sığırlarda cinsiyete göre KKKAV'nin seroprevalans oranları	64
Çizelge 3.5. Yaş gruplarına göre, hayvan türlerinde KKKAV'nin seroprevalans oranlarının dağılımı	66
Çizelge 3.6. Dişi ve erkek sığır örneklerinde, seroprevalans oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı	68
Çizelge 3.7. qrt RT-PCR ile virus RNA'sı tespit edilen örneklerin hayvan türleri, aylara ve mezbahalara göre dağılımı	70
Çizelge 3.8. qrt RT-PCR ile viral yükleri tespit edilen örneklere ait bilgiler	71

1.GİRİŞ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), yaygın ekimoz alanları, iç organlarda kanamalar, karaciğer yetmezliği ile karakterize, zoonotik bir hastalık olup mortalite oranı %80'e kadar ulaşabilmektedir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Ergunay ve ark., 2011). Klinik hastalık tablosu insanlarda şekillenirken, yabani ve evcil memeli hayvanlarda klinik belirti görülmeden sadece iki haftaya kadar uzayabilen viremi şekillenmektedir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Leblebicioğlu ve ark., 2015).

KKKA hastalığının etkeni, *Nairoviridae* ailesinde, *Orthonairovirus* cinsinde yer alan *Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus*'tur (KKKAV) (ICTV, 2017). KKKAV, insanlara enfekte kenelerle, enfekte insanların kan veya diğer vücut sıvılarıyla temasla, viremideki hayvanların kan ve dokularına temasla bulaşabilmektedir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Ergunay ve ark., 2011). Hastalığın insanlara ana bulaşma kaynağı enfekte keneler olup, insan vakaları genel olarak kene aktivasyonunun arttığı dönemlerde görülmektedir (Mertens ve ark., 2013).

KKKAV coğrafik olarak, insan sağlığı açısından en yaygın ve en önemli kene kaynaklı etken olduğu bilinmektedir. Ayrıca, medikal önemi olan tüm arboviruslar arasında *Dengue virus*'tan sonra en yaygın virustur (Ergonul ve Whitehouse, 2007). KKKAV günümüze kadar, Doğu Avrupa'da, özellikle eski Sovyetler Birliği'nde, Kuzeybatı Çin'de, Orta Asya'da, Kuzey Avrupa'da, Afrika'da, Orta Doğu'da ve Hint yarımadasında görülmüştür (CDC, 2017). Ülkemizde, KKKAV antikorunun insan serumlarında tespiti 1970'lerde yapılmış olmasına rağmen, ilk insan vakası 2002 yılında görülmüştür (Ergonul ve Whitehouse, 2007).

1.1. Tarihçe

Yapılan çalışmalarda, KKKAV'nin en son ortak atasının, milattan önce 1500-1100 yıllarda yani günümüzden 3100-3500 yıl önce var olduğu bildirilmektedir (Carroll ve ark., 2010). KKKA hastalığını tarihsel olarak incelediğimizde ise, günümüzde kabul edilen hastalık belirtilerine benzeyen vaka tanımlamalarının ilk olarak Abü Bakr al-Razi tarafından yapıldığını görmekteyiz. Abü Bakr al-Razi, batı dünyası tarafından bilinen adıyla Rhazes, günümüzde İran sınırlarında bulunan bir şehirde doğmuş ve 854-932 yılları arasında yaşamıştır. Abü Bakr al-Razi, sağlık, felsefe ve matematik alanlarında kitaplar yazmıştır. Abü Bakr al-Razi tarafından üç adet vaka tanımlanmış olup, bu vakalar dikkat çekici biçimde günümüz KKKA hastalığına benzerlikler göstermektedir. Böylece, bu vakalar, hastalığın en eski tanımları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Ergonul ve Whitehouse, 2007).

Ayrıca, KKKA hastalığına benzer belirtiler gösteren hastalık tablosu, 12. yüzyılda, günümüz Tacikistan sınırları içinde yer alan bölgede yaşamış olan bir doktor tarafından da yapılmıştır. Yapılan hastalık tarifinde, idrarda, rektumda, dış etlerinde, salyada ve karın boşluğunda kanın varlığıyla seyreden kanamalı hastalık tablosundan bahsedilmiştir. Normalde, kara tavuklarının paraziti olan bir kene veya bitin hastalık etkeni olduğu söylenmiştir. İlerleyen yüzyıllarda, Özbekistan'ın kuzeyinde yaşayan yerli halk tarafından "*khungribta* (kan alması), *khunymuny* (burun kanaması) ve *Karakhalak* (kara ölüm)" gibi isimlerle en az üç farklı şekilde isimlendirilmiştir (Whitehouse, 2004).

Kayıtlara geçen ilk KKKA salgını ise, 1944 yılının yaz aylarında Kırım yarımadasında bulunan Sovyet askerlerinde görülmüştür. Yaklaşık 200 askeri personel hastalıktan etkilenmiş ve %10 civarında ölüm gerçekleşmiştir. Hastalığa yakalanan kişilerde, kanama ile seyreden akut ateşli hastalık tablosu ve şok şekillenmiştir. Sovyet yönetimi tarafından bölgeye gönderilen Mikhail Chumakov yönetimindeki araştırmacılar, hastaların kanlarını veya kene ekstraktlarını filtre

ettikten sonra gönüllü askerlere ve psikiyatrik hastalara inoküle ederek hastalık tablosunun şekillenmesini başarmışlardır (Bente ve ark., 2013). Araştırmacılar tarafından, *Hyalomma marginatum* kenesinin nimf formunun filtre edilmiş antibiyotikli süspansiyonlarının verildiği sağlıklı olan gönüllü askeri personelde, inokülasyondan iki gün sonra hastalık belirtileri tespit edilmiştir (Whitehouse, 2004). Böylece, Chumakov ve onun çalışma arkadaşları “Crimean hemorrhagic fever (CHF)” hastalığının, kene kaynaklı bir viral hastalık olduğunu ispatlamayı başarmışlardır. CHF etkenin tanımlanmasını takip eden yirmi yıldan fazla süre boyunca, hastalıkla ilgili laboratuvar araştırmaları, etkenin üretilmesinde yetersizlik nedeniyle sınırlı kalmıştır (Bente ve ark., 2013). Chumakov ve ekibi tarafından, 1967 yılında CHF virus izolasyonu için ilk defa yeni doğmuş fareler kullanılmış ve etken intraserebral inokülasyon yoluyla verilmiştir. Bu yöntemle, Astragan’lı bir hastadan (Drozdov) izolasyon yapılmış ve Drozdov izolatu elde edilmiştir. Drozdov izolatu, Rusya ve diğer yerlerde yapılan çalışmalarda standart referans suş olarak kullanılmıştır (Bente ve ark., 2013; Whitehouse, 2004).

Hastalık, 1956 yılında günümüzde, Demokratik Kongo Cumhuriyeti olarak adlandırılan Belçika Kongo’sunda da tespit edilmiş ve “Congo virus” olarak adlandırılmıştır. Araştırmacılar tarafından, Congo virus ve CHF virus’un aynı olduğu tespit edildikten sonra etken “CHF-Congo virus” olarak adlandırılmıştır. İlerleyen yıllarda ise hastalık etkeni, “Crimean-Congo hemorrhagic fever” olarak isimlendirilmiştir (Whitehouse, 2004). KKKA salgının ilk olarak tanımlandığı 1944 yılından 2006 yılına kadar raporlanmış KKKA salgınları Çizelge 1.1.’de gösterilmiştir (Ergonul ve Whitehouse, 2007).

Çizelge 1.1. 1945-2006 yılları arasında rapor edilen KKKAV salgınları (Ergonul ve Whitehouse, 2007).

Coğrafi Konum	Yıllar	Vaka Sayısı	Vaka-Ölüm Oranı (%)	Meslek
Güney Doğu Avrupa				
Kırım	1944-1945	200	10	Askerler
Astragan	1953-1963	104	17	Tarım işçileri
Rostov	1963-1969	323	15	Tarım işçileri
Bulgaristan	1953-1974	1105	17	Tarım işçileri, Sağlık çalışanları
	1975-1996	279	11	Tarım işçileri
	1997-2003	138	21	Tarım işçileri
Arnavutluk	2001	7	-	Tarım işçileri, Sağlık çalışanları
Kosova	2001	18	33	Tarım işçileri
Türkiye	2002-2005	1103	5	Tarım işçileri, Sağlık çalışanları
Asya				
Çin	1965-1994	260	21	Tarım işçileri
	1997	26	24	Tarım işçileri
Kazakistan	1948-1968	75	50	Tarım işçileri
Tacikistan	1943-1970	97	23	Tarım işçileri, Lab. çalışanları
Pakistan	1976	14	29	Çoban, Sağlık çalışanları
	1994	3	Bilinmiyor	Sağlık çalışanları
	2000	9	55	Tarım işçileri, Sağlık çalışanları
Orta Doğu				
Birleşik Arap Emirlikleri	1979	6	50	Sağlık çalışanları
	1994-1995	11	73	Tarım işçileri
Şarika	1980	1	-	Esnaf
Irak	1979-1980	55	64	Tarım işçileri
Suudi Arabistan	1990	7	-	Tarım işçileri
Umman Sultanlığı	1995-1996	4	Bilinmiyor	Tarım işçileri
İran	2003	81	18	Tarım işçileri
Afrika				
Zaire (Kongo)	1956	2	-	Doktor
Uganda	1983	1	-	Laboratuvar çalışanı
Moritanya	1983	1	-	Deve sürüsü sahibi
	2004	38	29	Tarım işçileri, Sağlık çalışanları
Burkina Faso	1983	1	-	Bilinmiyor
Güney Afrika Cumhuriyeti	1981-1986	32	31	Çiftçiler, Sağlık çalışanları
Tanzanya	1986	1	-	Öğrenci
Güneybatı Afrika	1986	1	-	Bilinmiyor
Kenya	2000	1	Öldü	Tarım işçisi

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV), Budapeşte oturumu kayıtlarına göre, KKKAV, *Bunyavirales* takımı, *Nairoviridae* ailesi ve

Orthonaviridae cinsi içinde sınıflandırılmıştır. KKKAV'nin, yıllara göre sınıflandırılması ve isimlendirilmesi Çizelge 1.2.'de özetlenmiştir (ICTV, 2017).

Çizelge 1.2. ICTV kararlarına göre, KKKAV'nin yıllara göre sınıflandırılması (ICTV,2017).

YILLAR	TAKIM	AİLE	CİNS	TÜR
1979	Tanımlanmamış	<i>Bunyaviridae</i>	Tanımlanmamış	<i>Congo virus</i>
1981	Tanımlanmamış	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Nairovirus</i>	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever Virus</i>
1995	Tanımlanmamış	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Nairovirus</i>	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>
2015	Tanımlanmamış	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Nairovirus</i>	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever nairovirus</i>
2016	<i>Bunyavirales</i>	<i>Nairoviridae</i>	<i>Orthonaviridae</i>	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonaviridae</i>

Bunyavirales takımı içerisinde, dokuz virus ailesi, 13 virus cinsi ve 157 virus türü bulunmaktadır. *Bunyavirales* takımı içerisinde yer alan virus aileleri ve cinsleri Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir (ICTV, 2017). *Bunyavirales* takımı içinde, serolojik olarak farklı 350'den fazla virus bulunmaktadır. Bu takım içerisinde bulunan viruslar, bitkilerden, böceklerle, kenelere ve omurgalılara (kemirgen, kuş, sürüngen, maymun, yaras, ruminant ve insan vb.) kadar geniş konakçı çeşitliliğine sahiptirler. Takım içerisinde bulunan virusların önemli bir kısmı artropodlar tarafından bulaştırılır ve hem omurgalı hem de artropod konakçı tropizmine sahiptirler. Ayrıca, insan ve hayvanlarda şiddetli hastalık tablosu oluşturan önemli bazı arboviruslar yine bu takım içerisinde yer almaktadır. Ancak, *Hantaviridae* ailesinde bulunan viruslar, sadece memeli tropizmine sahiptir ve aerosol kemirgen dışkıları ile bulaşarak insanlarda hastalık meydana getirirler. Ayrıca, bitki patojeni olan *Tospoviridae* ailesindeki viruslar, mekanik olarak böceklerle nakledilerek tarımda ciddi kayıplara neden olmaktadır. Bu takım içerisinde bulunan viruslar dünya genelinde geniş bir alanda bulunmakla birlikte, tropik ve subtropik bölgelerde daha yüksek çeşitlilikte ve daha yüksek prevalansta bulunmaktadır. Bazı viruslar, yeni coğrafik bölgelerde görülmeye başlamaları veya insan ve hayvanlarda görülme insidenslerinin artmasından dolayı emerging veya re-emerging patojenler olarak düşünülmektedirler (Marklewitz, 2016).

Çizelge 1.3. *Bunyavirales* takımı içerisinde sınıflandırılan virus aile ve cinsleri (ICTV, 2017).

VİRUS AİLESİ	VİRUS CİNSİ	VİRUS TÜR SAYILARI
<i>Feraviridae</i>	<i>Orthoferavirus</i>	1 Virus Türü
<i>Fimoviridae</i>	<i>Emaravirus</i>	9 Virus Türü
<i>Hantaviridae</i>	<i>Orthohantavirus</i>	41 Virus Türü
<i>Jonviridae</i>	<i>Orthojonvirus</i>	1 Virus Türü
<i>Nairoviridae</i>	<i>Orthonairovirus</i>	12 Virus Türü
<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Herbevirus</i>	4 Virus Türü
	<i>Orthobunyavirus</i>	48 Virus Türü
<i>Phasmaviridae</i>	<i>Orthophasmavirus</i>	6 Virus Türü
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Goukovirus</i>	3 Virus Türü
	<i>Phasivirus</i>	4 Virus Türü
	<i>Phlebovirus</i>	10 Virus Türü
	<i>Tenuivirus</i>	7 Virus Türü
<i>Tospoviridae</i>	<i>Orthotospovirus</i>	11 Virus Türü

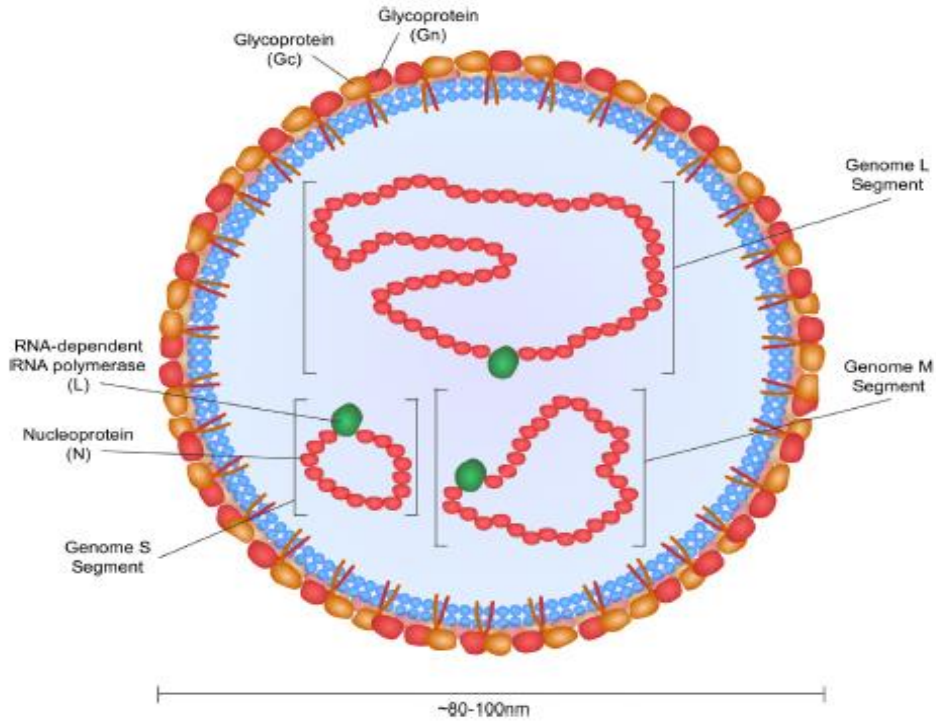
Nairoviridae ailesinde, *Orthonairovirus* cinsi ve 12 adet virus türü bulunmaktadır (ICTV, 2017). Bu aile içerisinde, kenelerden ve omurgalı konakçılardan izole edilmiş en az 50 virus bulunmaktadır. *Nairoviridae* ailesinde bulunan, KKKAV, insanlarda kanamalı ateş tablosu yaparken, *Nairobi sheep disease orthonairovirus* (NSDV) ise koyun ve keçilerde ölüm oranı %90'a ulaşan kanamalı gastroenteritis'e neden olmaktadır. Bazı viruslar ise insanlarda, ateş, baş ağrısı ve nörolojik bozukluklara neden olmaktadır (Walker ve ark., 2015). Yapılan filogenetik analizlere göre, NSDV, *Hazara orthonairovirus* (HAZV) ve *Dugbe orthonairovirus* (DUGV) diğer *Orthonairovirus*'lara göre KKKAV'na daha fazla benzerlik göstermektedirler (Kuhn ve ark., 2016). *Nairoviridae* ailesinde bulunan virus cinsi, virus türleri ve içerdikleri viruslar Çizelge 1.4.'de gösterilmiştir (ICTV, 2017; Kuhn ve ark., 2016).

Çizelge 1.4. *Nairoviridae* ailesinde bulunanlar başlıca viruslar (ICTV, 2017; Kuhn ve ark., 2016).

VİRUS CİNSİ	VİRUS TÜRÜ	VİRUSLAR
<i>Orthonairovirus</i>	<i>Burana orthonairovirus</i>	Huangpi tick virus 1 Tacheng tick virus 1 Wenzhou tick virus
	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus</i>	Crimean-Congo hemorrhagic fever virus
	<i>Dera Ghazi Khan orthonairovirus</i>	Abu Hammad virus (Tunis izolatu dahil) Abu Mina virus Dera Ghazi Khan virus Sapphire II virus
	<i>Dugbe orthonairovirus</i>	Dugbe virus Kupe virus
	<i>Hazara orthonairovirus</i>	Hazara virus Tofla virus
	<i>Hugbes orthonairovirus</i>	Caspiy virus Farallon virus Great Saltee virus Hugbes virus Punta Salinas virus Raza virus Soldado virus Zirqa virus
	<i>Kasokero orthonairovirus</i>	Kasokero virus Leopards Hill virus Yogue virus
	<i>Keterah orthonairovirus</i>	Gossas virus Issyk-kul virus Keterah virus (Yumuşak kene izolatu dahil) Uzun-Agach virus
	<i>Nairobi sheep disease orthonairovirus</i>	Ganjam virus Nairobi sheep disease virus (Ganjam izolatu dahil)
	<i>Qalyub orthonairovirus</i>	Bandia virus Qalyub virus
	<i>Sakhalin orthonairovirus</i>	Avalon virus Clo Mor virus Sakhalin virus Taggert virus Tillamook virus
	<i>Thiafora orthonairovirus</i>	Erve virus Thiafora virus

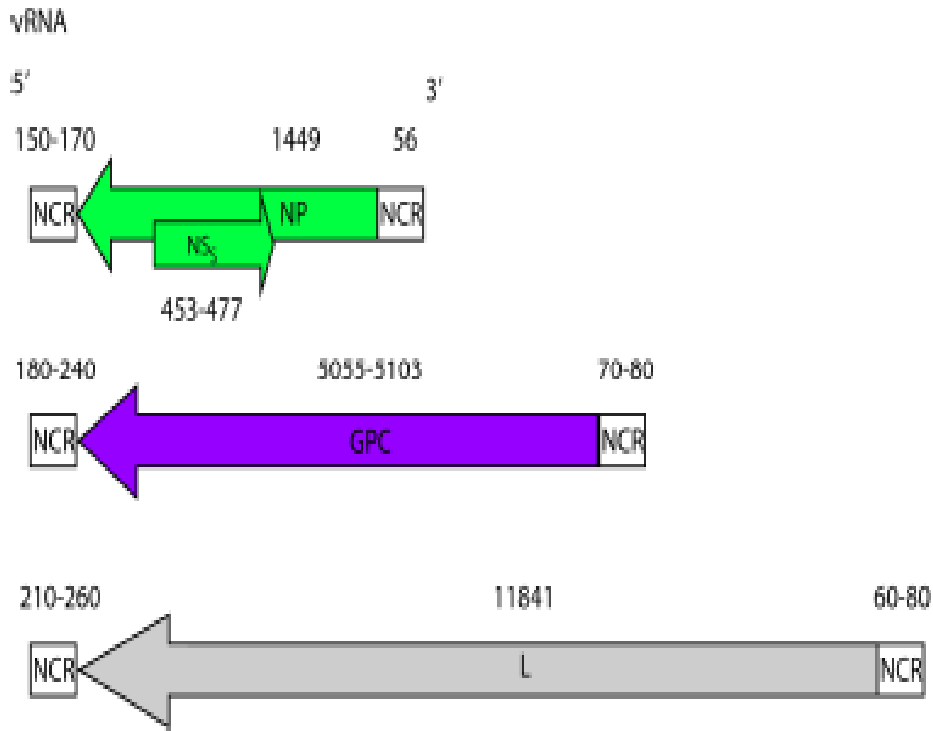
1.2.2. Virusun Yapısı ve Özellikleri

KKKAV virionu, yaklaşık 80-100 nm çapında helikal simetrik nükleokapside ve konakçı hücrelerinden köken alan 5-7 nm kalınlığında çift katmanlı bir zarfa sahiptir (Demir ve ark., 2017; Whitehouse, 2004). Nükleik asit olarak tek sarmallı, negatif polariteli ve üç segmentli RNA bulunur (Demir ve ark., 2017). KKKAV'nin, small (S) segmenti, medium (M) segmenti ve large (L) segmentinin 5'-3' uçlarında protein kodlamayan tamamlayıcı bölgeler (NCR) bulunur ve virus genomunun dairesel yapısına katkı sağlarlar. Ayrıca NCR'ler, viral RNA'ya bağlı RNA polimerazların (RdRp) bağlanması ve viral genomun transkripsiyonu ve/veya replikasyonu başlatması için gereklidir. NCRs dizileri, viral segmentler arasında farklı olmasına rağmen, her biri yeni oluşan virion genomlarının enkapsülasyonu, transkripsiyonu, replikasyonunu ve paketlenmesini başlatabilirler (Zivcec ve ark., 2016). KKKAV virionu şematik olarak Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Bente ve ark., 2013).

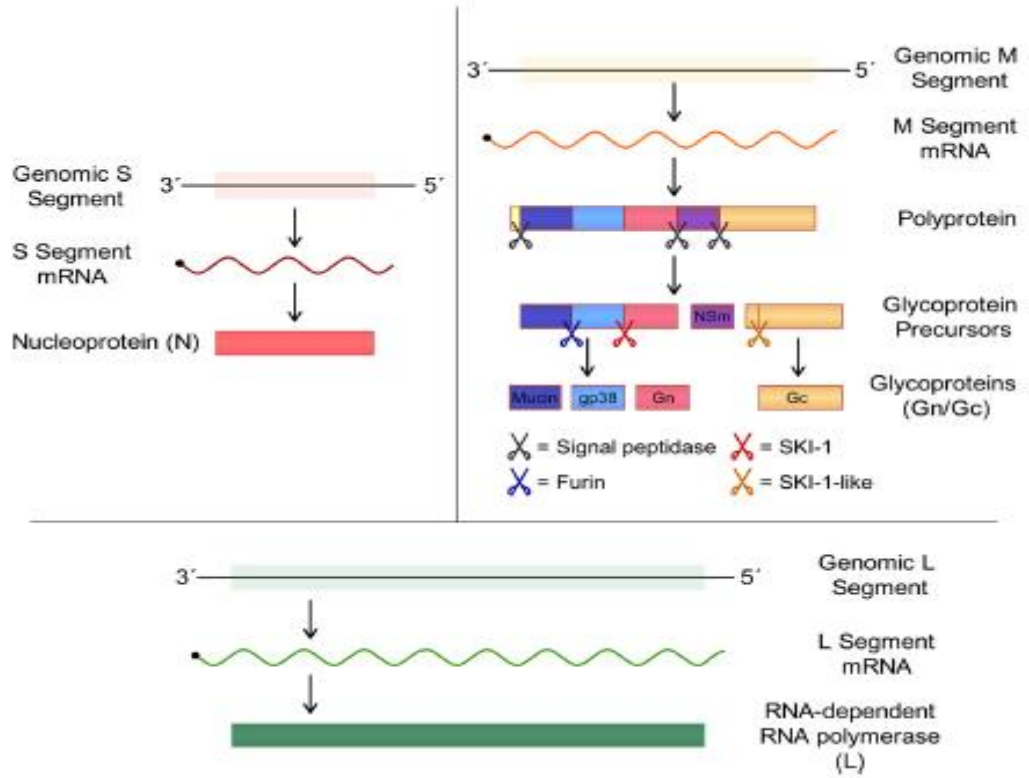


Şekil 1.1. KKKAV virionunun şematik olarak gösterilmesi (Bente ve ark., 2013).

KKKAV RNA'sının S segmenti, diğer bunyavirüsler gibi yaklaşık 1.6 kb büyüklüğünde olup, nükleokapsid proteinini (NP) kodlar. Diğer bunyavirüsler gibi daha uzun olan M segmenti yaklaşık 5.4 kb ve L segmenti yaklaşık 12.1 kb büyüklüğünde olup, sırasıyla glikoprotein presürkor (GPC) ve RdRp'i (L protein) kodlarlar (Zivcec ve ark., 2016). M segmenti tarafından kodlanan GPC, tek bir protein olarak sentezlenir ve transkripsiyon sonrasında çeşitli enzimler tarafından kesilerek yüzey glikoproteinleri Gn ve Gc meydana gelmektedir (Whitehouse, 2004). KKKAV'nin üç segmentinin her birinde bir protein kodladığı yolundaki bilgiye ilave olarak S segmenti tarafından NP'nin kodlandığı bölgenin ters yönünde yapısal olmayan (NSs) ikinci bir protein kodladığı ve bu nedenle KKKAV'nin ambisense virus olabileceği bildirilmektedir (Zivcec ve ark., 2016). KKKAV segmentlerinin büyüklükleri ve proteinlerin kodlanma yönleri Şekil 1.2.'de, protein ürünlerinin prosesi Şekil 1.3.'de gösterilmiştir (Bente ve ark., 2013; Zivcec ve ark., 2016).



Şekil 1.2. KKKAV'nin segmentlerinin büyüklükleri ve protein kodlama yönleri (Zivcec ve ark., 2016).



Şekil 1.3. KKKAV'nin segmentleri tarafından kodlanan protein ürünlerinin prosesi (Bente ve ark., 2013)

S segmenti tarafından kodlanan NP'nin birincil fonksiyonu, viral RNA'ların (vRNA) enkapsülasyonu ile ribonükleoprotein kompleksini (RNP) oluşturmaktır. RNP'ler, vRNA, NP ve L proteinin enkapsülasyonu ile oluşur. NP, globüler baş ve esnek kol olarak iki yapıdan meydana gelmektedir. Globüler baş kısmı, RNA ile bağlanmaktan sorumludur. Virion RNA'sının enkapsülasyonu sırasında, RNA'ya bağlanmış globüler baş kısmı ile komşu NP'nin kuyruk kısmı etkileşime girerek helikal yapıyı meydana getirmektedirler (Bente ve ark., 2013; Zivcec ve ark., 2016). Bakteriyel olarak eksprese edilen NP, virus spesifik immunoglobulin G'yi (IgG) saptamak için Enzim-Linked Immunosorbent Assay'da (ELISA) kullanılabilir (Bente ve ark., 2013).

M segmenti tarafından, GPC kodlanmaktadır. GPC'den, endoplazmik retikulumda (ER) başlayıp, golgi aparatında sonlanan co-translasyonel ayrılma ve post-translasyonel işleme ile iki transmembran glikoproteini Gn ve Gc meydana gelmektedir (Bente ve ark., 2013). Gn ve Gc glikoproteinlerinin füzyon, virion

oluşumu ve immün sistemden kaçış konularıyla ilgili oldukları düşünülmektedir. Ayrıca füzyona aracılık ettiklerine inanılmaktadır (Zivcec ve ark., 2016). GPC önce konakçı sinyal peptidazı ile 140 kDa olan PreGn ve 85 kDa olan PreGc parçalarına bölünmektedir. PreGn daha sonra, konakçı proteazları olan SKI-1 ve furin tarafından, çeşitli tanıma bölgelerinden kesilerek 58 kDa olan Gn ve birçok küçük yapısal olmayan protein parçalarına bölünmektedir. Ayrıca PreGc, SKI-1 benzeri proteaz ile kesilerek Gc meydana gelmektedir. SKI-1'den yoksun hücrelerde, PreGn ve PreGc golgi aparatında birikir ve enfekte hücrelerden yüzey glikoproteinlerden yoksun virus partikülleri salınmaktadır (Bente ve ark., 2013).

KKKAV ve diğer nairovirusların L segmenti, diğer bunyaviruslara göre neredeyse iki kat büyüklüktedir. Tek açık okuma çerçevesi (ORF), 12000 nükleotidden daha uzundur ve yaklaşık 4000 amino asitlik bir poliproteini kodlamaktadır. L segmentin, N-ucuna yakın bölgeden ovaryan tümör proteaz, sonrasında viral topoizomeras, zinc finger ile lösin fermuar motifleri ve C-ucuna yakın bölgeden ise RdRp kodlanır (Bente ve ark., 2013). L segmenti tarafından kodlanan viral endonükleaz ise, konakçı mRNA'larını parçalamakta ve viral transkripsiyonu başlatmaya katkı sağlamaktadır. KKKAV RNA'sının 5' ucu, diğer birçok RNA virusunun trifosfat grubunu (5'-pppRNA) kullanmasının aksine monofosforile edilmiştir. KKKAV genom 5' ucunun monofosfat grubu prosesi, tercihen 5'-pppRNA tarafından aktive edilen retinoik asitle indüklenebilen gen I'in (RIG-I) baskılanması sonucunda doğal immün yanıttan kaçınmak için olası bir stratejidir. Bununla beraber, KKKAV'ye karşı tip-I IFN cevabının şekillenmesi için RIG-I gerekmektedir (Zivcec ve ark., 2016).

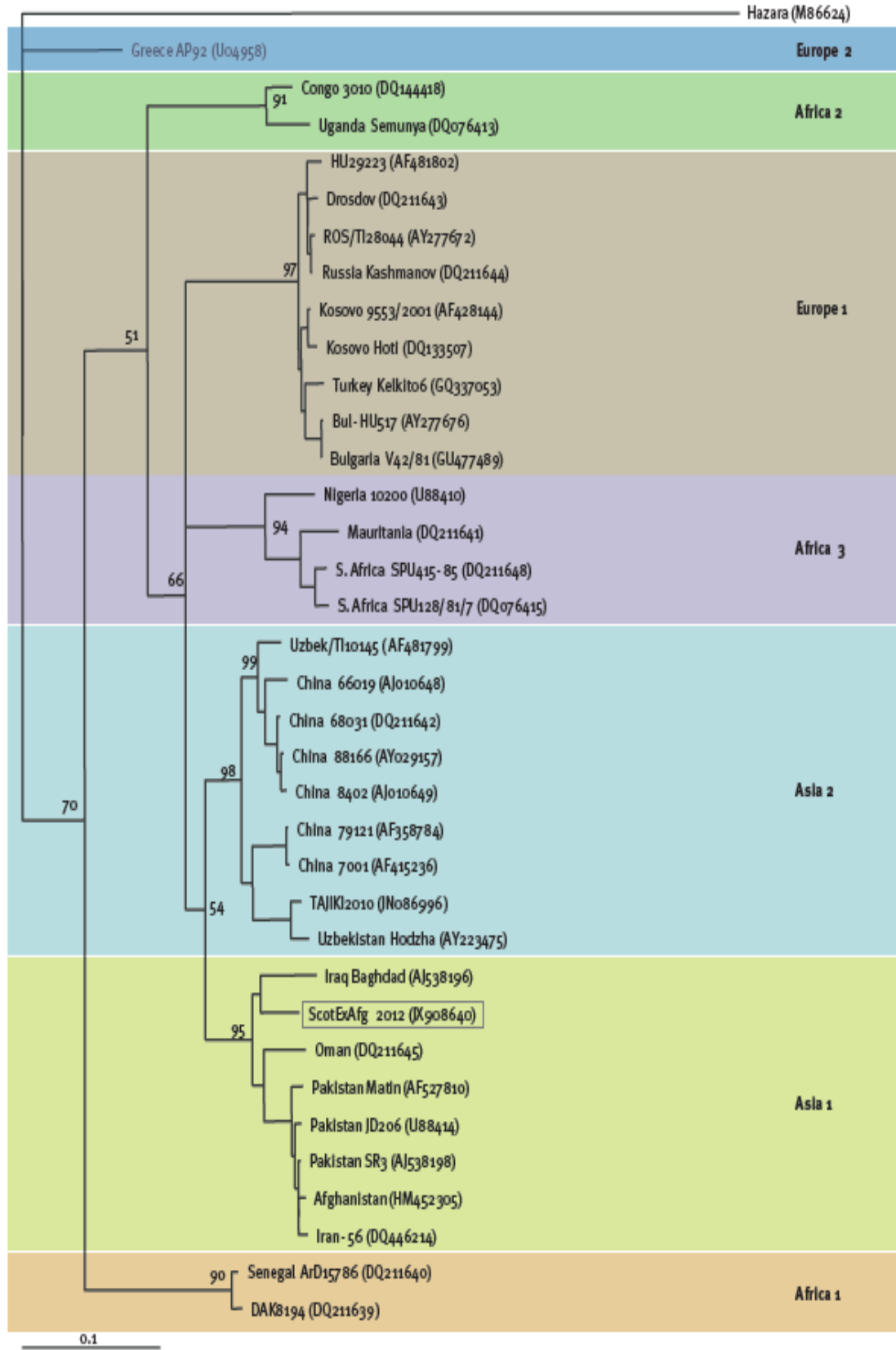
KKKAV izolatları arasında, agar jel immundifüzyon, nötralizasyon, hücre kültürü interferans, komplement fikzasyon testi gibi serolojik testlerle yapılan çalışmalarda görünür antijenik farklılıkların olmadığı anlaşılmıştır. Fakat, yapılan filogenetik analizlerle, geniş genetik çeşitlilik ortaya konulmuştur (Whitehouse, 2004). Amino asit sekansına dayanan filogenetik çalışmalar, KKKAV'nin S

segmenti başta olmak üzere M segmenti ve L segmentine göre yapılmaktadır (Ozkaya ve ark., 2010). Yapılan filogenetik analizlerde coğrafik dağılımları farklı, S segmentine göre yedi virus hattı bulunmaktadır (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Mild ve ark., 2010). Bu virus hatları, hat I (Asya I), hat II (Asya II), hat III (Afrika III), hat IV (Avrupa I), hat V (Afrika II), hat VI (Avrupa II) ve hat VII (Afrika I) olarak adlandırılmaktadır (Atkinson ve ark., 2012; Ergonul ve Whitehouse, 2007; Mild ve ark., 2010). Birçok ülkede, birden fazla virus hattına ait KKKAV enfeksiyonları görülebilmektedir. Örneğin, İran’da, dört farklı virus hattı (Asya I, Asya II, Avrupa I ve Afrika I) görülürken, Güney Afrika’da üç farklı virus hattı (Afrika I, Afrika II ve Afrika III) görülebilmektedir. S segmenti analizlerine göre, KKKAV hatlarının coğrafik dağılımı Çizelge 1.5.’de gösterilmiştir (Mild ve ark., 2010). Araştırmacılara göre, M veya L segmentlerinin filoetik analizlerine dayanarak 5-7 farklı hat ortaya konulmaktadır (Bente ve ark., 2013; Chinikar ve ark., 2016; Ergonul ve Whitehouse, 2007; Mild ve ark., 2010).

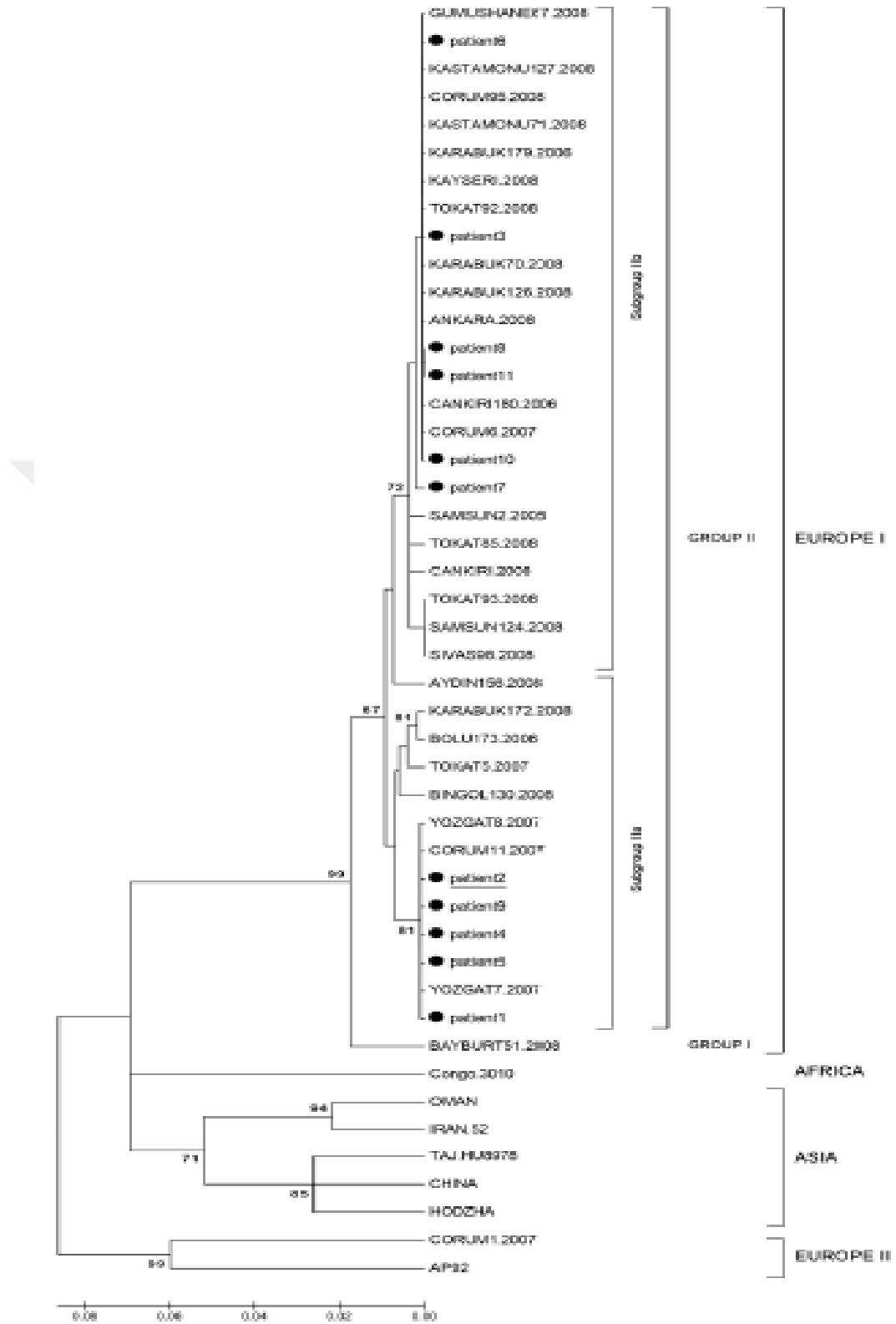
Çizelge 1.5. KKKAV hatlarının coğrafik dağılımı (Mild ve ark., 2010). BAE; Birleşik Arap Emirlikleri, DKC; Demokratik Kongo Cumhuriyeti, OAC; Orta Afrika Cumhuriyeti.

Hat I (Asya I)	Hat II (Asya II)	Hat III (Afrika III)	Hat IV (Avrupa I)	Hat V (Afrika II)	Hat VI (Avrupa II)	Hat VII (Afrika I)
İran Pakistan BAE Madagaskar Umman Irak	İran Çin Özbekistan Kazakistan Tacikistan	Güney Afrika Namibya BAE Senegal Moritanya Nijerya Burkina Faso OAC	İran Türkiye Yunanistan Rusya Bulgaristan Kosova Arnavutluk	Güney Afrika Namibya DKC Uganda	Yunanistan Türkiye	İran Güney Afrika Senegal Moritanya

Ülkemizde görülen KKKAV izolatları, Avrupa I ve Avrupa II hatları içerisinde yer almaktadır (Mild ve ark., 2010). Ozkaya ve ark. (2010) ile Kalaycioglu ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmalarda, KKKAV’nin S segmenti filogenetik analizlerine göre, ülkemizde bulunan izolatlar genel olarak Avrupa I hat içerisinde yer alırken, bazı izolatlar da Avrupa II hat içerisinde tespit edilmiştir. S segmenti analizlerine göre yedi hatta ait filogenetik analiz sonuçları Şekil 1.4.’de ve ülkemiz izolatlarına ait filogenetik analiz sonuçları ise Şekil 1.5.’de gösterilmiştir (Atkinson ve ark., 2012; Ergunay ve ark., 2014).



Şekil 1.4. KKKAV'nin S segmentine göre filogenetik analizi (Atkinson ve ark., 2012).



Şekil 1.5. Ülkemiz KKKAV izolatlarının, S segmentine göre filogenetik analizi (Ergunay ve ark., 2014).

Ülkemiz KKKAV izolatları ile yapılan çalışmalarda, Avrupa I hat içerisinde iki adet grup tanımlanmıştır. Grup I içerisinde, BYBRT51/08 ve ARTVN155/08 izolatları ile Doğu Avrupa izolatları olan Drostov ve Kashmanov izolatları yer almaktadır. Daha büyük olan grup II, iki adet alt gruptan oluşmaktadır. Alt grup IIa içerisinde bulunan ülkemiz izolatlarının, Batı Avrupa izolatları (HOTI, KOSOVO ve BULG2008 vb.) ile genetik yakınlık gösterdikleri saptanmıştır. Alt grup IIb'nin büyük bir çoğunluğunu ise, ülkemiz izolatları oluşturmaktadır. Ayrıca ülkemiz KKKAV izolatları Avrupa II hat içerisinde de yer almaktadır. Avrupa II hat içerisinde, ülkemiz izolatlarından CRM1/07 ve KMAG-Hu0701 ile Yunanistan izolatı olan AP92 yer almaktadır. Ülkemizde kenelerden izole edilen, Tr-T-03, Tr-T-06 ve Tr-T-11 izolatları da yine Avrupa II hat içerisinde yer almaktadır (Kalaycioglu ve ark., 2012; Ozkaya ve ark., 2010).

1.2.2.1. Genetik Farklılıklar

RNA genomuna sahip Arboviruslar, genellikle düşük seviyede genetik çeşitlilik göstermektedirler. Bu durumun nedeni, artropod ve omurgalı konakçıların her ikisine de yüksek uyumluluğun devamına izin veren "çift filtre" seleksiyon mekanizması olarak gösterilebilir. Ancak yapılan çalışmalarda, diğer arbovirusların aksine KKKAV'nin yüksek seviyede genetik çeşitliliğe sahip olduğu anlaşılmıştır (Carroll ve ark., 2010). Filogenetik çalışmalarda, arboviruslarda tespit edilen en yüksek genetik farklılık, S, L ve M segmentleri itibarıyla sırasıyla, %20, %22 ve %31 oranlarında KKKAV izolatlarında görülmektedir. Filogenetik sınıflandırmaların genişliğine yansıyan bu belirgin varyasyonlar, RdRp ile kopyalama hatalarının progresif birikmesine yani "genetik drift mutasyonlarına" dayandırılabilir (Bente ve ark., 2013). Ayrıca, reassortment ve rekombinasyon, KKKAV'de bulunan yüksek genetik varyasyona katkıda bulunmuş gibi görünmektedir (Carroll ve ark., 2010). Yapılan filogenetik analizler, KKKAV'nin bugünkü genetik çeşitliliğine katkıda bulunan aşağıdaki kanıtları ortaya koymaktadır. Bu kanıtlar:

- Çoğu aynı coğrafik bölgede izole edilen ve ortak bir atayı paylaşan ayrı virus hatlarının varlığı (hepsinde değil),
- Uzak yerlerde izole edilmiş virusların aynı hatlarda yer alması,
- Bazı virusların filogenetik analizlerde, S, M ve L segmentlerinin benzer olmayan yerlerde sınıflandırılması, segmentlerinin farklı evrim geçmişlerinin olduklarını göstermesi yani genetik reassortment oluşumu,
- Virusların bireysel filogenetik analizlerinde hemen göze çarpmayan farklılıklar, genom segmentlerinin hizalandığı zaman ortaya çıkan tutarsız sekans kesikliklerinin varlığı yani genetik rekombinasyon oluşumudur (Bente ve ark., 2013).

KKKAV gelişimini şekillendirmek için doğal seleksiyonda gerekli olan genetik çeşitlilik, RdRp tarafından dizileme hataları ile sağlanmıştır. Örneğin, bu hatalı dizilimlerin birçok farklı kene ve omurgalı konakçıya adaptasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. KKKAV'nin filogenetik analizlerinde, farklı coğrafik alanlarda görülen çeşitli hatlara sahip olması, virusun tek bir homojen coğrafik bölgede bulunmadığını göstermektedir. Bu geniş coğrafik alanlar, iklim, bitki örtüsü, diğer çevre koşulları, mevcut kene türleri ve konakçı durumu ile çeşitlilik gösterdiği halde, KKKAV, bu değişen durumlara aşamalı olarak adaptasyon göstererek yerel virus varyantlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır (Bente ve ark.,2013).

KKKAV'nin M segmentinin genetik farklılıkları daha fazladır. M segmentinin genetik çeşitlilikleri, hücre yüzey reseptörlerine bağlanmada görevli Gn ve Gc glikoproteinlerinde farklılıklara neden olmakla birlikte birçok farklı ve omurgalı konakçıda enfeksiyonun şekillendirmesini kolaylaştırmaktadır. Gn ve Gc, nükleotid seviyesinde yüksek seviyede çeşitlilik gösterse de antijenik değişiklik aynı seviyede görülmemektedir. M segmentinin aksine, L segmenti izolatlar arasında amino asit kimliğini %90'a kadar korumaktadır. Bu analiz, L segmentinin, S ve M segmentine kıyasla daha yavaş evrimleştiğini göstermektedir. Bu yavaş evrimleşme, L segmenti tarafından kodlanan RdRp'nin etkin işlev gösterebilmesi için gerekli olan şartlarla

açıklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, üç segmentte, yılda 10^{-4} nükleotidde değişiklik olduğunu veya tüm genomda yaklaşık iki nükleotidin değişiklik geçirdiğini göstermektedir. Aynı çalışmalarda, M segmentinin, S veya L segmentine göre daha hızlı evrimleştiği rapor edilmiştir (Bente ve ark., 2013).

Lukashev (2005) tarafından yapılan araştırmada, KKKAV genom segmentleri arasındaki rekombinasyon ortaya konulmuş ve Deyde ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışma ile de bu durum doğrulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, S segmentinde meydana gelen rekombinasyonlara ait sağlam kanıtlar gösterilirken, diğer segmentlerde durumun daha az açık olduğu belirtilmiştir (Lukashev, 2005).

Yapılan çalışmalarda, KKKAV'nin M segment reasortment olayları S ve L segmentlerinden daha sık olduğu ifade edilmiştir. Reasortment meydana gelmiş KKKAV'lerde daha sıklıkla S ve L segmentleri filogenetik olarak aynı hat içerisinde yer alırken, M segmenti farklı bir hat içerisinde yer almaktadır (Bente ve ark., 2013; Chamberlain ve ark., 2005; Deyde ve ark., 2006). Araştırmacılar tarafından, S ve L segmentlerinde meydana gelen reasortmentlar da bildirilmiştir (Carroll ve ark., 2010; Deyde ve ark., 2006). S ve L segmentlerinin bir arada kalma eğilimleri, aynı evrimsel atadan köken alan NP ve RdRp'ye sahip virusların, bu proteinler bakımından farklı evrimsel geçmişi olan viruslardan daha verimli şekilde replike olduğunu ve Gn ve Gc'de meydana gelen değişimlerin daha az etkiye sahip olduklarını düşündürmektedir (Bente ve ark., 2013). Omurgalılarda virus replikasyonun nispeten kısa olması, kenelerin birkaç yıllık hayatları boyunca enfekte halde kalabilmeleri, tekrarlanan kan alımları sırasında birden fazla KKKAV izolatu ile enfekte olabilme ihtimalleri neticesinde reasortment'in meydana gelme ihtimalinin omurgalılardan daha fazla olduğu düşündürmektedir (Bente ve ark., 2013; Deyde ve ark., 2006). Ayrıca Burt ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, Afrika'da meydana gelmiş, ölüm oranı yüksek olan vakalardan izole edilen KKKAV'lerin M segmentinde reasortment meydana geldiğini ve Asya hatlarında yer aldığını saptamışlardır.

Araştırmacılar tarafından, reassortment'in virus patojenitesini etkileyebileceği de bildirilmiştir (Burt ve ark., 2009).

1.2.2.2. Replikasyon

KKKAV'nin hedef hücre yüzeyine ilk bağlanması, Gn ve/veya Gc glikoproteinleri aracılığı ile olmaktadır. Gc glikoproteinini hedef alan monoklonal antikorlar ile memeli hücrelerinde KKKAV enfeksiyonunun nötralize edilebildiği için hücresel reseptörlere bağlanmada Gc'nin asıl sorumlu glikoprotein olduğu düşünülmektedir (Zivcec ve ark., 2016). Ancak, KKKAV için hücresel reseptör tanımlanmamıştır. Konakçı molekülü olan nükleolinin, virusun hücreye girişinde gerekli olduğu bildirilmektedir (Bente ve ark., 2013). Virus, hücresel reseptöre bağlandıktan sonra klatrin aracılı endositoz mekanizması ile hücreye girmektedir (Bente ve ark., 2013; Zivcec ve ark., 2016). Giriş için, klatrin ve klatrin çukur adaptör protein-2 kompleksi gereklidir. Ancak, kaveolin-1 gerekmemektedir. KKKAV'nin hücreye girişi aynı zamanda, kolesterol ve düşük pH'ya da bağlıdır. Endositozu takiben, KKKAV partikülleri erken endozomlara ve sonrasında Rab5'e bağımlı bir süreçle multiveziküler cisimlere (MVB) taşınır. MVB'ler, virus zarfının hücre membranıyla birleştiği muhtemel ana organellerdir (Zivcec ve ark., 2016).

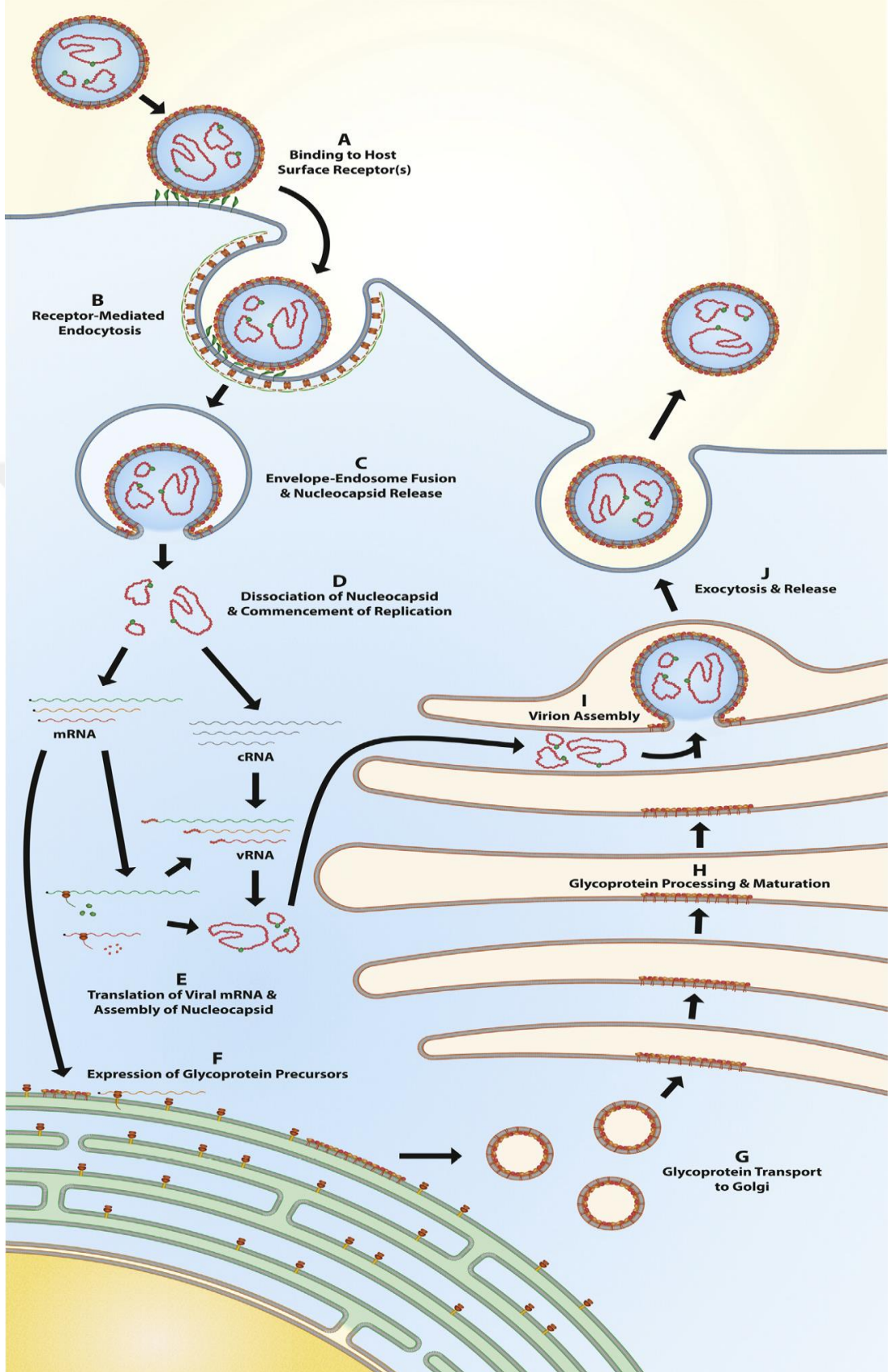
Virus replikasyonu, konakçı hücre sitoplazmasında meydana gelmektedir (Whitehouse, 2004). Virusun hücreye girişi ve füzyonunu takiben, genomik RNP'ler sitozole salınırlar. Enkapside vRNA'lar, RdRp tarafından viral mRNA sentezi için kalıp görevi görmektedirler (Zivcec ve ark., 2016). RdRp, endonükleaz aktivitesi sayesinde, konakçı hücre mRNA'larının 5'-cap bölgelerini keserek viral mRNA'lara eklemektedir (Kep aşırma-cap snatching) (Murphy ve ark., 1999).

Genomik RNP'lerin replikasyonu, negatif polariteli vRNA ile pozitif polariteli komplementer RNA'ların (cRNA) replikasyonunu ve enkapsidasyonunu gerektiren

bir süreçtir. RNP'lerin replikasyonu minimum L proteinine ve NP'lere gereksinim duymaktadır. Komplementer RNA'nın enkapside formu, antigenomik RNP ve vRNA'nın enkapside formu ise genomik RNP olarak tanımlanmaktadır. KKKAV negatif polariteli bir RNA virusu olduğu için genomik RNP'ler, kep aşırma yapılmış mRNA sentezi ve antigenomik RNP'lerin üretimi için kalıp olarak kullanılmaktadır. Genomik RNP'lerin sentezi için ise, antigenomik RNP'lerin cRNA'sı kalıp olarak kullanılmaktadır. RNP'ler ile ilgili prosesler, sitoplazmik ribozomlar aracılığı ile gerçekleşmektedir (Zivcec ve ark., 2016).

RNP replikasyonunu, viral protein işleme ve ardından olgunlaşma takip eder. GPC ile ilgili işlemlerin, ER-ilişkili ribozomlarda olduğu düşünülmektedir. GPC'nin olgunlaşması neticesinde yapısal glikoproteinler Gn ve Gc ile yapısal olmayan M proteini (NSM) ve diğer yapısal olmayan proteinler oluşmaktadır. Glikoproteinlerin oluşumu için, GPC glikozilasyona uğrar ve ardından hücre proteazları tarafından kesilerek proteolitik ayrılma şekillenir. GPC, elongasyon ve ER'ye translokasyonu ile, glikolize olur, katlanır ve intra-moleküler disülfid köprüleri oluşur. Bu yapı daha sonra PreGn, PreGc ve NSM'ye bölünmektedir. ER'deki olgunlaşmadan sonra PreGn ve PreGc golgi kompleksine taşınmaktadır. PreGn, konakçı proteazı SKI-1 ile kesilerek Gn ve PreGc ise, SKI-1 benzeri proteaz ile kesilerek Gc'ye dönüşmektedir (Zivcec ve ark., 2016).

KKKAV'nin toparlanması ve virus saçılımı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Diğer bunyaviruslarda olduğu gibi, RNP'ler büyük olasılıkla sitoplazmada ve NP'lerin ise golgi kompleksine yakın perinükleer bölgede bulundukları düşünülmektedir. KKKAV partikülleri toparlanmayı takiben, çoğunlukla tespit edilebilir sitopatoloji meydana getirmeden, bazolateral membrandan ekzositoz ile salınmaktadırlar (Zivcec ve ark., 2016). KKKAV'nin replikasyonu Şekil 1.6.'da gösterilmiştir (Bente ve ark., 2013).



Şekil 1.6. KKKAV'nin hücre içi replikasyon siklusu (Bente ve ark., 2013).

1.3. Epidemiyoloji

1.3.1.Bulaşma

Zoonoz karakterli KKKAV'nin, en önemli bulaşma yolu virus ile enfekte kenelerdir. Virus, kene-omurgalı-kene enzootik döngüsü ile doğada sirküle olmaktadır (Mertens ve ark., 2013). Virus omurgalı konakçılarda, birkaç haftayı geçmeyen viremi meydana getirirken, keneler yaşamları boyunca enfekte kalmaktadırlar. Bu nedenle, keneler hem hastalığın vektörü hem de virusun doğadaki uzun dönem rezervuarı olarak kabul edilirler (Spengler ve ark., 2016b). İnsanların enfekte keneler tarafından ısırılması, en önemli bulaşma kaynağı olarak kabul edilmekle birlikte, enfekte kenelerin ezilmesiyle de hastalık bulaşabilmektedir. Çeşitli kene cinslerinde virus tespit edilmiş olmasına rağmen, KKKAV'nin asıl vektörü *Hyalomma* cinsi keneler olarak kabul edilmektedir (Weidmann ve ark., 2016). Virusun, kan emici sinekler gibi diğer bazı artropodlarda da tespit edilmesine rağmen, sivrisineklerin veya diğer artropodların etken için kompetant vektör olduğuna yönelik kanıt bulunmamaktadır. Kene dışındaki diğer artropodlarda virusun varlığı, viremik bir memeli kanının emildiğinin göstergesi olarak düşünülmektedir (Bente ve ark., 2013).

Hastalığın bulaşması, viremik hayvanların kan ve dokuları veya hasta insanların kan ve diğer vücut sıvıları ile temasla da meydana gelebilmektedir (Weidmann ve ark., 2016). KKKAV enfeksiyonlarında, nosokomial bulaşmada görülmektedir. Hasta insanların kan veya diğer materyallerine korumasız temas, enfekte iğnelerin kaza sonucu bakması ve ameliyat sırasında meydana gelen kazalar veya yeterli koruma önlemlerinin alınmaması, nosokomial bulaşmanın başlıca sebeplerini oluşturmaktadır (Mertens ve ark., 2013).

1.3.1.1.Kene İlişkili Bulaşma

KKKAV'nin kenelerdeki prevalansına yönelik, farklı test yöntemleriyle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bu yayınlara göre KKKAV'nin kenelerdeki prevalansı, İran'da 2010 yılında %26,2, Türkiye'de 2010 yılında %11,76-22,7 arasında, Bulgaristan'da 2014 yılında %6,3-15,7 arasında, Gana'da 2011 yılında %5,15, Arnavutluk'ta 2005 yılında %3 olarak tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Akuffo ve ark., 2016; Hekimoglu ve ark., 2012; Keshtkar-Jahromi ve ark., 2013; Mertens ve ark., 2013; Panayotova ve ark., 2016). İnsanlarda, enfeksiyonunun meydana gelmesinde en önemli sebep enfekte keneler tarafından ısırılma olarak kabul edilmekle birlikte, insan vakalarında kene ısırılması sıklığı açısından ülkeler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Arnavutluk'ta, insan vakalarının %17,3'ü kene tarafından ısırılma geçmişine sahipken, Türkiye'de bu oran %68,9 gibi çok daha yüksek bir seviyeye ulaşabilmektedir. Ancak, keneler tarafından ısırılan tüm insanlarda klinik belirtiler veya antikor cevabı şekillenmemektedir. Yapılan bir araştırmaya göre, kene ısırılması geçmişine sahip olan sağlıklı insanlarda, seroprevalans sadece %10 tespit edilmiştir. Buna sebep olarak, kenelerdeki düşük KKKAV'nin prevalansı veya zayıf virus nakledilme etkisi gösterilebilir (Mertens ve ark., 2013). Ayrıca yapılan çalışmalarda, kene homojenizatlarında virus titresi $6,8 \times 10^7$ kopya/mL ile $4,8 \times 10^1$ - $2,66 \times 10^6$ kopya/mL arasında bulunmuştur (Mertens ve ark., 2013; Özüpak, 2017).

Hastalığın insanlara bulaşmasında asıl kaynak olan keneler çeşitli coğrafyalarda, çeşitli iklim şartlarında yaşayabilmektedirler. İklim şartları ve coğrafik bölgelere göre kenelerin aktif oldukları dönemler değişmekle birlikte, KKKAV hastalığının en sık görüldüğü ülkelerden biri olan Türkiye'de, yetişkin keneler Nisan-Kasım aylarında aktifken, kenelerin larva formları ise Haziran ile sonbaharın sonlarına kadar aktif olabilmektedirler. Türkiye'de insan vakalarının yaklaşık %70'i Haziran ve Temmuz aylarında meydana gelmektedir (Mertens ve ark., 2013). Fakat, Aralık ayı içerisinde kene ısırılması sonucu meydana gelmiş KKKAV hastalığı da bildirilmiştir (Köksal ve ark., 2011).

Günümüze kadar, *Argasidae*, *Ixodidae* ve *Nuttalliellidae* ailelerinde 907 adet kene sınıflandırılmıştır (Bowman ve Nuttall, 2008; Hekimoglu ve ark., 2012). Bu kenelerin yaklaşık %10'unun insan ve hayvanlara, patojen etkenlerin bulaştırılmasından sorumlu olduğu belirtilmiştir (Jongejan ve Uilenberg, 2004). KKKAV ise, 30'dan fazla kene türünde tespit edilmiştir (Spengler ve ark., 2016b). KKKAV'nin tespit edilen kene türlerinin büyük bir kısmı *Ixodidae* ailesinde yer alırken, iki adet tür ise *Argasidae* ailesinde yer almaktadır. Yumuşak kene olarak adlandırılan *Argasidae* ailesindeki kenelerin, virusun yetişkin ve nimf formlarında çoğalmadığından dolayı, etkenin coğrafik yayılımında önemli olmadığı bildirilmektedir (Shayan ve ark., 2015). Ayrıca virus, *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus* spp., *Boophilus* spp., *Ixodes* spp. ve *Dermacentor* spp. gibi kenelerde de tespit edilmiştir (Bente ve ark., 2013; Ergonul, 2006; Keshtkar-Jahromi ve ark., 2013; Shayan ve ark., 2015). KKKAV'nin bir kene türünde tespit edilmesi, kenenin enfekte bir memelide beslendiğine işaret etmektedir. Ancak, virusun yayılımında etkisinin olabilmesi için kompetant vektör olması gerekmektedir. KKKAV tespit edilmiş bir kenenin kompetant vektör olabilmesi için, larva-nimf-yetişkin metamorfozu sırasında dokularında viral replikasyonun desteklenmesi, yetişkin dişilerin virusu yumurtalarına aktarabilmesi veya yetişkin erkeklerin çiftleşme sırasında dişi keneye virusu aktarabilmesi gibi yeteneklerinin olması gerekmektedir (Bente ve ark., 2013). KKKAV'nin başlıca kompetant vektörü olarak *Hyalomma marginatum* kabul edilmektedir (Ergonul, 2006).

Bazı kene türlerinin, virusu transstadial olarak diğer yaşam formlarına aktarabildiği tespit edilmiştir (Whitehouse, 2004). Örneğin, *Hyalomma*, *Dermacentor* ve *Rhipicephalus* cinsinde yer alan bazı kene türleri, virusu larvadan nimfe ve yetişkin yaşam formlarına aktarabilmektedirler (Shayan ve ark., 2015). KKKAV, yetişkin dişi kene tarafından transovarial olarak yumurtalarına aktarılabilirdiği gibi venereal bulaşma da söz konusudur (Mertens ve ark., 2013; Whitehouse, 2004). Ayrıca virus, aynı konakçıda beslenme sırasında enfekte bir kene tarafından enfekte olmayan bir keneye aktarılabilirmekte ve bu durum viremik olmayan bulaşma olarak isimlendirilmektedir (Mertens ve ark., 2013; OIE, 2014).

1.3.1.2. Hayvan İlişkili Bulaşma

Birçok evcil ve yabani hayvan türünde, klinik belirti göstermeden şekillenen vireminin varlığı veya antikor cevabın şekillendiği tespit edilmiştir. KKKAV, evcil ve yabani hayvanlarda hastalığın subklinik seyretmesine rağmen zoonotik öneminden dolayı, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından bildirimi zorunlu hastalık olarak listelenmektedir (Gale ve ark., 2010; OIE, 2014).

KKKAV'nin doğadaki sirkülasyonunda, kene-omurgalı-kene döngüsünde asıl önemli rol vektör kenelerde olmakla birlikte, viremik dönemde olan hayvanlar da bu döngüye katkı sağlamaktadırlar. Hayvanlarda iki haftaya kadar uzayabilen bir viremi görülmekte olup, bu süre zarfında enfekte olmayan kene formlarına virusu nakledebilmektedirler. Bu sebeple, hayvanlar da virus rezervuarı olarak kabul edilmektedir (Gale ve ark., 2010; Mertens ve ark., 2013; Spengler ve ark., 2016b). Ayrıca, hastalığın endemik olduğu yerlerden KKKAV ile enfekte hayvanların (kenelerle birlikte) ithalatı gibi hayvan hareketleri, hastalığın görülmediği alanlara virusun nakledilmesine neden olabilir. Bunun dışında, özellikle kuş göçlerinin farklı ülkeler arasında uzun mesafeli olarak KKKAV ile enfekte kenelerin taşınmasında önemli olabileceği düşünülmektedir (Bente ve ark., 2013; Ergonul, 2006; Gale ve ark., 2010).

Hastalığın endemik olduğu yerlerde yapılan seroepidemiolojik çalışmalar, evcil ve yabani hayvanlarda KKKAV spesifik antikorların varlığını ortaya koymaktadır (Gale ve ark., 2010; Spengler ve ark., 2016a). Özellikle evcil hayvanlarda KKKAV spesifik antikorların varlığı, sirküle olan virusun varlığı, virusun lokalize olduğu coğrafik alanların tespit edilmesi ve insanlar için hastalık riskinin belirlenmesi açısından önemli bilgiler sağlamaktadır (Spengler ve ark., 2016a). Günümüze kadar yapılan seroepidemiolojik ve deneysel çalışmalarda, sığır, koyun, keçi, at, eşek, deve ve manda gibi evcil hayvanların yanı sıra, yaban tavşanı, gergedan, zürafa, ceylan, yarasa, kirpi ve bazı kemirgenler gibi yabani hayvanlarda

da KKKAV spesifik antikorlar tespit edilmiştir (Ergonul, 2006; Spengler ve ark., 2016a; Spengler ve ark., 2016b). Seroepidemiyolojik çalışmaların birçoğu IgG antikorlarının tespitine yöneliktir. Bununla birlikte, hayvanlarda meydana gelen KKKAV enfeksiyonlarında, immunoglobulin M (IgM) antikorlarında 1-2 ay süresince mevcut olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Spengler ve ark., 2016a).

Evcil hayvanlarda yapılan seroepidemiyolojik çalışmalarda tespit edilen seroprevalans oranı, çalışmanın yapıldığı coğrafik alanın hastalık yönünden durumuna bağlıdır (Spengler ve ark., 2016a). Örneğin, hastalığın endemik olduğu ülkelerde evcil hayvanlardaki en yüksek seroprevalans oranları, Afganistan'da sığırlar için %79,1, Türkiye'de koyunlar için %85,71 ve keçiler için %82,8, Irak'ta atlar için %58,8, Tacikistan'da eşekler için %39,5 ve Kenya'da develer için %26 olarak tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Özüpak, 2017; Spengler ve ark., 2016a). Ayrıca evcil hayvanlarda tespit edilen seroprevalans oranlarının, örnekleme yapıldığı mevsim, örnekleme yapılan hayvan türü, cinsiyeti ve yaşı gibi biyolojik olmayan koşullara göre değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir. Türkmenistan'da yapılan bir çalışmada, evcil hayvanlardaki KKKAV seroprevalansının yaz aylarında arttığı ve örnekleme yapılan bölgeler ile çiftlikler arasında da önemli farklılıkların olduğu rapor edilmiştir. Rusya'da (Rostov) yapılan çalışmada, aynı bölgede tekrarlayan örnekleme yapılarak önemli değişiklikler saptanmıştır. Çalışma yapılan bölgede antikorların saptanması için en uygun zamanın Eylül ayı olduğu ve kış ile ilkbahar aylarında seroprevalansta önemli bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir (Spengler ve ark., 2016a).

Evcil hayvanlarda KKKAV seroprevalansına, cinsiyetin bir etkisi olmadığı düşünülmektedir (Wilson ve ark., 1990). Fakat cinsiyetin aksine, yaştan seroprevalans için önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Spengler ve ark., 2016a; Wilson ve ark., 1990). Sudan'da sığırlarda yapılan çalışmalarda, yaştan artmasının beş ila sekiz kat oranında seroprevalansa etkisi olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar, melez

ırkların yerli ırklara göre KKKAV enfeksiyonlarına daha duyarlı olduklarını söylemektedirler. Ayrıca, otlatma şekilleri ve hayvan üzerindeki kene miktarının da seroprevalansa etkisi olduğu, fakat hayvanın vücut kondisyonu, diğer tür hayvanlarla birlikte yaşaması, sürü büyüklüğü ve süt üretimi gibi faktörlerin seroprevalans açısından anlamlı olmadıkları ifade edilmiştir (Adam ve ark., 2013; Ibrahim ve ark., 2015). Evcil hayvanlarda yapılan toplam uluslararası seroepidemiolojik çalışmalar ve bulunan seropozitiflik oranları gibi bilgiler Çizelge 1.6.'da gösterilmiştir (Spengler ve ark., 2016a).

Çizelge 1.6. Evcil hayvanlarda tür bazlı bildirilen toplam uluslararası KKKAV seroprevalans çalışmaları (Spengler ve ark., 2016a).

Hayvan Türü	Toplam Örnek Sayısı	KKKAV Seroprevalansı (%)	Yapılan Çalışma Sayısı	Yapılan Ülke Sayısı
Manda	433	6	9	3
Deve	5272	13,41	15	11
Sığır	39684	19,33	75	34
Tavuk/Ördek	616	0,16	4	3
Köpek	1978	6	1	1
Eşek	230	21,74	6	4
Keçi	4617	28,07	33	15
At	1180	30,68	7	5
Katır	105	0	2	1
Devekuşu	97	22,68	2	2
Domuz	222	0	3	3
Koyun	17244	23,85	49	25

Yabani hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda, yabani tavşanlarda %3-22, yabani mandalarda %10-20 ve gergedanlarda %40-68 oranında seroprevalans bildirilmiştir. Çalışma yapılan diğer yabani hayvanlardan, fillerde sadece bir hayvanda seropozitiflik saptanırken, dağ sıçanı, insan olmayan primat türlerinin hepsinde ve kirpi hariç böcekçil diğer kemirgen türlerinde antikor cevaba ait bir kanıta rastlanmamıştır. Özellikle yaban tavşanı ve kirpi, vektör kenenin ekoloji açısından önemli olduğu için virus rezervuarı olarak düşünülmektedir (Spengler ve ark., 2016a). Kirpi ile yapılan deneysel çalışmalarda, viremi ve antikor cevapla ilgili olarak çelişkili sonuçlar elde edilmiş ve bu farklılığın kirpi türleri ile ilgili olduğu kanaatine varılmıştır (Spengler ve ark., 2016a; Spengler ve ark., 2016b). Ayrıca

yarasalarda yapılan çalışmalarda seropozitiflik bulunduğu bildirilmektedir (Spengler ve ark., 2016a).

Kuşların, göç sırasında hastalığın endemik olduğu yerlerden enfekte keneleri taşıyarak hastalığın diğerk ülkelere yayılmasında rol aldığı düşünülmesine rağmen, kuş türlerinde KKKAV enfeksiyonunun şekillenmesi veya antikor cevabın varlığı/yokluğu hala belirsizliğini korumaktadır (Spengler ve ark., 2016a). Yapılan deneysel bir çalışmada, kırmızı gagalı guguk kuşunda (*Tockus erythrorhynchus*) saptanabilir bir viremi meydana getirmeden virusun replike olduğu ve olgun olmayan *Hyalomma rufipes* türü keneleri enfekte edebildiğı gösterilmiştir. Fakat kuşlarda yapılan diğerk deneysel çalışmalar, meydana gelen enfeksiyon sonrasında antikor cevabın şekillenebileceğini göstermektedir. Örneğin, mavi başlı Afrika tavuğunda (*Numida meleagris*), düşük seviyede bir viremi ve sonrasında şekillenen geçici bir antikor cevap tespit edilmiştir. Deneysel olarak enfekte edilen tavukların ise, KKKAV enfeksiyonlarına karşı dirençli oldukları bulunmasına rağmen, Kazakistan’da yapılan bir çalışmada, tavuk ve ördeklerde seroprevalans %0,2 olarak bulunmuştur. KKKAV enfeksiyonun varlığı, vireminin ve antikor cevabın şekillenmesi ile insan vakalarında muhtemel bulaşma kaynağı olarak devekuşları (*Struthio camelus*) bir istisna olarak kabul edilmektedir (Spengler ve ark., 2016a; Spengler ve ark., 2016b; Whitehouse, 2004). Yapılan çalışmalarda, devekuşlarında %23,9 civarında seroprevalans tespit edilmiştir. Ayrıca, İran ve Güney Afrika’da meydana gelen bazı insan vakalarında, virus ve bulaşma kaynağı olarak devekuşları gösterilmektedir (Spengler ve ark., 2016a).

Yapılan birçok araştırma, viremik hayvanların kan, doku ve diğerk vücut sıvılarıyla temas sonucunda hastalığın insanlara bulaşabileceğine işaret etmektedir (Mertens ve ark., 2013; Whitehouse, 2004). Mezbaha çalışanları, veteriner hekimler, kasaplar, çobanlar ve çiftçiler gibi meslek gruplarında, hayvan ilişkili bulaşma riskinin yüksek olduğu ifade edilmiştir (Mertens ve ark., 2013; Sharifi-Mood ve ark., 2014). Örneğin, sığır dokularıyla temas sonucunda, Özbekistan’da üç insanın

hastalığa yakalanmasının yanı sıra, Moritanya’da bir insan, keçi kestikten kısa bir süre sonra hastalığa yakalanmıştır (Nabeth ve ark., 2004; Spengler ve ark., 2016a). Benzer vakalar sıklıkla İran’da da meydana gelmektedir. İran’da bildiri yapılan son vakalar, 2016 yılı Mayıs ayında üç adet mezbaha işçisinde görülmüştür. Bu işçilerden bir tanesi mezbahanın paketleme bölümünde çalışmaktadır (Jamshidi ve ark., 2017) Ayrıca, Güney Afrika’da meydana gelen KKKAV vakasında, hastalığın devekuşu kesiminden sonra başladığı ortaya konulmuştur. Benzer şekilde İran’da ise, devekuşu çiftliğinde çalışan 4 kişide hastalık görülmüştür. Her iki olguda da, yapılan serolojik çalışmalar neticesinde, devekuşlarının çeşitli oranlarda seropozitif olduğu tespit edilmiştir (Spengler ve ark., 2016a; Whitehouse, 2004).

Hastalığın endemik olduğu Türkiye’de 2004-2007 yılları arasında 1670 adet insan vakası görülmüştür. Bu insan vakalarının meydana gelmesindeki risk faktörleri araştırıldığında, hastaların %68,9’unda kene ile ısırılma, %61,7’sinde hayvan ile yakın temas ve %9,9’unda hayvanların kan, doku ve diğer vücut sıvılarıyla temas olduğu görülmüştür. Araştırmacılar tarafından kene ile ısırılmasının asıl bulaşma kaynağı olduğu ve viremik hayvanlara direkt temas ve onların kan ve dokularına temasın da bulaşmada önemli olabileceği hususu bildirilmiştir (Mertens ve ark., 2013; Yılmaz ve ark., 2009). Yine Türkiye’de yapılan bir çalışmada, incelenen 63 adet KKKAV vakasının sadece %50,8’inde kene ısırılması mevcut iken, %93,6’sının hayvanla direkt teması olduğu bildirilmiştir (Kadanalı ve ark., 2009).

Bazı araştırmacılar insanlara hastalığın bulaştırılmasında, kene ile ısırılmadan daha çok viremik hayvanlar veya onların kan, doku ve diğer vücut sıvılarıyla temasın muhtemelen daha önemli olduğu söylemektedirler. Bu durumun özellikle İran ve Afganistan için önemli olduğuna vurgu yapılmaktadır (Mustafa ve ark., 2011; Papa ve ark., 2015). Ayrıca, taze ve çiğ etler ile pastörize edilmemiş sütlerin bulaşmada önemli olacağı söylenmekle birlikte bu yolla bulaşma ile ilgili yeterli kanıt bulunmamaktadır (Fazlalipour ve ark., 2016; Sharifi-Mood ve ark., 2014). İran’da yapılan bir çalışmada, yeni kesimi yapılmış koyunların etlerinin çiğ olarak

tüketilmesine bağlı şekillenen iki insan vakası bildirilmiştir (Fazlalipour ve ark., 2016). Birçok araştırmacı tarafından, etlerin postmortal asidifikasyondan dolayı veya pişirme işleminin virus üzerine tahrip edici etkisi olduğu için bulaşma açısından önemli olmadığını düşünülmektedir (Mertens ve ark., 2013).

Hayvanlardan virus izolasyonu ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte bildirimler sınırlıdır. Günümüze kadar, sığır, koyun, keçi ve yabani tavşan gibi hayvanlardan virus izolasyonu bildirilmiştir (Spengler ve ark., 2016a). Ülkemizde yapılan çalışmada ise, koyun ve keçilerde virus izolasyonu yapılmıştır (Albayrak ve ark., 2012).

1.3.1.3. Nosokomial Bulaşma

KKKAV ile enfekte insanların hastanelerde tedavileri sırasında virus diğer insanlara bulaşabilmektedir. Nosokomial bulaşma olarak adlandırılan bu tarz olgularda, özellikle sağlık çalışanları yüksek risk altındadır (Ergonul, 2006; Mertens ve ark., 2013). Nosokomial bulaşma genellikle, iğne yaralanmaları gibi kazalar ve yeterli koruyucu önlem alınmadan hastaların, kan ve diğer vücut sıvılarıyla temas sonrasında meydana gelmektedir. Ayrıca şiddetli kanamalı hastalarda, virus kan ve diğer vücut sıvıları ile çevreye yayıldığı için çevresel temasa dikkat etmek gerekmektedir. Etkenin, aynı odayı paylaşan bir hastadan diğerine bulaştığı durumlar rapor edilmiştir (Güven ve ark., 2017; Mertens ve ark., 2013; Weidmann ve ark., 2016). KKKAV'nin havayolu ile bulaşabileceğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Ergonul, 2006; Güven ve ark., 2017; Pshenichnaya ve Nenadskaya, 2015).

Nosokomial bulaşma, bildirilmiş ilk KKKAV salgını sırasında 1944-1945 yıllarında Sovyetler Birliği'nde kayıt edilmiştir. Daha sonraki yıllarda Afrika, Arap yarımadası, Orta Asya ve Doğu Avrupa'da 12 farklı ülkede bildirilmiştir. Şiddetli

hastalık tablosunun görüldüğü yerlerde, nosokomial enfeksiyonlar daha fazla görülme eğilimindedir. Bunun sebebi muhtemelen gelişen yüksek viremi olarak düşünülmektedir. Son çalışmalar, kanlarında viral genom 10^8 kopya/mL'den fazla tespit edilen hastalarda genellikle ölüm şekillendiğini doğrulamaktadır (Weidmann ve ark., 2016).

KKKAV enfeksiyonlarının cinsel yolla, bir insandan diğerine bulaştığını bildiren yayınlar da bulunmaktadır. Hastaların inkübasyon süresinin sonlarına doğru veya herhangi bir kanama semptomunun görülmediği hastalığın erken dönemlerinde cinsel yolla hastalığı bulaştırabildiği bildirilmiştir (Pshenichnaya ve Nenadskaya, 2016).

1.3.1.4. Risk Grupları, İnsan Davranışları ve İklim Değişiklikleri

Meydana gelmiş hastalık vakaları incelendiğinde, çeşitli risk gruplarının varlığından bahsetmek mümkündür. En önemli risk grubunu, hastalığın endemik olarak görüldüğü alanlarda yaşayan çiftçiler oluşturmaktadır (Ergonul, 2006). Hastalığın endemik olarak görüldüğü Türkiye'de 2004-2007 yılları arasında meydana gelen vakaların %69,4'ü köylerde yaşamaktadır. Bu vakaların, %68,9'unda kene ısırılma ve %61,7'sinde hayvan ile yakın temas öyküsü bulunmaktadır (Yılmaz ve ark., 2009). Bu bilgiler ışığında, köylerde yaşayan insanların kene ve hayvanlar ile temasının fazla olduğundan dolayı hastalığa yakalanma olasılıkları aynı oranda artmaktadır (Kadanalı ve ark., 2009; Yılmaz ve ark., 2009). Diğer önemli risk grubu ise, mezbaha çalışanları gibi hayvan kesimiyle uğraşan insanlardır. İran'da yapılan bir çalışmada, bildirilmiş insan vakalarının en önemli kısmının enfekte hayvanların kan ve organlarıyla teması olan mezbaha çalışanları ve kasaplarda meydana geldiği raporlanmıştır (Chinikar ve ark., 2010). Ayrıca, veteriner hekimler gibi hayvan sağlığı çalışanları, askerler ve halk sağlığı çalışanları da enfeksiyon için riskli meslek grupları arasında yer almaktadır (Mertens ve ark., 2013). Özellikle halk sağlığı çalışanlarında, birçok nosokomial bulaşma vakası bildirilmiştir (Ergonul, 2006).

Ülkelerin ve bölgelerin sosyo-ekonomik durumları, hastalığın görülme sıklığını ve bulaşma yollarını etkileyen önemli faktördür. Türkiye’de hastalığın bulaşmasında en önemli faktör olarak keneler bildirilmesine rağmen, İran ve Afganistan’da hastalığın en önemli bulaşma yolu olarak enfekte hayvanlar ve onların kanlarıyla temas gösterilmektedir (Ergonul, 2006; Mustafa ve ark., 2011).

Hastalığın endemik olduğu alanlara, aile ziyaretleri, kamp veya piknik aktiviteleri ve askeri faaliyetleri gibi sebeplerle yolculuk yapılması hastalık riskini arttıran faktörlerdendir (Mertens ve ark., 2013). Bu durum sadece aynı ülke içinde olmayıp, çeşitli sebeplerle hastalığın endemik olduğu ülkelere giden insanlar için de söz konusudur. Şöyle ki, şimdiye kadar hastalığın endemik olmadığı ülkelerde bu şekilde meydana gelen dört insan vakası bildirilmiştir. Çeşitli sebeplerle, 2004 yılında Senegal’den Fransa’ya gelen bir insanda, 2009 yılında Afganistan’dan Almanya’ya gelen bir askerde, 2012 yılında Afganistan’dan ve 2014 yılında Bulgaristan’dan gelen insanlarla Birleşik Krallık’ta KKKAV vakaları görülmüştür (Spengler ve ark 2016a). Ayrıca, tarım arazilerinin çeşitli sebepler ihmal edilerek kullanılmaması, tarım arazisi kazanmak için ormanlık alanlarda yapılan tahribatlar gibi ekolojik koşullarda yapılan değişiklikler ve av faaliyetlerinin azaltılması gibi nedenler, hastalığın rezervuarı olan hayvanlarda ve kenelerde sayısal olarak artışa neden olarak vakaların artmasına neden olabilmektedir (Mertens ve ark., 2013).

Birçok araştırmacılar tarafından, vakaların yıl içinde özellikle belli zamanlarda daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak, kene aktivasyonunun ve kesimi yapılan hayvanların daha yüksek oranda enfekte olmaları söylenebilir. Özellikle İran ve Türkiye’de vakaların daha çok Mart ayında görülmeye başladığı, Haziran ve Temmuz aylarında en yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir (Chinikar ve ark., 2010; Kadanalı ve ark., 2009).

İslam kültüründe önemli bir yeri olan ve hac zamanında kutlanan “Kurban Bayramı” nedeniyle hastalık vakalarında artışa neden olabileceği ifade edilmektedir. Kurban Bayramı boyunca, Müslümanlar tarafından sığır, koyun, keçi veya deve gibi hayvanlar kurban edilmektedir. Kurban Bayramı zamanı hicri takvime göre belirlenmekte ve miladi takvime göre her yıl 10 gün öncesine kaymaktadır. Geçmişte sonbahar veya kış aylarında kutlanan Kurban Bayramı, gelecek 10-15 yıl içerisinde KKKAV vakalarının en sık görüldüğü yaz aylarına denk gelecektir. Bu durum, hastalık hakkında bilgi eksikliği, hayvanların kesilmesi sırasında dikkatsiz uygulamalar ve ülkeler arasında kontrolsüz hayvan hareketleri gibi nedenlerden dolayı KKKAV vakalarında artışa neden olabileceği düşünülmektedir. Özellikle hac ibadetinin yapıldığı Suudi Arabistan’a, Kurban Bayramı öncesi büyük miktarda hayvan hareketi gerçekleşmektedir. Ayrıca, hac ibadetinin bir parçası olarak çok miktarda hayvan Suudi Arabistan’da kurban edilmektedir. Hastalığın endemik olarak görüldüğü ve Müslüman popülasyonunun çok olduğu İran, Afganistan, Pakistan ve Türkiye gibi ülkelerde Kurban Bayramı nedeniyle artması muhtemel vakalarının önüne geçilmesi için bazı tedbirlerin alınması kaçınılmazdır (Leblebicioglu ve ark., 2015).

İklim değişiklikleri, kenelerin hayatta kalmalarına, aktivitelerine ve gelişmelerine direkt etkilidir. Ilıman kışlar, sıcak sonbaharlar ve yağış miktarında azalma gibi iklimsel faktörler vektör kenelere uygun yaşam alanların ve dolayısıyla kene popülasyonundaki artışa katkıda bulunmaktadır. *Hyalomma* keneleri sıcak yaz ve ılıman kışları tercih etmektedir. Yıllık sıcaklık ortalamalarında meydana gelecek artış, kenenin gelişimini kolaylaştırmaktadır (Mertens ve ark., 2013).

1.3.2. Enfeksiyonların Coğrafik Dağılımı

1.3.2.1. İnsan Enfeksiyonlarının Coğrafik Dağılımı

İnsan enfeksiyonları, Asya, Orta Doğu, Güneydoğu Avrupa, Arap yarımadası ve Afrika'da 30'dan fazla ülkede bildirilmiştir (Bente ve ark., 2013; Mertens ve ark., 2013). KKKAV vakalarının en çok rapor edildiği ülkeler, Türkiye, Rusya, İran, Bulgaristan ve Kosova olarak kayıtlarda yer almaktadır (Dreshaj ve ark., 2016; Mertens ve ark., 2013; Shayan ve ark., 2015). Kazakistan, Azerbaycan, Ermenistan ve Rusya gibi eski Sovyetler Birliği ülkelerinde, İran, Afganistan, Pakistan, Hindistan ve Batı Çin'de hastalığın uzun yıllardır varlığı bilinmektedir. Çin'de son insan vakası 1988 yılında meydana gelirken, bahsedilen diğer ülkelerde hastalık halen endemik olarak görülmektedir (Ergonul ve Whitehouse, 2007). Özellikle İran ve Pakistan gibi Orta Doğu ülkelerinde meydana gelen insan vakalarında 2000 yılından sonra bir artış söz konusudur (Berger, 2017; Chinikar ve ark., 2010). Ayrıca bu Orta Doğu ülkeleri, hayvan ilişkili bulaşmanın en sık görüldüğü yerlerdir (Mustafa ve ark., 2011).

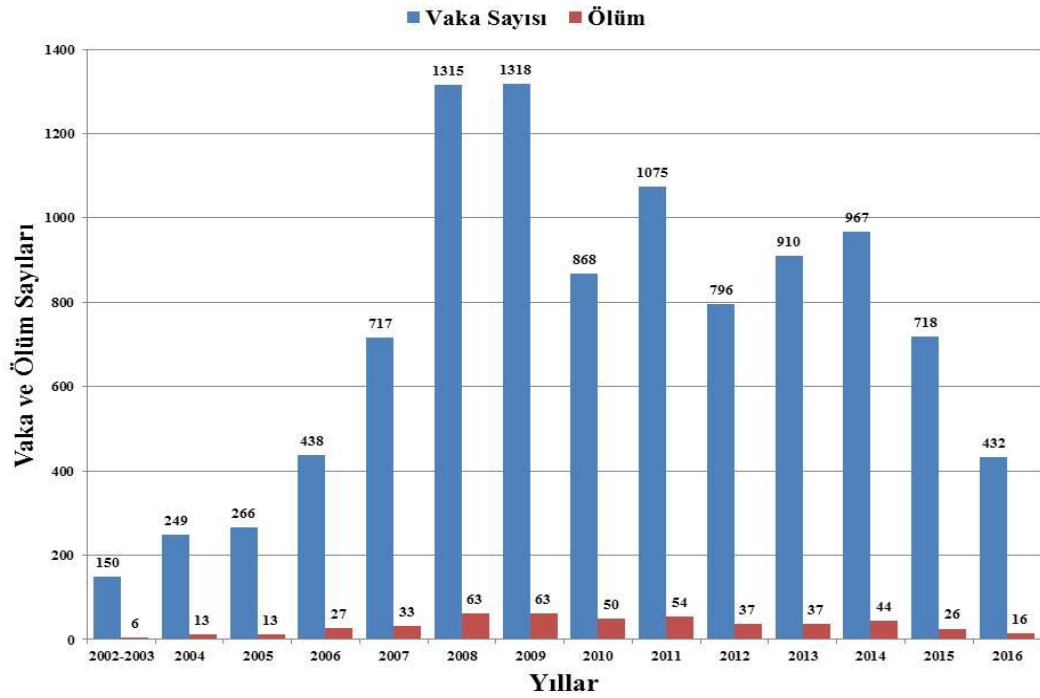
Avrupa kıtasında, KKKAV vakaları Güneydoğu Avrupa ülkelerinde görülmektedir. Özellikle, Bulgaristan, Arnavutluk, Yunanistan ve Kosova'da hastalık endemik seyretmektedir. 2016 yılına kadar, Bulgaristan'da 1598 adet ve Kosova'da 304 adet insan vakası bildirilmiştir (Dreshaj ve ark., 2016). Yunanistan'da KKKAV ilk olarak 1975 yılında tespit edilmiştir. Keçiler üzerinden toplanan *Rhipicephalus bursa* türü kenelerde tespit edilen bu izolat, dünya genelinde yaygın olarak görülen KKKAV'lerden farklı özelliklere sahip olup AP92 izolatı olarak adlandırılmıştır (Bente ve ark., 2013; Dreshaj ve ark., 2016). Bilinen KKKAV izolatları ile AP92 izolatı genetik olarak karşılaştırıldığında genom boyunca %20'nin üzerinde farklılık tespit edilmiş ve Avrupa Hat II içerisinde sınıflandırılmıştır (Panayotova ve ark., 2016). AP92 izolatının insanlar için patojen olmadığı bildirilmiştir (Papa ve ark., 2015). Fakat, AP92 benzeri olarak adlandırılan ve yine genetik olarak Avrupa Hat II

Yapılan analizlerle, virusun Afrika izolatlarıyla yakın ilişkili konulmuştur (Bente ve ark.,2013). Ayrıca, KKKAV'nin asıl vektörü *marginatum*'un birçok Avrupa ülkesinde mevcut olduğu bilinmektedir (Bente ve ark., 2016). Hastalığın endemik olduğu ülkeler Şekil 1.7.'de gösterilmiştir (Bente ve ark., 2017).



Şekil 1.7. KKKAV vakalarının coğrafik dağılımı (CDC, 2017).

Türkiye’de, 1970’lerde yapılan bir seroepidemiolojik çalışma ile, KKKAV spesifik antikorların varlığı ortaya konulmasına rağmen, ilk insan vakası 2002 yılında Tokat ilinde görülmüştür (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Mertens ve ark., 2013). Hastalığın görülmeye başlamasından sonra yıllık vaka sayısı, diğer Avrupa ülkelerinin toplam vaka sayılarından çok yüksek olup, 2002-2016 yılları arasında toplam 10219 insan vakası meydana gelmiştir. KKKAV vakalarının büyük bir kısmı Orta ve Doğu Anadolu’da, özellikle de Kelkit vadisi olarak adlandırılan bölgede meydana gelmektedir (Mertens ve ark., 2013; TCSB, 2017). Hastalığın endemik olarak görüldüğü Tokat ve Sivas illerinde, 2006 yılında seroprevalans kırsal kesimde yaşayan insanlarda %12,8, şehirlerde yaşayan insanlarda ise %2 olarak tespit edilmiştir (Mertens ve ark., 2013). Türkiye’de tespit edilen KKKAV izolatlarının büyük bir kısmı Avrupa Hat I içerisinde sınıflandırılmaktadır (Bente ve ark., 2013). Ayrıca, Avrupa Hat II içerisinde sınıflandırılan ve orta şiddetli hastalık tablosu meydana getiren AP92 benzeri virus izolatlarının da varlığı bilinmektedir (Midilli ve ark., 2009). Türkiye’de görülen KKKAV vakalarının yıllara göre vaka ve ölüm sayıları Şekil 1.8.’de gösterilmiştir (TCSB, 2017).



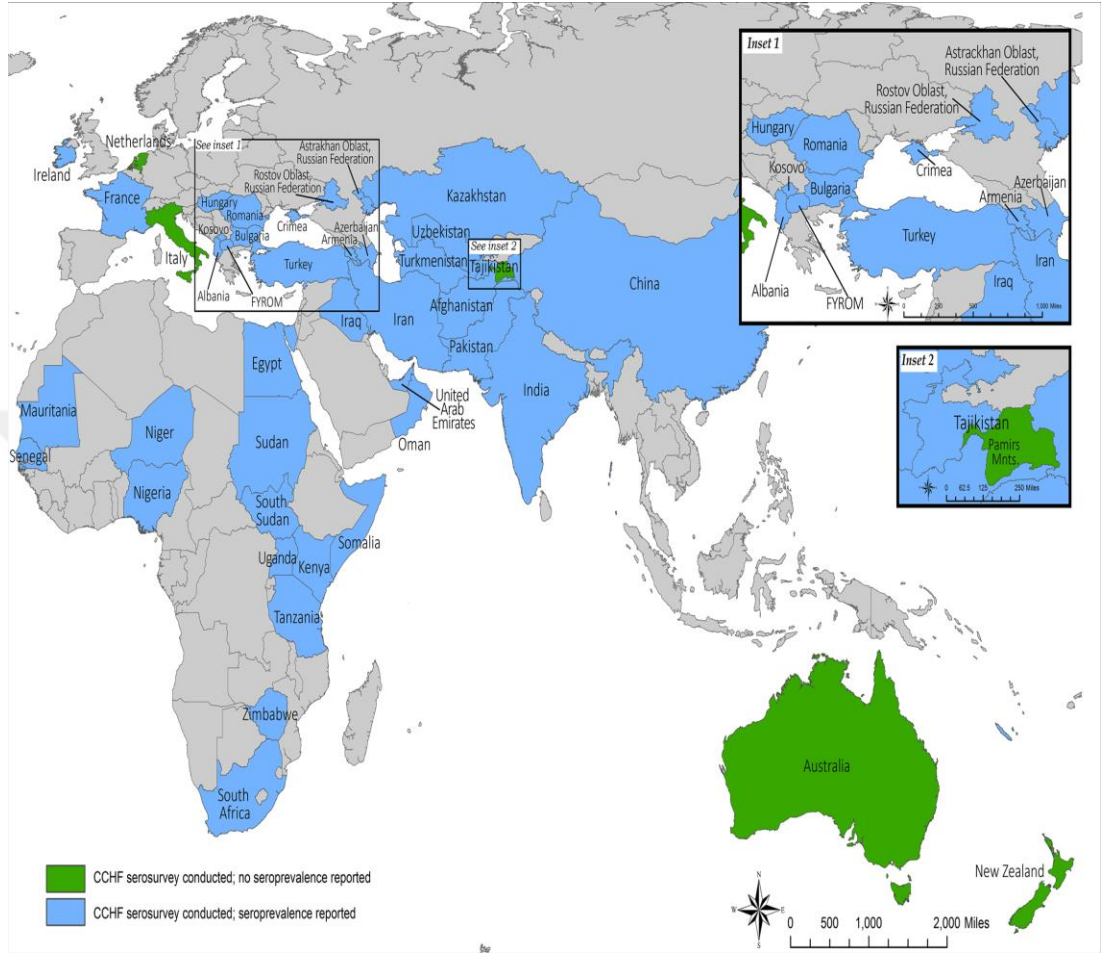
Şekil 1.8. Sağlık Bakanlığı verilerine göre KKKAV vaka ve ölüm sayıları (TCSB, 2017).

1.3.2.2. Hayvan Enfeksiyonlarının Coğrafi Dağılımı

Hastalık hayvanlarda klinik belirti göstermeden kısa süreli bir viremi şekillendirmesine rağmen, hayvanlardaki seroprevalansın belirlenmesi insan vakaları için bölgenin risk durumunu ortaya koymak açısından önemli bir kriter olarak görülmektedir (Spengler ve ark., 2016a). Araştırmacılar tarafından, bir bölgenin hayvan popülasyonunda KKKAV spesifik antikorların durumu, o bölgede hastalığın varlığı veya yokluğu açısından iyi bir indikatör olarak kabul edilmektedir (OIE, 2014; Schuster ve ark., 2016). Evcil hayvanların seroepidemiolojik çalışmalarında, KKKAV spesifik antikorların tespit edilememesi, çalışmanın yapıldığı bölgede düşük seviye bulaşmanın varlığına veya KKKAV'nin yokluğuna işaret ettiği düşünülmektedir. Öyle ki, günümüze kadar raporlanmış KKKAV vakası olmayan, Almanya, İtalya, Hollanda, Avusturalya ve Yeni Zelanda gibi ülkelerde evcil hayvanlarda antikor varlığına ilişkin kanıta rastlanmamıştır (Spengler ve ark., 2016a). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, birçok evcil ve yabani hayvan türünde KKKAV spesifik antikorların ve RNA'sının varlığı tespit edilmiştir (Ergonul, 2006; Spengler ve ark., 2016a).

Sığırlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda, Afganistan, Arnavutluk, Azerbaycan, Bulgaristan, Hindistan, Kenya, Kosova, Hindistan, Rusya ve İran gibi hastalığın endemik olduğu ülkelerde KKKAV seroprevalansı çeşitli oranlarda tespit edilmiştir. Ancak insan vakası görülmeyen, İrlanda'da %1,9, Macaristan'da %0,9, Makedonya'da %14,6 oranında seroprevalansın bulunması, bu ülkelerde virusun sirküle olduğunu göstermektedir. Benzer bir durum koyunlarda yapılan çalışmalarda da söz konusudur (Spengler ve ark., 2016a). Koyunlarda yapılan çalışmalarda yine hastalığın endemik olduğu ülkelerde çeşitli oranlarda seroprevalans tespit edilirken, sadece bir ölümlü insan vakasının olduğu Yunanistan'da %25, bildirilmiş insan vakasının olmadığı Romanya'da ise %27,8 oranında seroprevalans bulunmuştur. Yunanistan'da tespit edilen seroprevalans AP92 kaynaklı olarak kabul edilebilirken, Romanya'da ise virusun sirküle olduğuna işaret edebilir (Dreshaj ve ark., 2016,

Spengler ve ark., 2016a). Evcil ve yabani hayvanlarda seropozitiflik tespit edilen ülkeler Şekil 1.9.'da gösterilmiştir (Spengler ve ark., 2016a).



Şekil 1.9. Evcil ve yabani hayvanlarda yapılan çalışmalara göre ülkelerin KKKAV yönünden seropozitiflik durumları. Hayvan popülasyonlarında seropozitiflik tespit edilen ülkeler mavi renkte, seropozitiflik tespit edilmemiş ülkeler yeşil renkte ve seroepidemiolojik çalışma yapılmayan ülkeler ise gri renkte gösterilmiştir (Spengler ve ark., 2016a).

Türkiye’de hayvanlardaki KKKAV enfeksiyonlarına ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bilinen ilk çalışmada, sığırlarda KKKAV seroprevalansı %79 oranında tespit edilmiştir (Ergonul ve Whitehouse, 2007). İlerleyen yıllarda sığır, koyun ve keçilerde seropozitifliği saptamaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar ve hayvan türlerine göre seroprevalansları Çizelge 1.7.’de gösterilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Ergonul ve Whitehouse, 2007; Kırbaş ve ark., 2010; Tuncer ve ark., 2014; Özupak, 2017). Ayrıca Albayrak ve ark. (2012), yapmış oldukları çalışmada, koyun ve keçilerde KKKAV RNA’sını tespit etmişlerdir.

Çizelge 1.7. Türkiye’de hayvanlarda yapılan seroprevalans çalışmaları (Albayrak ve ark., 2012; Ergonul ve Whitehouse, 2007; Kırbaz ve ark., 2010; Tuncer ve ark., 2014; Özupak, 2017).

	Örnekleme Yeri	Örnekleme Yılı	Hayvan Türü	Seroprevalans Oranı (%)
Ergonul ve Whitehouse, (2007)	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Sığır	79
Kırbaz ve ark., (2010)	Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat	2006-2007	Sığır	17
			Koyun	37
Tuncer ve ark., (2014)	Bursa, Balıkesir ve Bilecik	2008-2009	Sığır	13
			Koyun	31,8
			Keçi	66
Albayrak ve ark., (2012)	Samsun, Tokat, Sivas ve Sinop	2009	Koyun	85,71
			Keçi	66,66
Özupak, (2017)	Tokat	2015	Sığır	38,5
			Koyun	83,3
			Keçi	82,8

1.4.Klinik Bulgular ve Hastalığın Seyri

Hastalık hayvanlarda, klinik belirti göstermeden kısa süreli bir viremi meydana getirmesine rağmen, insan vakalarında asemptomatik veya orta şiddetli hastalık tablosundan, ölümle sonuçlanabilen şiddetli kanamalı hastalık tablosuna kadar değişen tarzda klinik seyir izleyebilmektedir (Dreshaj ve ark., 2016; Mertens ve ark., 2013). Klinik belirtilerdeki bu farklılık maruz kalınan virus izolatı, hastalığın bulaşma yolu ve maruz kalınan virus miktarı gibi etkenlerle açıklanabilir (Ergunay ve ark., 2014; Papa ve ark., 2015). Raporlanmış ilk KKKAV enfeksiyonundan günümüze kadar geçen sürede, insan enfeksiyonlarında %80'lere varan vaka-ölüm oranları bildirilmiştir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Mertens ve ark., 2013). Coğrafi bölgelere ve bulaşma yoluna bağlı olarak vaka-ölüm oranları genellikle %2-30 arasında tespit edilmektedir (Ergunay ve ark., 2014; Weidmann ve ark., 2016). KKKAV enfeksiyonlarının görüldüğü ülkelerde, vaka-ölüm oranlarında farklılıklar mevcuttur. Kosova’da bu oran %21, İran’da %15 iken, Türkiye’de 2002-2016 yılları arasında vaka-ölüm oranı %4,71 olarak kayıtlara geçmiştir (Dreshaj ve ark., 2016; TCSB, 2017; Weidmann ve ark., 2016). Yapılan çalışmalara göre,

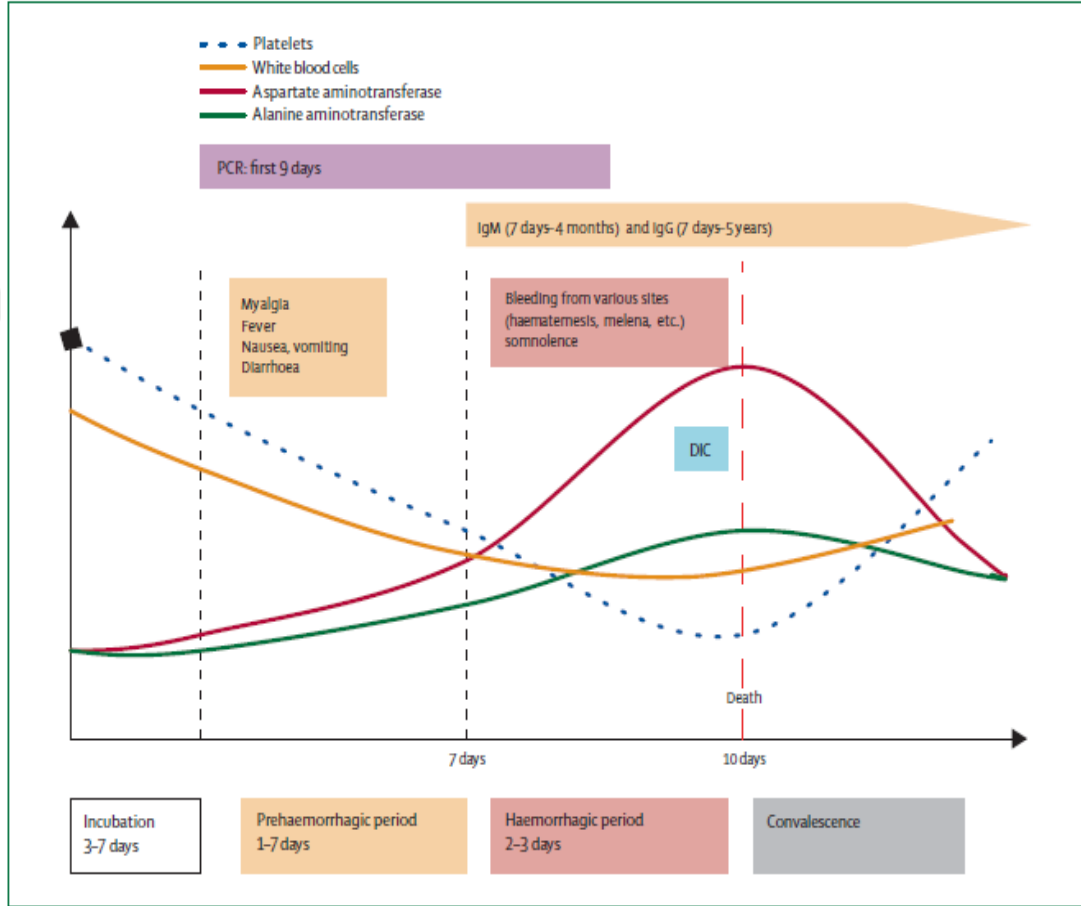
enfeksiyon meydana gelen beş insandan birinde (%20) hastalık belirtileri ortaya çıkmaktadır (Ergonul, 2006; Gale ve ark., 2010; Papa ve ark., 2015).

Hastalık klinik seyrine göre, inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvalesans olarak adlandırılan dört farklı döneme ayrılmaktadır (Ergonul, 2006). İnkübasyon dönemi, genellikle bir ila yedi gün arasında sürmektedir (Ergonul, 2006; Shayan ve ark., 2015). Bu sürenin uzunluğu bulaşma şekli ve maruz kalınan virus miktarı gibi etkenlere bağlıdır (Ergonul, 2006). Genellikle kene ısırılması ile meydana gelen enfeksiyonlarda inkübasyon süresi 1-5 gün arasında olup dokuz güne kadar uzayabilmektedir. Enfekte kan ve dokularla temas sonucunda oluşan enfeksiyonlarda ise beş ila yedi gün arasında olup, 13 güne kadar uzayabilmektedir (Bente ve ark., 2013).

Prehemorajik dönem 1-7 gün arasında sürebilirken, ortalama üç gün içerisinde sonlanmaktadır. Bu dönem, grip benzeri ani başlayan ateş (39-41°C), baş dönmesi, kas ve baş ağrısı gibi belirtilerle karakterizedir (Ergonul, 2006; Papa ve ark., 2015). Prehemorajik dönem bazı hastalarda çok sınırlı görülerek, hızlıca hemorajik belirtiler ortaya çıkabilir (Papa ve ark., 2015). Ayrıca, bu dönemde Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile virus tespit edilebilmektedir (Bente ve ark., 2013).

Hemorajik dönem, 2-3 gün civarında sürmekte ve genellikle hastalığın üçüncü veya beşinci günlerinde görülmeye başlanmaktadır (Ergonul, 2006). Deri, konjunktiva ve diğer mukozal membranlarda meydana gelen peteşiyal alanlar en yaygın başlangıç semptomlarıdır. İlerleyen dönemlerde, yaygın deri altı ekimozlar ile gastrointestinal ve üriner sistemde kanamalar görülebilir (Bente ve ark., 2013).

Konvalesans dönemi yani iyileşme periyodu, hayatta kalan hastalarda hastalığın başlamasından 10-20 gün sonra şekillenmektedir (Ergonul, 2006). Hayatta kalan insanlarda, tam düzelme bir yıl kadar sürebilmektedir (Bente ve ark., 2013). Hastalığın klinik ve laboratuvar seyri Şekil 1.10.'da gösterilmiştir (Ergonul, 2006).



Şekil 1.10. KKKK'nın klinik ve laboratuvar seyri. DIC: Yaygın intravasküler koagülasyon (Ergonul, 2006).

Yapılan çeşitli araştırmalarla, hastaların bazı biyokimyasal kan parametrelerinde meydana gelen azalma veya artışlar, hastalığın ölüm ile sonuçlanıp sonuçlanmayacağıyla ilişkilendirilmiştir (Bente ve ark., 2013). Ayrıca hastaların serumlarındaki virus titreleri yani viral yük miktarlarının hastalığın akıbeti hakkında bilgi verebileceği bildirilmiştir (Bente ve ark., 2013; Çevik ve ark., 2007; Duh ve ark., 2007; Ergunay ve ark., 2014; Kubar ve ark., 2011). Hastaların serum viral yük seviyelerinin 10^8 veya 10^9 kopya/mL'nin altında seyrettiği durumlar hastalığın ölüm ile sonuçlanmayacağı ile ilişkilendirilerek düşük risk grubu olarak adlandırılmıştır.

Serum viral yük seviyeleri 10^8 veya 10^9 kopya/mL'nin üzerine çıktığı durumlarda ise, hastalığın genellikle ölüm ile sonuçlanacağı söylenerek yüksek risk grubu olarak adlandırılmaktadır (Bente ve ark., 2013; Çevik ve ark., 2007; Duh ve ark., 2007; Kubar ve ark., 2011).

1.5.Patogenez

Hastalığın patogenizi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, KKKAV'nin de içinde bulunduğu kanamalı ateş viruslarının ortak patolojik özelliği, oluşabilecek bağışıklık yanıtını etkisiz hale getirmek için antiviral cevabı başlatan hücrelere saldırmaktır. Bu hasar, belirgin virus replikasyonu ile birlikte lenfoid organlar ve vasküler sistemde meydana gelen bozukluklarla karakterizedir (Ergonul, 2006). KKKAV vasküler sisteme salındıktan sonra ilk olarak kan, karaciğer ve dalakta replike olmaktadır. Daha sonra virus akciğer, böbrek ve beyine yayılım göstermektedir (Akinci ve ark., 2016).

1.6.Teşhis

Hayvanlarda meydana gelen enfeksiyonların varlığını ortaya koymak için moleküler yöntemler, hücre kültüründe virus izolasyonu ve IgM antikorlarının ELISA yöntemi ile tespit edilmesi gibi testler kullanılmaktadır. Ancak hayvanlarda şekillenen enfeksiyonlarda, viremi süresinin kısa olması ve hastalığın asemptomatik seyretmesi gibi nedenlerden dolayı, OIE tarafından, hayvanlarda yapılacak prevalans çalışmalarında IgG antikorlarının ELISA yöntemi ile tespit edilmesi tavsiye edilmektedir (OIE, 2014). İnsan vakalarında enfeksiyonun erken teşhisi hem hastanın hayatta kalması hem de potansiyel nosokomial enfeksiyonların ve diğer insanlara bulaşmanın önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir (Ergonul, 2006). Hastaların ilk laboratuvar değerlendirmelerinde, bazı biyokimyasal kan parametrelerde azalma veya artışlar ile enfeksiyondan şüphelenilebilir (Bente ve ark., 2013). Ancak, bu testler hastalığın teşhisi için yeterli değildir. Coğrafik dağılımları farklı olan, bazı

viral (Hantavirus, Dengue virus ve Yellow fever virus gibi) ve bakteriyel (Q fever ve Leptospira gibi) etkenlerde biyokimyasal kan parametrelerde benzer değişikliklere neden olabilmektedir (Ergonul, 2006). Serum örneklerinden RT-PCR ile viral RNA'nın tespiti, ELISA yöntemi ile virus spesifik IgM ve/veya IgG antikorlarının tespiti veya diğer yöntemlerle spesifik tanı konulabilir. Hastalığın tanısında, hücre kültüründe virus izolasyonu gibi enfeksiyöz virusun geri kazanım yolları uzun süre "Altın Standart" olarak düşünülmesine rağmen, biyogüvenlik standartları nedeniyle uygulanabilir değildir. Günümüzde hastalığın tanısında, hızı, sensitivitesi ve güvenliği nedeniyle RT-PCR yöntemi "Altın Standart" olarak düşünülmektedir (Bente ve ark., 2013).

Hastalık ülkelere göre farklı risk gruplarında ve biyogüvenlik seviyelerinde sınıflandırılmaktadır. KKKAV, hastalığın görülmediği Birleşik Krallık, Almanya ve İsveç gibi ülkelere risk grup 4 olarak sınıflandırılmakta ve hastalığın tanısı veya araştırmaları için yapılacak uygulamaların, Biyogüvenlik seviye-4 laboratuvarlarda yapılmasına izin verilmektedir. Hastalığın endemik olarak görüldüğü Türkiye'de ise hastalık risk grup 2 olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca hastalığın tanı uygulamaları için Biyogüvenlik seviye-2 laboratuvarlar yeterli görülürken, hücre kültüründe virus izolasyonu gibi araştırma faaliyetlerinin Biyogüvenlik seviye-3 laboratuvarlarda yapılmasına izin verilmektedir (Weidmann ve ark., 2016).

1.6.1. Virus İzolasyonu

Virus izolasyonu için, serum veya organ süspansiyonları kullanılmaktadır (OIE, 2014). Ancak virus izolasyonu yapılacak laboratuvarların Biyogüvenlik seviye-3 veya 4 olması gerekmektedir (Weidmann ve ark., 2016). Yeni doğmuş farelere intraserebral inokülasyon ile virus izolasyonunun yapılabildiği uzun yıllardır bilinmektedir (Ergonul, 2006). Bunun yanı sıra KKKAV, memeli hücre kültürlerinde de üretilebilmektedir. Virus izolasyonu için, devamlı hücre kültürlerinden African Green Monkey Kidney (Vero) hücreleri sıklıkla kullanılmaktadır. Vero hücrelerinde inokülasyondan sonra 1 ile 5 gün içerisinde virus üremesi gerçekleşmektedir. Ayrıca,

Human Adrenal Carcinoma (SW-13) hücreleri, Chicken Embryo Related (CER) hücreleri, Rhesus Monkey Kidney Epithelial (LLC-MK2) hücreleri ve Baby Hamster Kidney (BHK-21) hücreleri de virus izolasyonu için kullanılabilmektedir (OIE, 2014). Virus hücre kültürlerinde önemsiz derecede veya hiç sitopatik etki (CPE) yapmadan üremektedir. Bu yüzden KKKA virusu üremesinin kontrolü RT-PCR veya ELISA gibi testlerle gerçekleştirilmektedir (Ergonul, 2006). Ayrıca virus izolasyonu için dört günlük kuluçka yaşına sahip embriyolu tavuk yumurtaları da kullanılabilmektedir (Xia ve ark., 2013).

1.6.2. Serolojik Testler

İnsan ve hayvanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda antikor cevabın tespiti için çeşitli test metotları kullanılmaktadır. Virus nötralizasyon testi (VNT), hemaglutinasyon inhibisyon (HI), agar jel immunodifüzyon (AGID), komplement bağlama testi (KFT), indirekt immunofloresan testi (IFA) ve çeşitli ELISA testleri serolojik çalışmalarda kullanılmıştır (Spengler ve ark., 2016a). VNT yüksek spesifiteye sahip olmasına rağmen hastalığın tanısı için ender olarak kullanılmaktadır. Çünkü, VNT canlı virus kullanılarak yapılması sebebiyle yüksek biyogüvenlik seviyelerinde çalışılması gerekmektedir (OIE, 2014). IFA, KFT, HI ve AGID'e göre, daha spesifik, daha hızlı, daha kolay tekrarlanabilir ve çok daha fazla sensitif olmasından dolayı ELISA testleri daha yaygın kullanılmaktadır (Ergonul, 2006; OIE, 2014; Spengler ve ark., 2016a). Ayrıca KKKAV antikorlarının tespiti için yapılan serolojik testlerin, DUGV ve NSDV gibi diğer nairovirus'larla çapraz reaksiyon verme potansiyeli bulunmaktadır (Spengler ve ark., 2016a).

KKKAV spesifik IgM ve IgG antikorlarının tespiti için geliştirilmiş ticari ELISA ve IFA kitleri mevcuttur. Ancak bu kitlerin tamamı insan antikorlarının tespiti için üretilmiştir. Hayvanlarda antikorların tespiti için geliştirilmiş ticari kitler bulunmamasına rağmen, bu kitlerin hayvanlar için uygulanabilir hale getirilmesi mümkündür. Ticari ELISA kitlerinin, hayvanlar için uygun hale getirildiği çalışmalar

bulunmaktadır. Ayrıca bazı çalışmalarda, in-house ELISA kitleri ile hayvanlarda antikor cevap araştırılmıştır (Mertens ve ark., 2013; OIE, 2014). Bunların dışında, ticari olarak temin edilebilen bir antijen-yakalayan ELISA kiti de mevcuttur (Mertens ve ark., 2013).

İnsan enfeksiyonlarında, hastalığın başlamasından yaklaşık yedi gün sonra KKKAV spesifik IgM ve IgG antikorları ELISA ve IFA ile tespit edilebilmektedir (Ergonul, 2006). Ancak yapılan bir çalışmada, viral nükleokapsid spesifik IgM antikorlarının hastalığın başlamasından ortalama 2-3 gün sonra, glikoprotein presürkor spesifik IgM antikorlarının 4-6 gün sonra ve IgG antikorlarının ise 5-6 gün sonra IFA ile tespit edilebileceğini bildirilmiştir (Ergunay ve ark., 2014). İnsanlarda enfeksiyondan sonra, IgM antikorları yaklaşık dört ay içinde tespit edilebilir seviyenin altına düşerken, IgG antikorları en az beş yıl boyunca tespit edilebilmektedir (Ergonul, 2006; Shayan ve ark., 2015). Ancak, şiddetli hastalık tablosu gösteren bazı insanlarda KKKAV spesifik antikorlar tespit edilememektedir (Dreshaj ve ark., 2016; Keshtkar-Jahromi ve ark., 2013).

1.6.3. Moleküler Tabanlı Teşhis Yöntemleri

Uygulama hızı ve kolaylığı, spesifitesinin/sentivitesinin yüksek olması ve bazı vakalarda antikor cevaptaki azlık veya yokluk durumları gibi nedenler göz önüne alındığında, hastalığın teşhisinde moleküler tabanlı teşhis yöntemlerinin kullanılması tavsiye edilmektedir (Mertens ve ark., 2013; Shayan ve ark., 2015; OIE, 2014). Bu tanı yöntemleri, genetik farklılıklarından dolayı tüm KKKAV izolatlarını tespit edemeye bilmektedir. İlk kullanılan RT-PCR yöntemleri ile yüksek genetik farklılık gösteren AP92 izolatı haricinde, farklı coğrafik bölgelerde sirküle olan çoğu virus hatları tespit edilebilmiştir (Bente ve ark., 2013). AP92 izolatının RT-PCR ile teşhis edilebilmesi için farklı primerlerin dizayn edilmesi gerekmektedir (OIE, 2014). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, KKKAV genomunun S segmentinde yüksek derece korunan 5'-NCR'nin varlığını ortaya koymaktadır. Bu bölgeye özgü dizayn

edilen primerler AP92 izolatının da yer aldığı yedi virus hattının tamamını tespit edilebilmektedir (Bente ve ark., 2013; Dreshaj ve ark., 2016). RT-PCR yöntemine göre daha yüksek sensitiviteye sahip real time RT-PCR (rt RT-PCR) yöntemi de hastalığın teşhisinde kullanılmaktadır. Bu yöntem ile mL’de 1164 virus kopyası tespit edilebilmektedir (OIE, 2014). Ayrıca, kantitatif rt RT-PCR (qrt RT-PCR) yöntemi ile viral yük tespiti yapılabilmektedir (Bente ve ark., 2013).

1.7.Tedavi

Hastalığa karşı etkili olduğu onaylanmış antiviral bir ilaç bulunmamakla birlikte tedavinin temelini destekleyici önlemler oluşturmaktadır (Leblebicioglu ve ark., 2016). Hastalar, klinik parametreler bakımından yakından izlenmeli ve tedavinin düzenlenebilmesi için kan indeksleri belirli aralıklarla analiz edilmelidir (Mertens ve ark., 2013). Genel destekleyici önlemler, kaybedilen sıvıların yerine konulmasını ve ağrı ile ateş yönetimi için parasetamol uygulamasını içermektedir (Leblebicioglu ve ark., 2016). Kan kaybının fazla olduğu durumlarda, kan nakli gerekebilmektedir (Ergonul, 2006; Mertens ve ark., 2013). Bunun yanı sıra antiviral tedavi için sıklıkla ribavirin kullanılmaktadır (Bente ve ark., 2013).

1.8.Koruma ve Kontrol

Hastalığa karşı ilk aşı çalışmaları, eski Sovyetler Birliği’nde 1970 yılında yapılmıştır. Fare beyrinde üretilen virusun formalin ile inaktive edilmesiyle geliştirilen bu aşının, tekrarlı uygulamalarında düşük seviyede antikor cevap meydana getirdiği tespit edilmesine rağmen koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılmamıştır. Benzer bir aşı uygulaması Bulgaristan’da yapılmıştır. Aşının koruyucu etkisinin kanıtı olarak ülkede görülen vaka sayıları gösterilmektedir. Aşı uygulamasının başladığı 1974 yılından önce Bulgaristan’da toplam 1100’den fazla vaka bildirilmiş olmasına rağmen sonraki 22 yıl boyunca sadece 279 vaka görülmüştür. Aşılanan hiçbir bireyde hastalık tespit edilmemesine rağmen dört kez

aşılama yapılan kişilerde bile nötralizan antikor titresi düşük seviyede bulunmuştur (Bente ve ark., 2013). İnsanlar için koruyucu aşı çalışmaları devam etmekte olup, henüz üretim izni alınmış bir aşı bulunmamaktadır. Alternatif bir uygulama olarak hayvanlarda uygulanabilecek bir aşı geliştirilmesi düşünülebilir. KKKAV enfeksiyonlarının, hayvanlarda klinik hastalık tablosu meydana getirmemesi ve ekonomik kayıplara neden olmamasından dolayı aşı uygulamalarının insanlara özgü olabileceği düşünülse de, hastalığın endemik olduğu bölgeler de hayvanların aşılması ile virusun insanlara ulaşmasını engelleyerek insan vakalarının azalmasına katkı sağlayacağı da düşünülmektedir (Mertens ve ark., 2013).

Hastalıkta korunmada vektör kene ile mücadele önemli yer tutmaktadır (Shayan ve ark., 2015). Ayrıca hastalığın endemik olduğu bölgelerde yaşayan insanlar kişisel koruyucu tedbirler almaya özen göstermelidir. Örneğin, vektör kenenin yoğun olarak bulunduğu bölgelerden uzak durulmalı, düzenli olarak giysilerin ve derinin kene yönünden kontrolü yapılmalı ve repellant (insekt savar, insekt uzaklaştırıcı) kullanılması gibi tedbirler alınmalıdır (Ergonul, 2006). Ayrıca olası viremik hayvan kanları ve dokuları ile temas etme ihtimali olan mezbaha çalışanları gibi insanların koruyucu önlem almaları önemlidir. Mezbaha çalışanları mutlaka koruyucu elbise, eldiven ve maske gibi tedbirler alarak çalışmalıdır (Ergonul, 2006; Shayan ve ark., 2015). Aynı şekilde, halk sağlığı çalışanları da gerekli koruyucu tedbirleri almadan çalışmamalıdır (Ergonul, 2006).

Mertens ve ark. (2013) tarafından, KKKAV'nin yönetimi ve kontrolü için bazı stratejiler önerilmektedir. İlk adım olarak, ülke ve/veya bölgeler risk durumlarına göre sınıflandırılmalıdır. İkinci adım ise, hastalık risklerinin belirlenmesi, önlemlerin karakterize edilmesi ve stratejilerin uygulanması olarak belirlenmiştir. Bu şekilde kategorizasyon yapıldıktan sonra araştırmacılar tarafından çeşitli risk durumlarına göre çeşitli koruyucu önlemler açıklanmıştır. Örneğin, hastalığın endemik olarak görüldüğü yüksek riskli bölgelerde, kesime gönderilmeden iki hafta öncesinde hayvanlara antiparazitler ilaç uygulanması durumunda, mezbaha çalışanlarının

enfekte kene veya viremik hayvanların kanlarına temas ihtimalinin azalacağını belirtilmektedir. Benzer şekilde, endemik alanlardaki canlı hayvanlara antiparaziter ilaç uygulanmasının kene popülasyonunu azaltacağından dolayı, bu endemik bölgelerden hastalığın görülmediği alanlara hayvan hareketleri ile kene girişinin engelleneceğini vurgulanmaktadır (Mertens ve ark., 2013).

Ülkemizde son 15 yıldır görülmekte olan KKKA hastalığı, bu süre zarfında 10000'nin üzerinde insanda tespit edilmiştir. Halk sağlığı açısından önemli bir problem olan hastalığın asıl bulaşma kaynağı enfekte keneler olarak kabul edilmektedir. Virus, enfekte hayvanların veya insanların kan ve organlarıyla temas ve nosokomial olarak da insanlara bulaşabilmektedir. Araştırmacılar tarafından bu diğer bulaşma yollarının önemi vurgulanmakta olup, İran ve Afganistan gibi ülkelerde hastalığın temel bulaşma yolu olarak enfekte hayvanların kan ve organlarıyla temas gösterilmektedir. Bu nedenle mezbaha çalışanları, veteriner hekimler gibi hayvan sağlığı çalışanları ve hayvan bakıcıları gibi meslekler hastalık açısından yüksek riskli grupta kabul edilmektedir. Ayrıca, nüfusunun büyük bir bölümü Müslüman olan ülkemizde, Kurban Bayramı sırasında halk elinde kontrolsüz olarak kurban kesiminin yapıldığı bilinmektedir. Hicri takvime göre belirlenen ve miladi takvime göre her yıl 10 gün önce kutlanan Kurban Bayramı önümüzdeki yıllarda kene aktivasyonunun en yoğun olduğu zamanlara denk gelmektedir. Ancak ülkemizde hayvanlardaki vireminin daha çok hangi aylarda görüldüğüne dair bir çalışma bulunmamaktadır. Hatta hayvanlardaki virus varlığı ile ilgili olarak sadece bir adet çalışma yapılmıştır. Bu durum yapılması gerekli olan risk analizi açısından büyük eksiklikler ortaya çıkarmaktadır. Bir ülke veya bölgedeki virus sirkülasyonunun en önemli göstergesi olarak o bölgenin evcil ve yabani hayvan popülasyonundaki seroprevalans oranları kabul edilmektedir. Ülkemizde şimdiye kadar hayvanlardaki seroprevalansla ilgili sadece beş adet çalışma bulunmaktadır. Serolojik çalışmaların azlığı da risk analizlerinin uygun bir şekilde yapılmasını engellemektedir. Bu noktalardan hareketle planlanan bu çalışmada, KKKA'nın endemik olarak görüldüğü Samsun, Sivas ve Tokat illerinde faaliyet gösteren mezbahalarda kesilen ruminant türlerinde (sığır, koyun ve keçi) yıl boyu örnekleme

yapılarak, hastalığın serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede;

- Bölgedeki ruminant türlerinde hastalığın varlığı ve yaygınlığının saptanması,
- Virusun sirkülasyonunda ve insanlara bulaşmasında bu hayvan türlerinin ne kadar etkin olabileceklerinin ortaya konulması,
- Hastalığın endemik olarak görüldüğü üç ilde, kesimi yapılan hayvan türlerinde olası KKKAV viremisinin mevsimsel dağılımının sorgulanması,
- Olası viremik hayvanlarda kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılarak viral yükün tespit edilmesi ve son konak olan insanların kesim esnasında temas edebileceği maksimum viral yük miktarının ortaya konulması,
- Daha önceki çalışmalarda potansiyel bulaşma kaynakları için bildirilmiş viral yük miktarları ile bu çalışma sonucunda tanımlanacak viral yükler arasındaki ilişkinin sorgulanması,
- Böylelikle, hayvanlarda yapılan serolojik çalışmaların azlığından dolayı ve hayvanlardaki viral yükün tespiti için moleküler yöntemlerle gerçekleştirilecek ilk kantitatif nitelikli bir araştırma olması sebebiyle, viremik hayvanlara ait öncelikli olarak kan ve diğer dokulara temas ile son konak olan insanlar için enfeksiyon riskinin değerlendirilmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.GEREÇ

2.1.1.Serolojik ve Virolojik Çalışmalarda Kullanılan Örnekler

Araştırma materyalleri, KKKAV enfeksiyonunun endemik olarak görüldüğü Samsun, Tokat ve Sivas illerinde faaliyet gösteren mezbahalarda kesimi yapılan sığır, koyun ve keçilerden temin edildi. Mezbahalarda hayvanların kesimini takiben serolojik testler için serum toplama tüplerine ve virolojik testler için ise EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Örneklem süresince hayvanlar kene enfestasyonu yönünden kontrol edildi. Kan örnekleri, 1 Eylül 2013 ile 31 Ağustos 2014 tarihleri arasında bir yıl boyunca toplandı. Bu süre boyunca her il ve mezbahalara aylık olarak düzenli ziyaretler yapılarak, mümkün olduğunca il, mezbaha ve hayvan türleri parametrelerine göre eşit dağılımlı örneklemeye çalışıldı. Ancak, mezbahalarda özellikle sığır türü hayvanların kesiminin fazla yapılması ve keçi türü hayvanların çok az kesilmesi nedeniyle eşit bir dağılım sağlanamadı. Örneklem sırasında, hayvanların küpe numaraları, yaşları ve cinsiyetleri kayıt altına alındı. Ayrıca, resmi veri tabanlarında hayvanlara ait bu bilgiler kontrol edildi. Bu süre sonunda, 939 sığır, 383 koyun ve 15 keçi olmak üzere toplam 1337 adet kan örneği toplandı. Hem serum toplama tüplerine hem de EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara getirildi. Serum toplama tüplerine alınan kan örnekleri laboratuvara getirildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen serumlar, 2 mL'lik steril tüplere aktarılarak test zamanına kadar -86°C'de muhafaza edildi. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ise laboratuvara getirildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen plazmalarda aynı şekilde 2 mL'lik steril tüplere aktarılarak test zamanına kadar -86°C'de muhafaza edildi. Örneklem süresince toplanan kan örneklerinin, ay, il, ilçe, mezbaha ve hayvan türlerine göre dağılımları Çizelge 2.1.'de gösterildi.

Çizelge 2.1. 2013-2014 yıllarında toplanan kan örneklerinin, ay, il, ilçe, mezbaha ve hayvan türlerine göre dağılımı.

İL	İLÇE	MEZBAHA	HAYVAN TÜRÜ	AYLAR												
				Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Toplam
Samsun	Vezirköprü	Belediye	Sığır	16	10	1	13	-	17	9	15	18	20	15	5	139
			Koyun	20	19	-	-	-	-	-	20	-	-	7	13	79
			Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6
Samsun	Ladik	Belediye	Sığır	1	16	-	-	-	2	-	-	2	2	5	-	28
			Koyun	13	-	12	10	14	3	10	-	-	7	9	-	78
			Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tokat	Turhal	Yeşilırmak	Sığır	27	6	24	14	26	28	17	40	36	14	25	-	257
			Koyun	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	21	25
			Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Tokat	Zile	Belediye	Sığır	4	3	6	10	3	4	2	5	1	6	7	5	56
			Koyun	32	-	5	2	-	2	11	23	20	8	-	10	113
			Keçi	-	-	6	-	-	-	-	1	-	1	-	-	8
Sivas	Merkez	Yurtseven	Sığır	12	20	17	12	43	15	26	10	36	20	30	30	271
			Koyun	24	20	-	-	-	8	-	31	-	-	-	-	83
			Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sivas	Merkez	Yıldız	Sığır	13	16	13	24	21	10	9	16	14	30	18	4	188
			Koyun	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	5
			Keçi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam				162	110	84	85	107	89	84	161	135	109	116	95	1337

2.1.2. Örnekleme Yapılan Mezbahalar

Örnekleme yapılan mezbahaların seçiminde, önceki yıllarda görülen insan vakalarının bildirildiği alanlara yakınlığı ve kesim kapasiteleri göz önüne alındı. Bu kriterlere göre her ilden iki adet mezbaha seçildi. Samsun ilinde insan vakaları özellikle Vezirköprü, Havza, Kavak ve Ladik ilçelerinde meydana gelmektedir (Sisman, 2013). Vezirköprü ve Ladik ilçelerinde bulunan ve işletmeciliği ilçe belediyeleri tarafından yapılan mezbahalar, kesim kapasiteleri yönünden daha uygun bulunarak, bu iki ilçede bulunan mezbahalardan örnekleme yapıldı. Tokat ilinde faaliyet gösteren mezbahalardan, kesim kapasitelerine göre Turhal ilçesinde bulunan özel Yeşilirmak mezbahası ve Zile ilçesinde bulunan belediye mezbahasından örnekleme yapıldı. Sivas ilinde ise il merkezinde faaliyet gösteren özel Yurtseven mezbahası ve özel Yıldız mezbahasından örnekleme yapıldı. Toplanan kan örneklerinin il, ilçe, mezbaha ve hayvan türlerine göre dağılımı Çizelge 2.2.'de gösterildi.

Çizelge 2.2. Toplanan kan örneklerinin il, ilçe, mezbaha, ve hayvan türlerine göre dağılımı.

İL	İLÇE	MEZBAHA	SIĞIR	KOYUN	KEÇİ	TOPLAM
Samsun	Vezirköprü	Belediye	139	79	6	224
	Ladik	Belediye	28	78	-	106
Tokat	Turhal	Yeşilirmak	257	25	1	283
	Zile	Belediye	56	113	8	177
Sivas	Merkez	Yurtseven	271	83	-	354
	Merkez	Yıldız	188	5	-	193
Toplam			939	383	15	1337

2.1.3. Virus ve Hücre Kültürü

Araştırmada serolojik olarak negatif ve pozitif kontrol serum örneklerinin doğrulanması amacıyla yapılan virus nötralizasyon testinde, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı virus koleksiyonunda bulunan KKKA saha izolatu (Kastamonu 2015) ile Vero E6 hücre kültürü kullanıldı. Hücreler

antibiyotik ve %5 Fötal Dana Serumı içeren DMEM büyütme vasatı (Sigma, Almanya) içinde çoğaltıldı.

2.1.4. Testlerde Kullanılan Kontrol Numuneleri

KKKAV spesifik IgG antikorlarının tespiti için yapılacak serolojik testlerde kullanılan pozitif ve negatif kontrol serum örnekleri, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda daha önce yapılan çalışmalardan temin edildi. Her üç hayvan türü için ayrı ayrı pozitif ve negatif kontrol serum örnekleri kullanıldı (Albayrak ve ark, 2012; Özüpak, 2017). Ayrıca, negatif kontrol serum olarak kullanılmak amacıyla, bildirilmiş insan vakası bulunmayan bölgelerdeki işletmelerden 4-7 aylık sığır, koyun ve keçilerden serum örnekleri toplandı. Her üç hayvan türü için pozitif ve negatif kontrol serum olarak kullanılması planlanan tüm örneklerin, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda VNT ile test edilerek uygunluğu kontrol edildi.

Plazma örneklerinde KKKAV varlığını test etmek için yapılacak qrt RT-PCR testinde kullanılacak pozitif örnek, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Bu amaçla daha önce bir hasta materyalinden RT-PCR tekniği ile çoğaltılan KKKAV'nin S segmentinin tamamını taşıyan plazmid DNA'sı kullanıldı.

2.1.5. ELISA Kitleri, Konjugatlar ve Validasyon

Bu amaçla ticari olarak temin edilen, insanlarda KKKAV spesifik IgG antikorlarını tespit eden VectorBest, D-5052, VectoCrimean-CHF-IgG ELISA kitinin (VectorBest, Novosibirsk, Rusya) hayvan IgG antikorlarına validasyonu yapılarak kullanıldı. Test sisteminin konjugatı (anti-human IgG peroksidaz) sığır, koyun ve

keçi için uygun olan ve aynı anda bu üç hayvan türüne ait IgG antikorlarına uyumlu çoklu tür konjugat ile değiştirildi. Kullanılan çoklu tür konjugat ticari bir firmadan (ID.vet, Grabels, Fransa) temin edildi. Konjugatın ve ELISA yönteminin validasyonu daha önce yayınlanmış çalışmalarda belirtilen yöntemle göre yapıldı (Mertens ve ark., 2015; Schuster ve ark., 2016).

2.1.6. Kantitatif rt RT-PCR, Primer-Problar ve Plazmid

Plazma örneklerinden RNA ekstraksiyonu, ticari olarak temin edilen ekstraksiyon kiti (Qiagen, RNeasy Mini Kit, Cat No: 74106, Hilden, Almanya) kullanılarak yapıldı. KKKAV nükleik asidinin varlığı, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda kullanılan qrt RT-PCR metodu ve primer-problar ile tespit edildi. Bu amaçla ticari olarak temin edilen tek aşamalı RT-PCR kiti (Qiagen, Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit, Cat No: 204574, Hilden, Almanya) kullanıldı. KKKAV S segmentine göre tasarlanan, primer ve problar da ticari olarak temin edildi. Test sırasında kullanılan primer-probların dizilimi ve özellikleri Çizelge 2.3.'de gösterildi. Pozitif örneklerden viral yük tespiti, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda hazırlanan $1,8 \times 10^9$ kopya/mL yoğunluğundaki plazmidin log10 tabanında seri sulandırmaları kullanılarak yapıldı.

Çizelge 2.3. qrt RT-PCR yönteminde kullanılan primer ve probların dizilimi.

Primer ve Prob Adı	Dizilimi 5'-3'	Lokalizasyon Bölgesi (S Segmenti)
KKKAV-S-F	5'-GCTGAGCTGAAGGTTGATGTTTC-3'	264
KKKAV-S-R	5'-ATGTCCTTCCTCCACTTGAGA-3'	302
KKKAV-S-PROB	FAM-5'-AGAACAACCTTGCCAATTACCAACAGGC-3'-BHQ1	298

2.1.7. Tek Aşamalı RT-PCR ve Dizi Analizi

Viral yükleri tespit edilen pozitif örnekler, dizi analizi amacıyla tek aşamalı RT-PCR ile test edildi. Kullanılan primerler ve lokalizasyonları Çizelge 2.4.'de gösterildi. Uygun örneklerin dizi analizi ticari firmalar aracılığı ile yaptırıldı.

Çizelge 2.4. Tek aşamalı RT-PCR yönteminde kullanılan primerlerin dizilimi (Rodriguez ve ark., 1997).

Primer Adı	Dizilimi 5'-3'	Lokalizasyon Bölgesi (S Segmenti)
F3	5'-GAATGTGCATGGGTTAGCTC-3'	290
R2	5'-GACATCACAAATTCACCAGG-3'	549

2.2.Yöntem

2.2.1.ELISA ile IgG Varlığının Araştırılması

Toplanan serum örnekleri, ticari ELISA kiti ile üretici firmanın test yönergesinde bazı değişiklikler yapılarak test edildi. Bu amaçla, ticari olarak temin edilen insan IgG antikorlarını tanıyan ELISA kitinin, daha önce bildirildiği şekilde (Mertens ve ark., 2015; Schuster ve ark., 2016) konjugatları değiştirilerek sığır, koyun ve keçi IgG antikorlarına göre validasyonu yapıldı.

Serum örnekleri, kontrol serumlar ve ELISA kiti, teste başlamadan önce 30 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Ayrıca, serum örnekleri, kontrol serumlar ve test reaktifleri kullanılmadan önce kısa bir vorteks işlemine tabi tutuldu. Test edilecek serum örnekleri için yapılan tüm işlemler kontrol serumlara da aynı şekilde uygulandı. Kit içerisinde bulunan yardımcı bir mikrotitrasyon pleyti aracılığı ile serum örnekleri ve kontrol serumlar ön serum dilüsyon solüsyonu (SPSD) ile 10 katlı olarak sulandırıldı. Yardımcı pleyt kuyucuklarına 90 µL SPSD ve 10 µL serum

örneği konularak pipete edildi. Pipetasyon sonrasında SPSPD'nin koyu kırmızı renginin sarı renk aldığı gözlemlendi. Üretici firma tarafından renk değişiminin olmadığı durumlarda, ilgili test örneği sonucunun doğru olmayabileceği belirtmektedir. Sulandırılan serum örnekleri, serum dilüsyon solüsyonu (SDB) ile tekrar 10 katlı olarak sulandırıldı. Bu amaçla, testin yapılacağı pleyte 90 µL SDB konuldu ve üzerine 10 µL yardımcı pleytteki serum örneklerinden konulduktan sonra pipete edildi. Bu iki aşamalı sulandırma ile serum örnekleri ve kontrol serumlar 100 katlı sulandırılmış oldu. Kontrol serumlar tekrarlı olarak iki kuyucuğa konulurken, serum örnekleri tek kuyucuğa konuldu. Kit içerisinde bulunan yapışkan film ile pleytin üzeri kapatılarak, pleyt orbital çalkalayıcıda (Heidolph Inkubator 1000, Schwabach, Almanya) 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Kit içerisinde bulunan konsantre yıkama solüsyonu (konsantre PBS-T), distile su ile 25 katlı olarak sulandırıldı. Böylece, sulandırılmış yıkama solüsyonu (PBS-T) kullanım için hazır hale getirildi. İnkübasyon sonrası yapışkan film çıkarıldıktan sonra pleyt, hazırlanan PBS-T ile ELISA yıkayıcıda (Biotek Elx50, Winooski, ABD) beş kez yıkandı. Çoklu tür konjugat, PBS-T ile 50 katlı olarak sulandırıldı. Sulandırılan çoklu tür konjugat tüm kuyucuklara 100 µL konuldu. Pleytin üzeri yapışkan film ile kapatılarak orbital çalkalayıcıda 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Pleyt, üzerinde bulunan yapışkan film çıkarıldıktan sonra hazırlanan PBS-T ile ELISA yıkayıcıda tekrar beş kez yıkandı. Yıkama işlemini takiben tüm kuyucuklara 100 µL tetramethylbenzidine (TMB) solüsyonu konuldu. Schuster ve ark. (2016) tarafından, tavsiye edilen şekilde oda sıcaklığında (18-25°C'de) 10 dakika karanlık bir ortamda bekletildi. Süre sonunda, tüm kuyucuklara 100 µL ELISA kiti içinde sunulan stop solüsyonu (H₂SO₄) konuldu. ELISA okuyucuda (Biotek ELx800, Winooski, ABD), ana filtre 450 nm ve referans filtre 650 nm seçilerek okuma yapıldı.

Üretici firma tarafından test geçerliliği için negatif kontrollerin ortalaması 0.250 OD değerini aşmaması ve pozitif kontrollerin ortalaması ise 1.000 OD değerinin altında olmaması istenilmektedir. Yapılan testlerde kullanılan kontrol serumlar belirtilen şartlara uygun olarak tespit edildi. Serum örneklerinin değerlendirilmesi, Schuster ve ark. (2016) tarafından belirtilen şekilde yapıldı. Serum

örnekleri, 0.500 OD değerine eşit veya altında ise negatif, 0.500-0.700 OD değerleri arasında ise şüpheli ve 0.800 OD değerinin üzerinde ise pozitif olarak kabul edildi.

2.2.2. Virus Nötralizasyon Testi

Araştırmada serolojik olarak pozitif ve negatif kontrol serum örneklerinin doğrulanması amacıyla yapılan virus nötralizasyon testi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan biyogüvenlik seviyesi-3 laboratuvarında gerçekleştirildi. VNT, Tuncer ve ark. (2014) tarafından KKKAV antikorlarının varlığını ortaya koymak için uygulanan yöntemle göre yapıldı. Bu amaçla test edilecek serum örnekleri 1:2 oranında Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) ile seyreltildi. Daha sonra seyreltilen serum örnekleri ile 100 DIKD₅₀ oranında sulandırılmış KKKAV izolatı (Kastamonu 2015) eşit hacimde (100 µL) karıştırılarak 37°C'de %5 CO₂'li etüvde bir saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonrasında serum-virus karışımı 24 gözlü pleytlere hazırlanmış bir günlük yaştaki Vero E6 hücreleri üzerine inoküle edildi. Her serum örneği için iki kuyuya inokülasyon yapıldı ve pleytler 37°C'de %5 CO₂'li etüvde dört gün inkübe edildi. Bu sürenin sonunda virus üremesine bağlı CPE meydana gelip gelmediğini gözlemlemek amacıyla pleytler hücre kültürü mikroskopunda incelendi. Test kuyucuklarında bulunan Vero E6 hücrelerinde CPE oluşumunun gözlemlenmemesi, test edilen serum örneklerinde KKKAV antikorlarının varlığı ve dolayısıyla virusun nötralize olduğu şeklinde yorumlandı.

2.2.3.RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu için plazma örnekleri kullanıldı ve ticari ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın belirttiği şekilde yapıldı. Plazma örnekleri ve kit reaktifleri oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Steril 1,5 mL hacimli tüpler içerisine, kitin içerisinde bulunan RLT bufferdan 600 µL (hacminin %1'i oranında beta-merkaptoetanol içeren) konuldu. Bunun üzerine, 100 µL plazma örneği ilave edildi.

Vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında beş dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonrasında %70'lik etanolden 600 µL ilave edildi ve pipet yardımı ile iyice karıştırıldı. Daha sonra 2 mL hacimli toplama tüpü içerisine yerleştirilen RNeasy spin kolonuna, karışımdan 700 µL aktarıldı ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü içerisindeki sıvı atılarak uzaklaştırıldı. RNeasy spin kolonuna karışımın kalan kısmı eklendi ve aynı şekilde 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü içerisindeki sıvı tekrar atılarak uzaklaştırıldı. RNeasy spin kolonuna kit içerisinde bulunan RW1 bufferdan 700 µL eklendi ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Daha sonra toplama tüpü yenisiyle değiştirildi. RNeasy spin kolonuna 500 µL RPE buffer ilave edildi ve 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atılarak uzaklaştırıldı. RNeasy spin kolona tekrar 500 µL RPE buffer eklendi ve 12000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atılarak, RNeasy spin kolon steril 1,5 mL hacimli tüp içerisine yerleştirildi. Üzerine RNase ve DNase içermeyen distile su 50 µL hacminde konuldu ve 10000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. RNeasy spin kolon uzaklaştırılarak, tüpün alt kısmında kalan RNA örnekleri test edilene kadar -20°C'de saklandı.

2.2.4. Kantitatif rt RT-PCR ile KKKAV Varlığının Araştırılması

KKKAV varlığının ortaya konulması için yapılan qrt RT-PCR işlemleri LightCycler 2.0 (Roche, Rotkreuz, İsviçre) cihazında gerçekleştirildi. Ticari olarak temin edilen tek aşamalı RT-PCR kiti kullanılarak qrt RT-PCR testleri yapıldı. Buz aküsü üzerinde hazırlanan 20 µL hacimli reaksiyon karışımının içerisine; 12,5 µL 2X Rotor-Gene Probe PCR master miks, 5,25 µL distile su, 0,8 µL her iki primerden, 0,4 µL prob ve 0,25 µL Rotor-Gene enzim miks konuldu. Bu reaksiyon karışımının üzerine 5 µL RNA eklenerek toplam reaksiyon hacmi 25 µL olarak hesaplandı. Primer ve prob lar 10 pmol yoğunluğunda kullanıldı. Hazırlanan reaksiyon karışımı, cihaza özel cam kapillarlara konulduktan sonra LightCycler santrifüj adaptörleri yardımıyla kısa bir süre santrifüj edildi. Daha sonra cam kapillalar cihazın karoseline yerleştirildi. Hazırlanan reaksiyon karışımları Lightcycler 2.0 cihazında, RNA'ların komplementer DNA'lara çevrilmesi ve sonrasında revers transkriptaz

enziminin inaktivasyonu için sırasıyla, 50°C’de 10 dakika ve 95°C’de 5 dakika bekletildi. Bu işlemi takiben, 40 tekrarlı olarak ön denatürasyon için 95°C’de 5 saniye ve bağlama/sentez basamağı için 60°C’de 10 saniye bekleme uygulandı. Son olarak soğutma işlemi için 40°C’de 30 saniye bekletildi ve reaksiyon sonlandırıldı. Sonuçlar, cihaza bağlı olan bilgisayar yardımı ile test sırasında gerçek zamanlı olarak takip edildi.

2.2.5. Viral Yük Tespiti

KKKAV nükleik asiti tespit edilen örnekler, viral yük miktarlarının ortaya konulması için tekrar qrt RT-PCR ile test edildi. Bu amaçla KKKAV S segmentinin tamamını taşıyan plazmidin log10 tabanında seri sulandırılmaları yapıldı. Böylece $1,8 \times 10^6$ ile $1,8 \times 10^1$ kopya/mL arasında altı farklı yoğunluğa sahip plazmidler elde edildi ve test için kullanıldı. Virus nükleik asiti tespit edilen örnekler ve plazmidler aynı anda “2.2.3.qrt RT-PCR ile KKKAV Varlığının Araştırılması” bölümünde belirtilen şekilde tekrar test edildi. Örneklerin viral yükleri LightCycler 2.0 cihazındaki uygulama arayüzü yardımıyla hesaplandı.

2.2.6. Tek Aşamalı RT-PCR ve Dizi Analizi

Örneklerde tespit edilen KKKA virüslerinin filogenetik değerlendirmesini yapmak amacıyla, sadece bu örneklerden thermal cycler cihazında (Thermo Fisher Sci., Arktik Thermal Cycler, Vantaa, Finland) tek aşamalı RT-PCR yapıldı. Rodriguez ve ark. (1997) tarafından bildirilen primerler ile yapılan tek aşamalı RT-PCR testi için, ticari olarak temin edilen tek aşamalı RT-PCR kiti (Qiagen, OneStep RT-PCR Kit, Cat No: 210212, Hilden, Almanya) kullanıldı. Buz aküsü üzerinde hazırlanan 45 µL hacimli reaksiyon karışımının içerisine; 10 µL 5X buffer, 29 µL distile su, 2 µL dNTPs miks, 1 µL her iki primerden (20 pmol yoğunluğunda) ve 2 µL enzim miks konuldu. Bu reaksiyon karışımının üzerine 5 µL RNA eklenerek toplam reaksiyon hacmi 50 µL olarak hesaplandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı 0,2

mL'lik steril tüplere konularak thermal cycler'a yerleştirildi. Thermal cycler'da uygulanan ısı koşulları ise: tek tekrarlı 42°C'de 1 saat ve 95°C'de 5 dakikayı takiben 40 tekrarlı 94°C'de 45 saniye, 55°C'de 45 saniye ve 72°C'de 1 dakika olarak uygulandı ve son olarak tek tekrarlı 72°C'de 10 dakika ile reaksiyon sonlandırıldı. PCR ürünleri, %1,5'lük agaroz jele aktarıldı ve 30 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. Daha sonra agaroz jel, görüntüleme cihazında (Kodak, Gel Logic 200 Imaging System, New York, ABD) incelenerek 260 bp'lik bant veren örnekler pozitif olarak kabul edildi. Pozitif örneklerin dizi analizi hizmet satın alma yöntemiyle ticari firmaya yaptırıldı.

2.2.7. Sonuçların İstatistiksel Olarak İncelenmesi

Yapılan testler ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri, Ki-Kare testi kullanılarak değerlendirildi. Keçi örneklerinin sayısal olarak yetersiz olmasından dolayı Ki-Kare testine dahil edilmedi.

3. BULGULAR

3.1.KKKAV Seroprevalansının Belirlenmesi

Hastalığın endemik olarak görüldüğü Samsun, Sivas ve Tokat illerinde faaliyet gösteren altı ayrı mezbahadan 1 Eylül 2013 ile 31 Ağustos 2014 ayları arasında toplam 1337 adet serum örneği toplandı. Örneklem süresince hayvanlar kene enfestasyonu yönünden kontrol edildi. Ancak, hiçbir hayvanda kene enfestasyonuna rastlanılmadı. Ayrıca, toplanan serum örnekleri ELISA ile test edilmeden önce konjugatların ve ELISA sisteminin validasyonu yapıldı. Bu amaçla insanlarda KKKAV spesifik IgG antikorlarını tespit eden ELISA kitinin konjugatı, sığır, koyun ve keçi IgG antikorlarını tespit edebilen çoklu tür konjugat ile değiştirildi. ELISA sisteminin ve konjugatların validasyonu daha önce yayınlanmış çalışmalara göre yapıldı (Mertens ve ark., 2015; Schuster ve ark., 2016). Pozitif ve negatif kontrol serumlar tekrarlı olarak test edildi ve yayınlanmış önceki çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edildi. Daha sonra pozitif kontrol serumlar log₂ tabanında sulandırılarak tekrarlı olarak test edildi ve keçilerde kullanılan pozitif kontrol serumların 128 katlı sulandırmaya kadar pozitifliğini koruduğu, ancak sığır ve koyunlarda pozitif kontrol serumların pozitifliğini 32 katlı sulandırmaya kadar korudukları saptandı.

Mezbahalarda kesimi yapılan hayvanlardan toplanan 1337 adet serum örneği, KKKAV spesifik IgG antikor varlığı yönünden ELISA ile test edildi. ELISA testi ile şüpheli sonuç veren serum örnekleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda VNT ile test edildi ve yapılan test sonucuna göre negatif kabul edildi. Test edilen 1337 adet serum örneğinden toplam 365 serum örneği pozitif bulundu ve seroprevalans %27,30 olarak tespit edildi. Bir yıl süren örneklem sırasında, sığırlardan 939 adet serum örneği, koyunlardan 383 adet serum örneği ve keçilerden ise 15 adet serum örneği toplandı. Hayvan türlerine göre seropozitiflik ve seroprevalans oranları ise, sığırlarda seropozitiflik 340/939 ve seroprevalans oranı

%36,21, koyunlarda seropozitiflik 24/383 ve seroprevalans oranı %6,27 ve de keçilerde seropozitiflik 1/15 ve seroprevalans oranı %6,67 olarak tespit edildi. Hayvan türlerinde tespit edilen seropozitiflik ve seroprevalans oranları istatistiksel olarak Ki-Kare testi ile analiz edildi. Keçilerden alınan hem örnek sayısı hem de seropozitif hayvan sayısı yeterli olmadığı için istatistiksel analize dahil edilmedi. Yapılan Ki-Kare testine ($p<0,001$) göre sığır ve koyunlarda tespit edilen seropozitiflik ve seroprevalans oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Hayvan türleri açısından mezbahalara göre seroprevalans oranları ise, sığırlarda %7,14-53,19 arasında, koyunlarda %0-12 arasında ve keçilerde ise %0-12,5 oranında tespit edildi. Sığırlarda en düşük seroprevalans oranı Samsun ili Ladik ilçesi Belediye mezbahasında %7,14 ve en yüksek seroprevalans oranı Sivas ili merkez ilçesi özel Yıldız mezbahasında %53,19 olarak bulundu. Sivas ilinde faaliyet gösteren özel Yurtseven mezbahası ile özel Yıldız mezbahasında sığırlardaki seroprevalans oranları diğer mezbahalara göre daha yüksek oranda, sırasıyla, %49,81 ve %53,19 olarak tespit edildi. Koyunlarda en yüksek seroprevalans oranları, Samsun ili Ladik ilçesi Belediye mezbahasında %11,54 ve Tokat ili Turhal ilçesi özel Yeşilirmak mezbahasında %12 olarak bulundu. Keçilerde istenilen miktarda örnekleme yapılamamakla birlikte tespit edilen tek seropozitifliğin olduğu Tokat ili Zile ilçesi Belediye mezbahasında seropozitiflik %12,5 olarak tespit edildi. KKKAV'nin seroprevalans oranlarının, il, mezbaha ve hayvan türlerine göre dağılımı Çizelge 3.1.'de gösterildi.

Çizelge 3.1. KKKAV'nin seroprevalans oranlarının, il, mezbaha ve hayvan türlerine göre dağılımı. P/Ö: Seropozitif hayvan sayısı/Örnekleme yapılan hayvan sayısı. Ki-Kare testi ($P<0,001$) ile anlamlı farklılıklar sığır (^A) ve koyun (^B) örneklerinde tespit edildi.

İL	İLÇE	MEZBAHA	SIĞIR		KOYUN		KEÇİ	
			P/Ö	Oran(%)	P/Ö	Oran(%)	P/Ö	Oran(%)
Samsun	Vezirköprü	Belediye	20/139	14,39	3/79	3,80	-/6	-
	Ladik	Belediye	2/28	7,14	9/78	11,54	-	-
Tokat	Turhal	Yeşilirmak	68/257	26,46	3/25	12	-/1	-
	Zile	Belediye	15/56	26,79	5/113	4,42	1/8	12,5
Sivas	Merkez	Yurtseven	135/271	49,81	4/83	4,82	-	-
	Merkez	Yıldız	100/188	53,19	-/5	-	-	-
Toplam			340/939	36,21 ^A	24/383	6,27 ^B	1/15	6,67

Keçi örneklerinin dahil edilmediği, sığır ve koyun örneklerinde tür ayrımı yapılmadan seropozitiflik ve seroprevalans oranlarının illere veya mezbahalara göre farklılığı yapılan Ki-Kare testi ($p<0,001$) ile anlamlı bulundu. İllere göre sığır ve koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranları incelendiğinde, Sivas ilinde kesimi yapılan hayvanlarda tespit edilen seroprevalans oranının diğer illere göre dikkat çekici şekilde yüksek olduğu görüldü. Benzer sonuçlar mezbahalara göre seroprevalans oranları incelendiğinde de tespit edildi. Mezbahalara göre en yüksek seroprevalans oranları, Sivas ilinde faaliyet gösteren özel Yurtseven mezbahası ve özel Yıldız mezbahasında saptandı. Ayrıca Tokat ili Turhal ilçesinde faaliyet gösteren özel Yeşilirmak mezbahasında da seroprevalans oranının yüksek olduğu görüldü. Sığır ve koyun örneklerinde toplam seroprevalans oranlarının illere ve mezbahalara göre dağılımı Çizelge 3.2.'de gösterildi.

Çizelge 3.2. Sığır ve koyun örneklerinde toplam seroprevalans oranlarının illere ve mezbahalara göre dağılımı. P/Ö: Seropozitif hayvan sayısı/Örnekleme yapılan hayvan sayısı. Ki-Kare testi ($P<0,001$) ile anlamlı farklılıklar tespit edildi.

İL	İLÇE	MEZBAHA	SIĞIR-KOYUN		İL GENELİ	
			P/Ö	Oran(%)	P/Ö	Oran(%)
Samsun	Vezirköprü	Belediye	23/218	10,55	34/324	10,49
	Ladik	Belediye	11/106	10,38		
Tokat	Turhal	Yeşilirmak	71/282	25,18	91/451	20,18
	Zile	Belediye	20/169	11,83		
Sivas	Merkez	Yurtseven	139/354	39,26	239/547	43,69
	Merkez	Yıldız	100/193	51,81		

Aylık olarak düzenli yapılan mezbaha ziyaretleri ile alınan serum örneklerinin ELISA ile test edilmesi sonucunda, kesimi yapılan hayvan türlerinin aylara göre seropozitiflik durumları tespit edildi. Buna göre sığırların aylara göre seroprevalans oranları %23,29-63,93 arasında, koyunların seroprevalans oranları %0-25 arasında ve keçilerin ise seroprevalans oranları %0-100 oranlarında bulundu. Sığırlarda aylara göre en yüksek seroprevalans oranı %63,93 ile Kasım ayında ve koyunlarda ise %25 ile Aralık ayında tespit edildi. Keçilerde tespit edilen tek seropozitif serum örneği ise Haziran ayında bulundu. Örnek dağılımının düzenli olmadığı veya örnekleme

sayısının azlığından dolayı koyun ve keçilerde tespit edilen seroprevalans oranlarının aylara göre farklılığı istatistiksel olarak analiz edilemedi. Ancak yapılan Ki-Kare testi ($p<0,001$) ile sığır örneklerinde tespit edilen seroprevalans oranlarının aylara göre anlamlı farklılıklar gösterdiği görüldü. KKKAV'nin seroprevalans oranlarının aylara ve hayvan türlerine dağılımı Çizelge 3.3.'de gösterildi.

Çizelge 3.3. KKKAV'nin seroprevalans oranlarının aylara ve hayvan türlerine göre dağılımı. P/Ö: Seropozitif hayvan sayısı/Örnekleme yapılan hayvan sayısı. (^A) Sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranlarının aylara göre anlamlı farklılıklar gösterdiği yapılan Ki-Kare testi ($P<0,001$) ile görüldü.

AYLAR	SIĞIR ^A		KOYUN		KEÇİ	
	P/Ö	Oran(%)	P/Ö	Oran(%)	P/Ö	Oran(%)
Eylül	17/73	23,29	7/89	7,86	-	-
Ekim	22/71	30,99	1/39	2,56	-	-
Kasım	39/61	63,93	1/17	5,88	-/6	-
Aralık	21/73	28,77	3/12	25	-	-
Ocak	36/93	38,71	1/14	7,14	-	-
Şubat	29/76	38,16	-/13	-	-	-
Mart	29/63	46,03	-/21	-	-	-
Nisan	26/86	30,23	5/74	6,76	-/1	-
Mayıs	36/107	33,64	-/28	-	-	-
Haziran	37/92	40,22	1/16	6,25	1/1	100
Temmuz	27/100	27	2/16	12,5	-	-
Ağustos	21/44	47,73	3/44	6,82	-/7	-
Toplam	340/939	36,21	24/383	6,27	1/15	6,67

Hayvan türlerinde tespit edilen seroprevalans oranları üzerine cinsiyet farklılığının etkisi incelendi. Ki-Kare testi ($p<0,001$) ile sığır örneklerinde tespit edilen seroprevalans oranlarının cinsiyete bağlı olarak anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Dişi sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranının erkek sığırlara göre çok daha yüksek olduğu görüldü. Şöyle ki sığırlarda, dişi hayvanlardan alınan 547 adet serum örneğinin 275 adedinde seropozitiflik tespit edilirken, erkek hayvanlardan alınan 392 adet serum örneğinin 65 adedinde seropozitiflik tespit edildi. Bu sonuçlara göre örnekleme yapılan dişi sığırlarda seroprevalans oranı %50,27 ve erkek sığırlarda seroprevalans oranı ise %16,58 olarak bulundu. Tüm sığır örnekleri içerisinde dişi sığırların seroprevalans oranı %29,29 ve erkek sığırların seroprevalans oranı ise %6,92 olarak tespit edildi. Koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranının cinsiyete göre değişimi Ki-Kare testi ile incelendiğinde istatistik olarak anlamlı

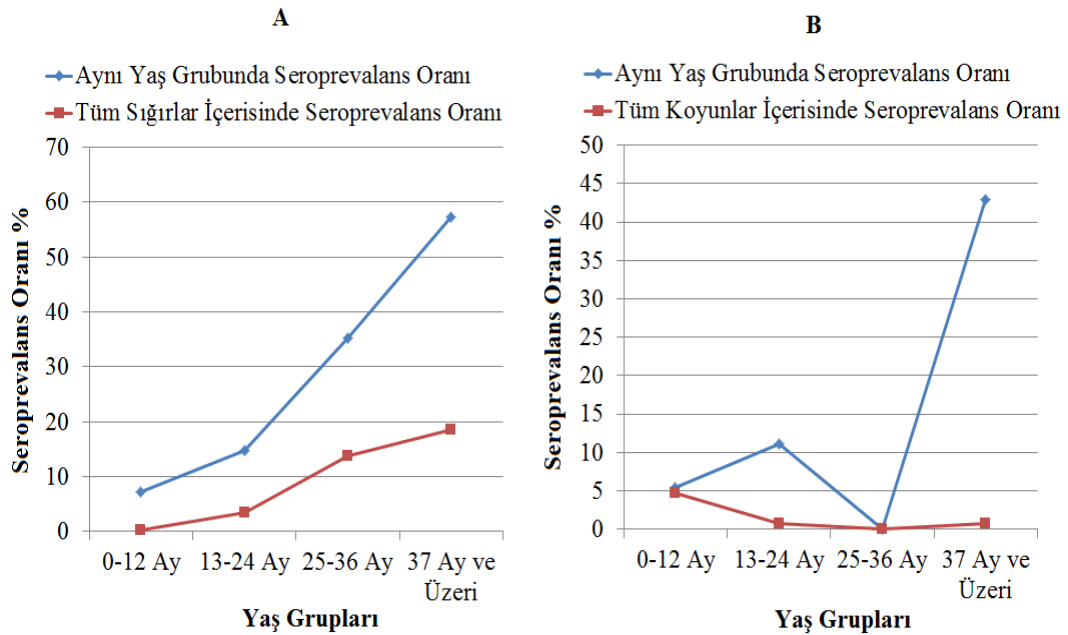
farklılıklar tespit edilemedi. Koyunlarda, erkek hayvanlardan alınan 217 adet serum örneğinin 10 adedinde seropozitiflik tespit edilirken, dişi hayvanlardan alınan 166 adet serum örneğinin 14 adedinde seropozitiflik tespit edildi. Örneklemeye yapılan erkek koyunlarda seroprevalans oranı %4,61 ve dişi koyunlarda seroprevalans oranı ise %8,43 olarak bulundu. Tüm koyun örnekleri içerisinde erkek koyunların seroprevalans oranı %2,61 ve dişi koyunların seroprevalans oranı ise %3,66 olarak tespit edildi. Keçi örneklerinde tespit edilen tek seropozitiflik erkek hayvana ait serum örneğinden elde edildi. Sığırlarda cinsiyete göre KKKAV'nin seroprevalans oranı Çizelge 3.4.'de gösterildi.

Çizelge 3.4. Sığırlarda cinsiyete göre KKKAV'nin seroprevalans oranları. Ki-Kare testi ($P<0,001$) ile anlamlı farklılıklar tespit edildi.

	Dişi		Erkek		Toplam	
	Sayı	Oran(%)	Sayı	Oran(%)	Sayı	Oran(%)
Örneklemeye	547	58,25	392	41,75	939	
Cinsiyete Göre Seropozitiflik	275/547	50,27	65/392	16,58	340	
Sığırlarda Seropozitiflik	275/939	29,29	65/939	6,92	340/939	36,21

Ayrıca, tespit edilen seroprevalans oranlarının hayvan türleri içerisinde örneklemeye yapılan yaşlara göre dağılımları incelendi. Bu amaçla, örneklemeye yapılan hayvanlar yaşlarına göre, 0-12 ay, 13-24 ay, 25-36 ay ve 37 ay ile üzeri yaşlardaki hayvanlar olarak 4 farklı gruba ayrıldı. Örnek sayısının yetersizliğinden dolayı keçilerin dahil edilmediği, sığır ve koyun örneklerinin tür ayrımı yapılmadan yaş gruplarına göre seroprevalans oranlarındaki farklılıklar Ki-Kare testi ($p<0,001$) ile incelendiğinde, sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yaşın ilerlemesine bağlı olarak tespit edilen seroprevalans oranının arttığı görüldü. Ancak sığır ve koyunlar ayrı ayrı Ki-Kare testi ile analiz edildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bu sonucun sığır örneklerinden kaynaklandığı (Ki-Kare, $p<0,001$) ve koyunlarda ise tespit edilen seropozitif örneklerin azlığından dolayı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşıldı. Bu bilgilere göre sığırlarda, 0-12 aylık yaştaki 42 hayvandan üç adedinde, 13-24 aylık yaştaki 224 hayvandan 33 adedinde, 25-36 aylık yaştaki 367 hayvandan 138 adedinde ve 37 ay ve üzeri yaştaki 306 hayvandan 176 adedinde seropozitiflik tespit edildi. Yaşın artmasına bağlı olarak mezbahalarda kesilen sığır sayısında arttığı ve aynı şekilde tespit edilen seroprevalans oranının da yaşın artmasına bağlı olarak

yükseldiği tespit edildi. Sığırlarda yaş gruplarına göre seroprevalans oranları, 0-12 aylık yaştaki sığırlarda %7,14, 13-24 aylık yaştaki sığırlarda %14,73, 25-36 aylık yaştaki sığırlarda %34,88 ve 37 ay ile üzeri yaştaki sığırlarda %57,52 olarak bulundu. Sığırlarda yaş gruplarına göre tespit edilen seropozitifliğin tüm yaşlardaki sığır örneklerine göre seroprevalans oranları ise, küçük yaştaki hayvanlardan büyük yaştaki hayvanlara göre sırasıyla, %0,32, %3,51, %13,64 ve %18,74 olarak tespit edildi. Koyunlarda ise yaşın artması ile mezbahalarda kesilen hayvan sayısında azalma olduğu tespit edildi. Örnekleme yapılan 383 adet koyunun 331 adedi (%86,42) 0-12 aylık yaşta iken diğer yaş gruplarında toplam 52 adet (%13,58) koyun örnekleme yapıldı. Tespit edilen 24 adet seropozitif koyun serumunun 18 adedi 0-12 aylık yaştaki koyun serumlarına ait olduğu görüldü. Yaş grupları içerisinde tespit edilen seroprevalans oranlarında yaşın artması ile yükselme tespit edilmesine rağmen tüm yaşlardaki koyunlar esas alındığında en yüksek seroprevalans oranı %4,71 ile 0-12 aylık yaştaki koyunlarda tespit edildi. Keçilerde tespit edilen tek seropozitiflik 13-24 aylık yaş grubundaki keçi serumundan tespit edildi. Sığır ve koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranlarının, hem aynı yaş grubundaki hayvanlardaki oranı hem de aynı tür içindeki hayvanların tümüne göre dağılımı Şekil 3.1.'de gösterildi. Ayrıca, yaş gruplarına göre, hayvan türlerinde KKKAV'nin seroprevalans oranlarının dağılımı Çizelge 3.5.'de gösterildi.

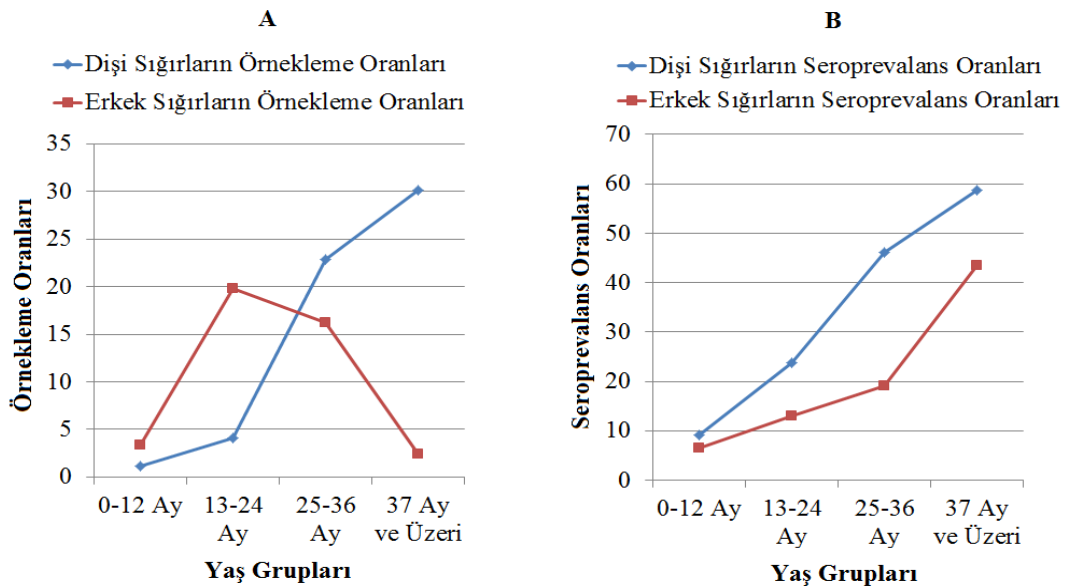


Şekil 3.1. Yaşlara göre seroprevalans oranlarının dağılımı. A: Sığırlarda, B: Koyunlarda.

Çizelge 3.5. Yaş gruplarına göre, hayvan türlerinde KKKAV'nin seroprevalans oranlarının dağılımı. (^A) Sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranlarının yaş gruplarına göre anlamlı farklılıklar gösterdiği yapılan Ki-Kare testi ($P<0,001$) ile görüldü.

HAYVAN TÜRÜ		0-12 AY		13-24 AY		25-36 AY		37 AY VE ÜSTÜ		TOPLAM	
		Sayı	Oran(%)	Sayı	Oran(%)	Sayı	Oran(%)	Sayı	Oran(%)	Sayı	Oran(%)
Sığır ^A	Örnekleme	42	4,47	224	23,86	367	39,08	306	32,59	939	
	Yaş grubu Seropozitiflik	3/42	7,14	33/224	14,73	128/367	34,88	176/306	57,52	340	
	Hayvan Türü Seropozitiflik	3/939	0,32	33/939	3,51	128/939	13,64	176/939	18,74	340/939	36,21
Koyun	Örnekleme	331	86,42	27	7,05	18	4,70	7	1,83	383	
	Yaş grubu Seropozitiflik	18/331	5,44	3/27	11,11	-/18	-	3/7	42,86	24	
	Hayvan Türü Seropozitiflik	18/383	4,71	3/383	0,78	-/383	-	3/383	0,78	24/383	6,27
Keçi	Örnekleme	13	86,66	1	6,67	1	6,67	-	-	15	
	Yaş grubu Seropozitiflik	-/13	-	1/1	100	-/1	-	-	-	1	
	Hayvan Türü Seropozitiflik	-/15	-	1/15	6,67	-/15	-	-	-	1/15	6,67

Yapılan sığır örneklemelerinde cinsiyete göre yaş gruplarındaki seroprevalans oranları incelendiğinde, Ki-Kare testi ($p<0,001$) ile anlamlı farklılıkların olduğu görüldü. Hem dişi hem de erkek sığırlarda yaşı ilerlemesi ile seroprevalans oranının arttığı tespit edildi. Dişi sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranı tüm yaş gruplarında erkek sığırlara göre daha yüksek bulundu. Özellikle 25 ay ve üzeri yaştaki dişi sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranının hem dişi hem de erkek diğer yaş gruplarındaki sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranlarından çok daha yüksek olduğu görüldü. Örneklemeye yapılan tüm sığırlarda tespit edilen seropozitiflik 340/939 iken 25 ay ve üzeri yaştaki dişi sığırlarda tespit edilen seropozitiflik 265/939 olarak bulundu ve sırasıyla seroprevalans oranları ise %36,21 ve %28,22 olarak tespit edildi. Ayrıca, mezbahalarda kesilen dişi sığır sayısında yaşı artmasına bağlı olarak artış olduğu ve aynı şekilde tespit edilen seroprevalans oranının da yaşı artmasına bağlı olarak yükseldiği görüldü. Özellikle kesimi yapılan dişi sığırların 25 ay ve üzeri yaşıta olduğu tespit edildi. Ancak kesimi yapılan 392 adet erkek sığırın 338 adedi (%86,22), 13-36 aylık yaş aralığında yer aldığı saptandı. Örneklemeye yapılan dişi ve erkek sığır oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı ile tespit edilen seroprevalans oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı Şekil 3.2.'de gösterildi. Ayrıca, dişi ve erkek sığırlarda tespit edilen seropozitif örneklerin hem tüm sığır örnekleri ile oranı hem de yaş gruplarına göre oranı Çizelge 3.6.'de gösterildi.



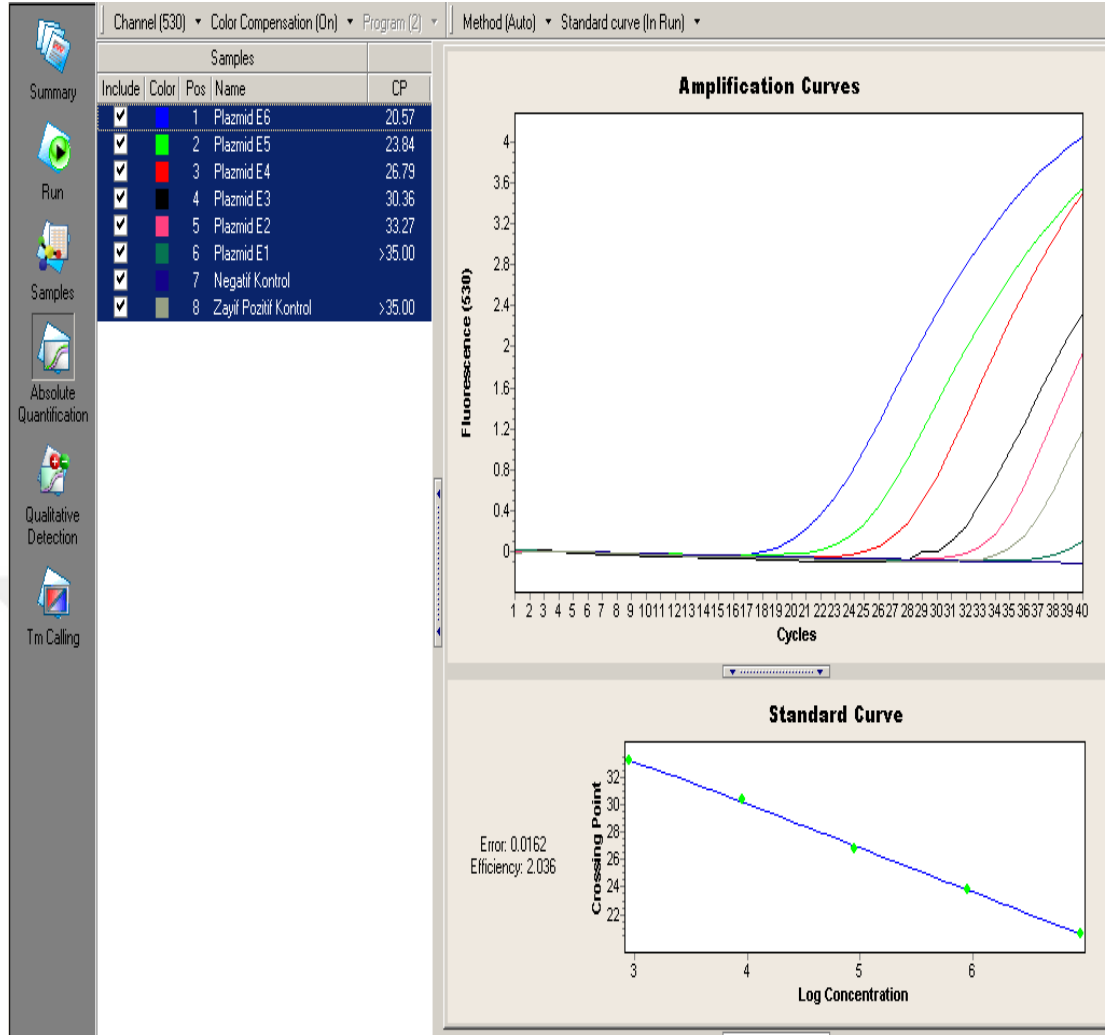
Şekil 3.2. Örneklemeye yapılan dişi ve erkek sığır oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı ile tespit edilen seroprevalans oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı. A: Örneklemeye Oranları, B: Seroprevalans Oranları.

Çizelge 3.6. Dişi ve erkek sığır örneklerinde, seroprevalans oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı. Ki-Kare testi ($P<0,001$) ile anlamlı farklılıklar tespit edildi.

Yaş Grupları		Dişi Sığır			Erkek Sığır		
		Örnekleme	Yaş Grubu Seropozitiflik	Sığır Seropozitiflik	Örnekleme	Yaş Grubu Seropozitiflik	Sığır Seropozitiflik
0-12 Ay	Sayı	11	1/11	1/939	31	2/31	2/939
	Oran(%)	1,17	9,09	0,1	3,30	6,45	0,2
13-24 Ay	Sayı	38	9/38	9/939	186	24/186	24/939
	Oran(%)	4,05	23,68	0,96	19,81	12,90	2,56
25-36 Ay	Sayı	215	99/215	99/939	152	29/152	29/939
	Oran(%)	22,89	46,04	10,55	16,19	19,08	3,09
37 Ay ve Üzeri	Sayı	283	166/283	166/939	23	10/23	10/939
	Oran(%)	30,14	58,65	17,68	2,45	43,48	1,07

3.2.Virus Varlığının Belirlenmesi ve Viral Yük Tespiti

Toplanan plazma örneklerinde virus varlığı araştırılmadan önce, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan alınan plazmidin seri sulandırmaları yapılarak yine aynı yerden alınan düşük viral yüke sahip olduğu bilinen pozitif örnek ile birlikte qRT-PCR denemesi yapıldı. KKKAV S segmentinin tamamını taşıyan ve $1,8 \times 10^9$ kopya/mL yoğunluğundaki plazmidin Log10 tabanında seri sulandırmaları yapıldı. Seri sulandırmalar sonucunda $1,8 \times 10^1$ ile $1,8 \times 10^6$ kopya/mL arasında yoğunluğa sahip altı farklı plazmid sulandırması elde edildi ve testlerde kullanıldı. Seri sulandırmaları yapılan plazmidler ve zayıf pozitif kontrol örnekle yapılan qRT-PCR görüntüleri Şekil 3.3.'de gösterildi.



Şekil 3.3. Plazmid seri sulandırılmaları ve düşük viral yüke sahip pozitif örneklerle yapılan qRT-PCR.

Mezbahalarda kesilen hayvanlardan toplanan 1337 plazma örneğinden yapılan RNA ekstraksiyonu sonrasında, qRT-PCR ile dokuz örnekte KKKAV RNA'sı tespit edildi. Virus RNA'sı tespit edilen örneklerden ikisi koyunlardan alınan plazma örneklerinde ve yedisi ise sığırlardan alınan plazma örneklerinde tespit edildi. Keçilerde ise virus RNA'sına rastlanılmadı. Yapılan qRT-PCR ile hastalığın toplam prevalans oranı %0,67 bulunurken, sığırlarda bu oran %0,74 ve koyunlarda ise %0,52 olarak tespit edildi. Virus RNA'sı tespit edilen örneklerin aylara göre dağılımı incelendiğinde, iki örneğin 2014 yılı Nisan ayına, yedi örneğin ise 2014 yılı Mayıs ayına ait olduğu görüldü ve diğer aylarda pozitiflik tespit edilmedi. Hastalığın aylara göre prevalans oranı Nisan ayında %1,24 ve Mayıs ayında ise %5,18 olarak bulundu.

Plazma örneklerinin toplandığı üç ilde de virus RNA'sı tespit edildi. Örnekleme yapılan her ilde iki mezbahadan örnek toplanmasına rağmen her ilde sadece bir mezbahadan alınan plazma örneklerinde virus RNA'sına rastlanıldı. Samsun ili Vezirköprü ilçesi Belediye mezbahasında bir örnekte, Tokat ili Zile ilçesi Belediye mezbahasında iki örnekte ve Sivas ili Merkez ilçesi özel Yurtseven mezbahasında ise altı örnekte virus RNA'sı tespit edildi. Ayrıca pozitif tespit edilen sekiz örnek dişi hayvanlardan alınırken, sadece bir örnek erkek hayvandan alındı. Virus RNA'sı tespit edilen örneklerin alındığı hayvanların yaşlarına bakıldığında, iki plazma örneğinin 12 aylık yaştan küçük koyunlardan ve yedi plazma örneğinin ise 25 ay ve üzeri yaştaki sığırlardan alındığı görüldü. Virus RNA'sı tespit edilen örneklerin il, ilçe, mezbaha, örnekleme zamanı ve hayvan türüne göre dağılımı Çizelge 3.7.'de gösterildi.

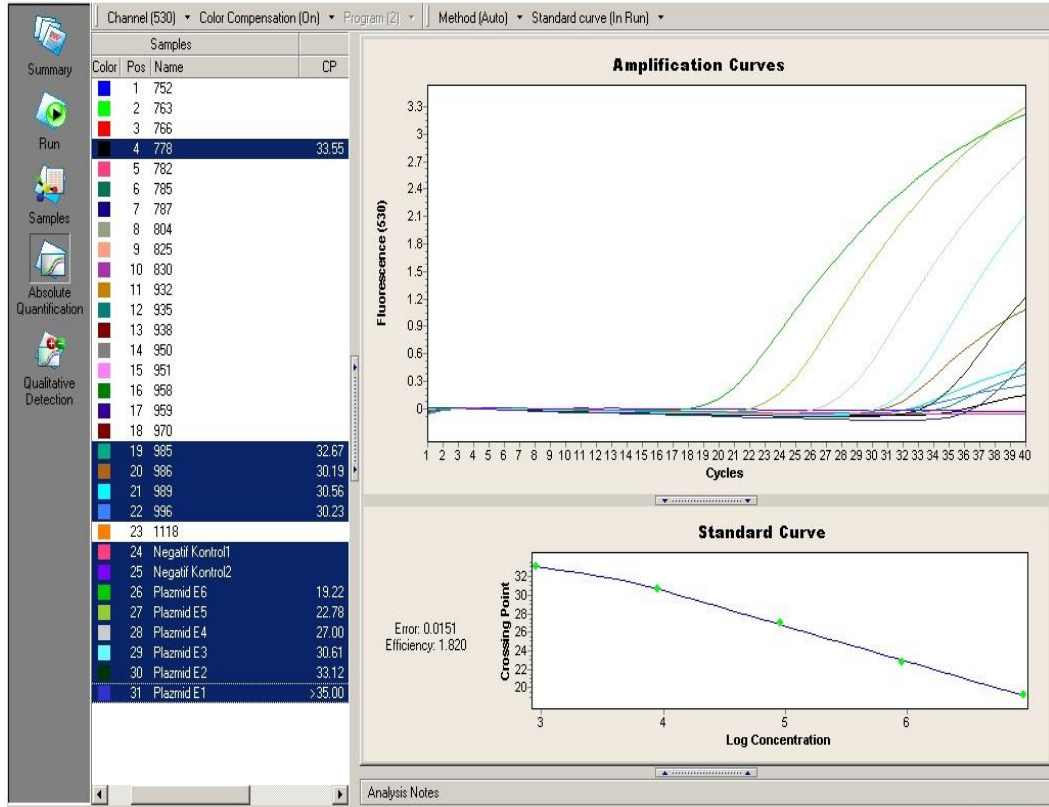
Çizelge 3.7. qrt RT-PCR ile virus RNA'sı tespit edilen örneklerin hayvan türleri, aylara ve mezbahalara göre dağılımı. Hayvan sayısı, aynı ay içinde ilgili mezbahadan yapılan örnek sayı olup prevalans oranı bu sayıya göre hesaplanmıştır.

İl	İlçe	Mezbaha	Hayvan Türü	Ay-Yıl	Hayvan Sayısı	Prevalans Oranı (%)
Samsun	Vezirköprü	Belediye	Sığır	Nisan 2014	1/15	6,67
Tokat	Zile	Belediye	Koyun	Nisan 2014	1/23	4,35
			Koyun	Mayıs 2014	1/20	5
Sivas	Merkez	Yurtseven	Sığır	Mayıs 2014	6/36	16,67

Virus RNA'sı tespit edilen örneklerin viral yükleri, plazmidin seri sulandırılmalarıyla aynı reaksiyonda yapılan qRT-PCR testinde Light Cycler 2.0 cihazı ile $4,10 \times 10^1$ - $2,40 \times 10^3$ kopya/mL arasında hesaplandı. Mayıs ayı içerisinde toplanan örneklerin viral yüklerinin, Nisan ayında toplanan örneklerin viral yüklerine oranla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ayrıca viral yükleri tespit edilen yedi örnek seronegatif olarak tespit edilirken, iki örnek seropozitif olarak tespit edildi. Kantitatif real time RT-PCR ile viral yükleri tespit edilen örneklere ait bilgiler Çizelge 3.8.'de gösterildi. Bunun yanı sıra, bazı örnekler ile plazmid sulandırılmalarının aynı reaksiyonda yapılan qrt-PCR görüntüleri Şekil 3.4.'de gösterildi.

Çizelge 3.8. qrt RT-PCR ile viral yükleri tespit edilen örneklere ait bilgiler.

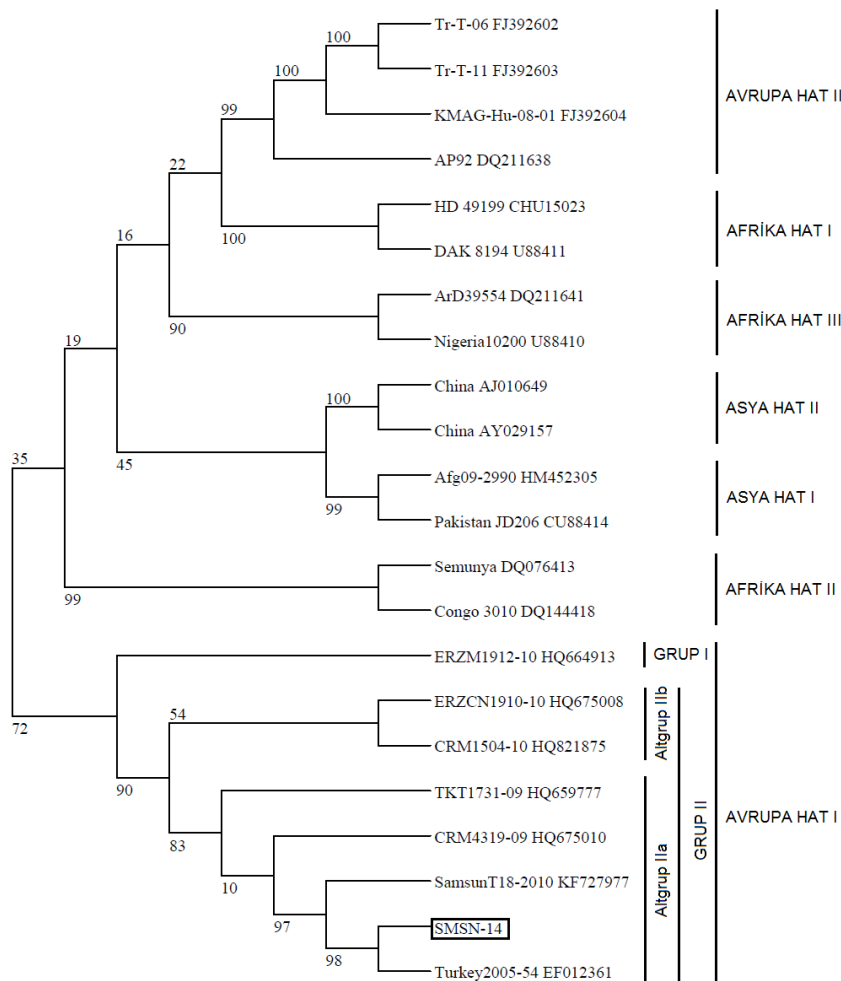
Hayvan Türü	Hayvanın Cinsiyeti- Yaşı (Ay)	Örnekleme Zamanı	İl-İlçe-Mezbaha	Viral Yük Miktarı (Kopya/mL)	Ct Değeri	ELISA Sonucu
Sığır	Dişi 67 Ay	Nisan-2014	Samsun-V.Köprü Belediye	$1,01 \times 10^2$	33,55	Negatif
Koyun	Dişi <12 Ay	Nisan-2014	Tokat-Zile Belediye	$4,10 \times 10^1$	>35	Negatif
Koyun	Erkek <12 Ay	Mayıs-2014	Tokat-Zile Belediye	$2,00 \times 10^3$	30,36	Negatif
Sığır	Dişi 25 Ay	Mayıs-2014	Sivas-Merkez Yurtseven	$3,08 \times 10^2$	32,67	Negatif
Sığır	Dişi 25 Ay	Mayıs-2014	Sivas-Merkez Yurtseven	$2,40 \times 10^3$	30,19	Negatif
Sığır	Dişi 25 Ay	Mayıs-2014	Sivas-Merkez Yurtseven	$4,10 \times 10^1$	>35	Negatif
Sığır	Dişi 61 Ay	Mayıs-2014	Sivas-Merkez Yurtseven	$1,91 \times 10^3$	30,56	Pozitif
Sığır	Dişi 25 Ay	Mayıs-2014	Sivas-Merkez Yurtseven	$2,34 \times 10^3$	30,23	Pozitif
Sığır	Dişi 46 Ay	Mayıs-2014	Sivas-Merkez Yurtseven	$1,75 \times 10^3$	30,53	Negatif



Şekil 3.4. Bazı örnekler ile plazmid sulandırılmalarının qrt RT-PCR görüntüleri.

3.3.Pozitif Örneklerin Tek Aşamalı RT-PCR ile Test Edilmesi ve Dizi Analizi

Viral yükleri tespit edilen dokuz örneğin tek aşamalı RT-PCR ile test edilmesi sonucunda, dört adet örnek pozitif bulundu. Pozitif sonuç veren bu dört adet örneğin dizi analizleri, hizmet satın alma yöntemi ile ticari firmaya (Refgen, Ankara) yaptırıldı. Dizi analizleri yaptırılan örneklerden bir adedinin dizi analizi iyi bir şekilde okundu. Örneğe (SMSN-14) ait genom diziliminin, KKKAV S segmentine göre tüm hatları kapsayacak şekilde seçilen virus izolatlarıyla birlikte Biological Neighbor Joining metodu (BioNJ) ile 1000 tekrarlı olarak filogenetik analizi yapıldığında, Avrupa Hat I içerisinde yer aldığı tespit edildi. KKKAV S segmentine göre yapılan filogenetik ağaç Şekil 3.5.'de gösterildi.



Şekil 3.5. KKKAV S Segmentine göre filogenetik ağaç. Filogenetik analiz BioNJ metodu kullanılarak 1 000 tekrarlı olarak yapıldı. Bu tez çalışmasında elde edilen örneğe genom dizilimi “SMSN-14” olarak isimlendirildi..

4.TARTIŞMA

Zoonoz karakterli bir hastalık olan KKKAV enfeksiyonlarında klinik hastalık tablosu insanlarda şekillenirken, evcil ve yabani memeli hayvanlarda klinik belirti görülmeden sadece iki haftaya kadar uzayabilen viremi şekillenmektedir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Leblebicioglu ve ark., 2015). İnsanlarda meydana gelen enfeksiyonlarda görülen klinik belirtiler yaygın ekimoz alanları, iç organlarda kanamalar, karaciğer yetmezliği ile karakterize olup mortalite oranı %2-30 arasında tespit edilmektedir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Ergunay ve ark., 2014; Weidmann ve ark., 2016). Günümüze kadar KKKAV enfeksiyonları, dünya genelinde 30'dan fazla ülkede bildirilmiş olup insan sağlığı açısından en yaygın ve en önemli kene kaynaklı hastalıklardan bir tanesi olarak bilinmektedir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Mertens ve ark., 2013).

Hastalığın en önemli bulaşma kaynağı olarak KKKAV ile enfekte keneler gösterilmektedir (Weidmann ve ark., 2016). Etken doğada, kene-omurgalı-kene döngüsü ile sirküle olmakta ve hastalığın asıl vektörü olarak *Hyalomma* türü keneler kabul edilmektedir (Mertens ve ark., 2013). Hastalığın bulaşması, enfekte insanların ve viremik hayvanların kan ve diğer vücut sıvıları ile temasla da meydana gelebilmektedir (Weidmann ve ark., 2016). Ayrıca, hasta insanların tedavileri sırasında nosokomial bulaşma da görülmektedir (Mertens ve ark., 2013). Söz konusu bulaşma yollarının önceliği ülkelere göre farklılıklar arz etmektedir. Hastalığın endemik olarak görüldüğü Türkiye'de meydana gelen insan vakalarında asıl bulaşma yolu olarak kene ile ısırılma gösterilmekte ve vakaların %68,9'unda kene ile ısırılma hikayesi mevcut iken İran ve Afganistan'da meydana gelen insan vakalarında enfekte hayvan veya onların kan, doku ve diğer vücut sıvılarıyla temasın daha muhtemel bulaşma yolu olduğu bildirilmektedir (Mertens ve ark., 2013; Mustafa ve ark., 2011).

KKKAV'ye karşı onaylanmış bir aşının bulunmaması ve uygulanan tedavinin sadece semptomlara yönelik olması, hastalıkla ilgili koruyucu önlemleri daha değerli kılmaktadır. Bu nedenle hastalığın endemik olarak görüldüğü alanların veya risk alanlarının belirlenmesi, halk sağlığı önlemlerinin güvenilir şekilde uygulanması için önemlidir (OIE, 2014). Bir bölgenin hayvan popülasyonunda KKKAV spesifik antikörlerin durumu, o bölgede hastalığın varlığı veya yokluğu açısından iyi bir indikatör olarak kabul edilmektedir (OIE, 2014; Schuster ve ark., 2016). Evcil ve yabani hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalar, hastalığın endemik olarak görüldüğü ülkelerde düşük veya yüksek riskli bölgelerin belirlenmesi açısından da önem taşımaktadır (Mertens ve ark., 2013). Örneğin, hastalığın endemik olarak görüldüğü Türkiye'de fazla sayıda insan vakasının görüldüğü Tokat ilinde sığır, koyun ve keçiler de yapılan seroepidemiolojik bir çalışmada seroprevalans oranı %66,08 olarak tespit edilirken, çok daha az insan vakasının görüldüğü Bursa, Balıkesir ve Bilecik illerinde yapılan bir çalışmada ise aynı hayvan türlerinde seroprevalans oranı %33,10 tespit edilmiştir (Özüpak, 2017; Tuncer ve ark., 2014). Hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmaların yanı sıra insanlarda yapılan çalışmalar da riskli bölgelerin tespiti için önemlidir. Türkiye'nin Avrupa Kıta'sında bulunan Trakya Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada insanlarda seroprevalans oranı %5,26 olarak tespit edilmiştir. Ancak söz konusu çalışmanın yapıldığı zamana kadar aynı bölgede insanlarda KKKAV olguları görülmemiştir (Mertens ve ark., 2013; Midilli ve ark., 2009). Bu bölgede ilerleyen yıllarda, insan vakalarının görülmeye başlaması seroepidemiolojik çalışmaların risk alanlarının belirlenmesinde önemini gösteren iyi bir örnektir (TCSB, 2017).

Hastalığın endemik olarak görülmediği ülkelerin hayvan popülasyonunda yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda, virusun sirkülasyonu veya risk durumlarının ortaya konulması açısından önemli bilgiler vermektedir (Mertens ve ark., 2013). Birçok Avrupa ülkesinde bildirilmiş insan vakasının olmamasına rağmen, hastalığın kompetant vektörü olarak kabul edilen *Hyalomma marginatum* türü kenelerin bu ülkelerde mevcut olduğu bilinmektedir (Dreshaj ve ark., 2016). İklim değişiklikleri, insan davranışları, hayvan hareketleri ve kuş göçleri gibi

faktörlere bağılı olarak bu ölkelerde bulunan hayvan ve/veya vektör kene popölasyonlarına virusun bulaşma ihtimali bulunmaktadır. Bu durum, bahsedilen ölkelerde virusun doğada sirköle olması veya insan vakalarının görölmesi ağısıdan risk oluşturmaktadır (Mertens ve ark., 2013). Gönümüze kadar raporlanmış insan vakası olmayan Almanya, İtalya ve Yeni Zelanda gibi ölkelere evcil hayvanlarda antikor varlığına ilişkin kanıta rastlanmamıştır (Spengler ve ark., 2016a). Ancak, Makedonya’da son KKKAV salgının 1970 yılında görölmesine rağmen 2009-2011 yılları arasında toplanan sığır serum örneklerinde seroprevalans oranı %14,6 olarak tespit edilmiştir. Bu durum ölkede virusun varlığı ve sirköle olduğunun kanıtı olarak kabul edilmektedir (Dreshaj ve ark., 2016; Mertens ve ark., 2015).

Gönümüze kadar, VNT, HI, AGID, KFT, IFA ve çeşitli ELISA testleri gibi analiz yöntemleri, insan ve hayvanlarda meydana gelen KKKAV spesifik antikor cevabın tespiti için kullanılmıştır. Ancak ELISA testlerinin diğer yöntemlere kıyasla daha spesifik, daha hızlı, daha sensitif ve daha kolay tekrarlanabilir olmasından dolayı serolojik olarak KKKAV araştırmalarında daha çok tercih edildiği kabul edilmektedir (Spengler ve ark., 2016a). Bunun yanı sıra, ticari olarak temin edilebilen ELISA kitlerinin tamamı insan antikorlarının tespiti için üretilmiş olup, bu ELISA kitlerinin hayvanlar için uygulanabilir hale getirilmesi mümkündür. Ayrıca hayvanlarda meydana gelen antikor cevabın araştırılması için in-house ELISA kitleri de kullanılabilmektedir (Mertens ve ark., 2013; OIE, 2014). Schuster ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, koyun ve keçilerde oluşan KKKAV spesifik IgG antikorlarını tespit edebilmek amacıyla ticari ELISA, IFA ve in-house ELISA kitleri kullanılmış ve bu kitlerin duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından insan antikorlarını tanıyan ticari ELISA kiti koyun ve keçilere uygun hale getirildikten sonra yapılan testlerde ticari IFA ve in-house ELISA kitlerine göre daha spesifik ve sentisitif olduğu tespit edilmiştir (Schuster ve ark., 2016). Bu bilgiler ışığında, yapılan bu tez çalışmasında ticari ELISA kiti, Schuster ve ark. (2016) tarafından tavsiye edilen değişiklikler yapılarak kullanılmıştır.

Hayvan türlerinde KKKAV spesifik antikor varlığının tespiti amacıyla kullanılacak ticari kitlerin bulunmaması, günümüze kadar hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmaların sınırlı sayıda kalmasına neden olmuştur (Mertens ve ark., 2013). Evcil hayvanlarda KKKAV spesifik antikor varlığının araştırılması amacıyla, günümüze kadar 34 farklı ülkede seroepidemiolojik çalışma yapılmıştır. Bu araştırmaların büyük bir kısmı sığır (75'ten fazla), koyun (49'dan fazla) ve keçiler de (33'den fazla) yapılmıştır. Bahsedilen hayvan türleri haricinde manda, deve, köpek, eşek, at ve deve kuşu gibi evcil hayvanlarda da yapılan seroepidemiolojik çalışmalar bulunmaktadır (Albayrak ve ark., 2012; Kırbaş ve ark., 2010; Spengler ve ark., 2016a). Sığırlarda yapılan çalışmalarda en yüksek seroprevalans oranları Afganistan'da %79,1 ve Türkiye'de %79 olarak tespit edilmiştir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Spengler ve ark., 2016a). Benzer şekilde koyunlarda tespit edilen en yüksek seroprevalans oranı %85,71 ve keçilerde ise %82,8 olarak yine Türkiye'de tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Özüpak, 2017). Hastalığın endemik olarak görüldüğü Türkiye'de yapılan bu seroepidemiolojik çalışmalar, insan vakalarının daha sıklıkla görüldüğü bölgelerde yetiştirilen hayvanlar üzerinde yapıldığı bilinmektedir (Albayrak ve ark., 2012; Ergonul ve Whitehouse, 2007; Özüpak, 2017).

Evcil hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda tespit edilen seroprevalans oranları, çalışmanın yapıldığı coğrafik alanın hastalık yönünden durumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Buna bağlı olarak, 2016 yılına kadar dünya genelinde yapılan çalışmalarda, sığırlarda tespit edilen ortalama seroprevalans oranı %19,33, koyunlarda %23,85 ve keçiler de ise %28,07 olarak bulunmuştur. Hastalığın endemik olarak görülmediği ülkelere yapılan çalışmalarda ya seropozitiflik tespit edilememiş ya da diğer ülkelere kıyasla düşük seviyelerde seroprevalans oranları saptanmıştır. Bildirilmiş insan vakasının olmadığı çoğu Avrupa ülkesinde yapılan çalışmalarda, hayvanlarda seropozitiflik tespit edilmemesine rağmen İrlanda ve Macaristan'da sığırlarda seroprevalans oranları sırasıyla, %1,9 ve %0,9 olarak bulunmuştur (Spengler ve ark., 2016a). En son KKKAV salgının 1970 yılında görüldüğü Makedonya bu noktada farklılık

göstermektedir (Dreshaj ve ark., 2016). Schuster ve ark. (2016) tarafından Arnavutluk ve Makedonya’da yapılan çalışmada, 2011-2013 yılları arasında sığır, koyun ve keçilerden toplanan serum örnekleri KKKAV spesifik antikor varlığı yönünden araştırılmıştır. Arnavutluk’ta 2001-2008 yılları arasında bildirilmiş 32 adet insan vakası olmasına rağmen Makedonya’da tüm hayvan türlerinde seroprevalans oranları, Arnavutluk’ta tespit edilen seroprevalans oranlarına göre daha yüksek bulunmuştur (Dreshaj ve ark., 2016; Schuster ve ark., 2016). Özellikle koyun ve keçilerde tespit edilen seroprevalans oranlarının çok yüksek olması nedeniyle, araştırmacılar tarafından daha ayrıntılı çalışmaların yapılması ve insanlar açısından risk durumunun ortaya konulması gerektiği vurgulanmıştır (Schuster ve ark., 2016).

KKKAV enfeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü İran’da yapılan çalışmalara bakıldığında zaman seroprevalans oranları sığırlarda %25, koyunlarda %77,52 ve keçilerde ise %69 olarak tespit edilmiştir (Bokaie ve ark., 2008; Mostafavi ve ark., 2013). Ancak yine İran’da yapılan bir çalışmada seroprevalans oranı koyunlarda %3,7 gibi çok düşük oranda bulunmuştur. Araştırmacılar tarafından koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranları arasındaki bu farkın, örnekleme yapılan bölgelerde görülen insan vaka sayıları ile benzerlik gösterdiği söylenmektedir. Şöyle ki, seroprevalans oranı %3,7 olarak tespit edilen bölgede şimdiye kadar insan vakası raporlanmamışken, araştırmaların yapıldığı diğer bölgelerde hastalığın insanlarda endemik olarak görüldüğü belirtilmiştir (Mostafavi ve ark., 2012). Bu durum evcil hayvanlarda tespit edilen seroprevalans oranının, insanlarda görülmesi muhtemel enfeksiyonlar açısından risk durumunun belirlenmesi için ne denli önem arz ettiğini göstermektedir.

Türkiye’de hayvanlarda KKKAV spesifik antikorların varlığını tespiti için yapılmış sadece 5 adet çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda seroprevalans oranları sığırlarda %13-79, koyunlarda %31,8-85,71 ve keçilerde ise %66-82,8 arasında tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Ergonul ve Whitehouse, 2007; Özupak, 2017; Tuncer ve ark., 2014). Yapılan bu tez çalışmasında ise

seroprevalans oranları sığırlarda %36,21, koyunlarda %6,27 ve keçilerde %6,67 olarak tespit edilmiştir. Tez çalışması ile koyun ve keçilerde tespit edilen seroprevalans oranlarının diğer çalışmalara kıyasla önemli derece düşük olduğu görüldü. Ancak yapılan bu tez çalışmasında istenilen düzeyde keçi örneği toplanamadığı için keçilerde tespit edilen seroprevalans oranlarındaki farklılıkların irdelenmesinin hatalı yorumlara neden olabileceği düşünülmektedir. Koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranlarındaki farklılığın ise örnekleme yapılan hayvanların özelliklerin kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda serum örneği toplanan hayvanların bir veya üzeri yaştaki koyunlardan seçildiği, örneklerin vektör kenelerin aktif olduğu bahar ve yaz aylarında alındığı, Tuncer ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışma dışında örneklerin hastalığın endemik olduğu bölgelerde halk elinde yetiştirilen koyunlardan toplandığı ve örnekleme sırasında koyunlarda kene enfestasyonunun mevcut olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Kırbaş ve ark, 2010; Özupak, 2017; Tuncer ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında ise örnekleme sadece kene aktivasyonun olduğu zamanlarda değil tüm yıl süresince yapıldı. Ayrıca, örnekleme mezbahalarda kesimi yapılan hayvanlarda yapılarak, örnekleme sırasında yapılan kontrollerde koyunlarda kene enfestasyonuna rastlanılmadı. Tez çalışması sırasında toplanan 383 adet koyun örneğinin 331 adedi (%86,42) bir yaştan küçük hayvanlardan temin edildi. Daha önce yapılan çalışmalara kıyasla bu tez çalışmasında koyunlarda seroprevalansın düşük oranda tespit edilmesinin sebebi olarak, örnekleme yapılan hayvanların bahsedilen bu farklılıkları düşünülmektedir.

Özellikle örnekleme yapılan hayvanların yaşları arasındaki bu farklılıkların tespit edilen seroprevalans oranları üzerine önemli etkisi olduğunu düşünülmektedir. Şöyle ki, daha büyük yaştaki koyunların hayatlarının herhangi bir döneminde KKKAV ile enfekte keneye karşılama ihtimali bir yaş ve altındaki koyunlara kıyasla çok daha yüksek olduğu kabul edilmektedir. Diğer taraftan besi amaçlı yetiştirilen koyunların daha hızlı bir şekilde kilo almalarını sağlamak amacıyla düzenli olarak iç ve dış parazitlere karşı ilaç kullanıldığı bilinmektedir. Bahsedilen bu sebepler, seroprevalans oranlarındaki farklılığın nedenleri olarak değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında sığırlarda tespit edilen %36,21'lik seroprevalans oranının, Ergonul ve Whitehouse (2007) tarafından bildirilen seroprevalans oranından (%79) düşük, Kırbaş ve ark. (2010) ile Tuncer ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmalarda tespit edilen seroprevalans oranlarından yüksek (sırasıyla %17 ve %13), Özupak (2017) tarafından yapılan çalışmada tespit edilen seroprevalans oranına (%38,5) benzer olduğu görüldü. Ergonul ve Whitehouse (2007) tarafından bildirilen çalışmada örnekleme yapılan hayvanlardaki kene enfestasyon durumu açıklanmamış olmasına rağmen, çalışmanın yapıldığı zaman ve şartlar düşünüldüğünde araştırmanın kene enfestasyonu bulunan sığırlardan ve hatta hastalığın endemik olduğu alanlarda yapıldığı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında sığırlarda yapılan örnekleme sırasında hayvanlarda kene enfestasyonuna rastlanılmadı. Bahsedilen iki çalışmada tespit edilen seroprevalans oranlarındaki farklılığının nedeni olarak sığırların kene enfestasyon durumlarından kaynaklandığı kabul edilmektedir. Tuncer ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışma hastalığın endemik olarak görülmediği bölgelerde yapılmasından dolayı bu tez çalışmasına kıyasla daha düşük oranda seroprevalans tespit edildiği düşünülmektedir. Ayrıca Kırbaş ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada Samsun, Tokat ve Sivas illerinde seroprevalans oranı %26,66 olarak tespit edilmiş olup, aynı illerde örnekleme yapılan bu tez çalışmasına yakın oranda seroprevalans tespit edildiği görülmektedir. Özupak (2017) tarafından hastalığın endemik olarak görüldüğü Tokat ilinde sığırlarda yapılan çalışma da tespit edilen seroprevalans oranı ile yapılan bu tez çalışmasında tespit edilen seroprevalans oranının birbirine çok yakın olduğu görüldü. Söz konusu iki çalışma hem örnekleminin yapıldığı iller hem de örnekleme yapılan hayvanlarda kene enfestasyonun olmaması ve hayvanların yaşları açısından birbirine benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmasında illere göre sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranları Samsun ilinde %13,17, Tokat ilinde %26,52 ve Sivas ilinde %51,20 olarak tespit edildi. Kırbaş ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada sığırlarda seroprevalans oranları Samsun ilinde %10, Tokat ilinde %40 ve Sivas ilinde %30 olarak tespit

edilmiştir. Özüpak (2017) tarafından yapılan çalışmada ise Tokat ilinde sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranı %38,5 olarak bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında illere göre koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranları Samsun ilinde %7,64, Tokat ilinde %5,80 ve Sivas ilinde %4,49 olarak bulundu. Aynı illerde yapılan çalışmalarda koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranları %41,66-50 arasında tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012; Kırbaş ve ark., 2010). Ayrıca Özüpak (2017) tarafından Tokat ilinde yapılan çalışmada koyunlarda seroprevalans oranı %83,3 olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında koyunlarda seroprevalans oranları her üç ilde de yapılan diğer çalışmalara göre çok daha düşük oranlarda tespit edildi.

Çalışma sırasında örnekleme yapılan mezbahalarda seroprevalans oranları %10,27-51,81 arasında tespit edildi. Özellikle Sivas ilinde faaliyet gösteren özel Yurtseven (%39,26) ve özel Yıldız (%51,81) mezbahaları ile Tokat ili Turhal ilçesinde faaliyet gösteren özel Yeşilirmak (%25,09) mezbahasında tespit edilen seroprevalans oranlarının diğer mezbahalara kıyasla yüksek olduğu görüldü. Mezbahalara göre sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranları ise %7,14-53,19 arasında bulundu. Sivas ilinde faaliyet gösteren mezbahalarda sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranları %49,81-53,19 arasında, Tokat ilinde %26,46-26,79 arasında ve Samsun ilinde %7,14-14,39 arasında tespit edildi.

Mezbahalara göre koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranları %3,80-12 arasında bulundu. Sığırlarda en yüksek seroprevalans oranının tespit edildiği Sivas ilinde faaliyet gösteren özel Yıldız mezbahasında koyunlarda seropozitifliğe rastlanılmadı. Benzer şekilde Sivas ilinde faaliyet gösteren özel Yurtseven mezbahasında koyunlarda seroprevalans oranı %4,82 olarak tespit edildi. Sivas ilinde faaliyet gösteren bu mezbahalarda sığırlarda yüksek seroprevalans oranları tespit edilirken koyunlardaki seroprevalans oranlarının düşük bulunmasının nedeni, kesimi

yapılan hayvan türlerine göre farklı yaş aralıklarında hayvanların kesilmesi olarak düşünülmektedir. Şöyle ki, Sivas ilinde yapılan toplam 459 adet sığır örneklemeinin 452 adedi (%92,59) iki yaş ve üzeri sığırlardan alınırken, koyunlarda yapılan toplam 88 adet örneklemeinin 86 adedinin (%97,73) bir yaş ve altında koyunlardan alındığı görülmektedir. Bu durum da hayvanlarda tespit edilen düşük seroprevalans değerinin bir sebebi olarak değerlendirilmiştir. Hayvanlarda kene enfestasyonunun da tespit edilmemiş olması son yıl içinde hayvanlar arasında virus sirkülasyonunu çok sınırlı kaldığı şeklinde yorumlanmıştır.

Dünya genelinde yapılan seroepidemiolojik çalışmalara bakıldığında genel olarak sığırlarda tespit edilen seroprevalans, koyunlarda tespit edilen seroprevalansa göre daha düşük oranda bulunmaktadır (Spengler ve ark., 2016a). Bu durum Türkiye’de yapılan çalışmalarda daha belirgin şekilde karşımıza çıkmaktadır (Özüpak, 2017; Tuncer ve ark., 2014). Sığır ve koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranlarındaki farklılığın nedeni olarak, hayvanların tür özelliklerinden kaynaklı farklılıklar, yetiştiriciler tarafından uygulanan farklı bakım koşulları ve hayvanların otlama sırasında gösterdikleri davranış farklılıkları olarak düşünülmektedir. Yapılan tez çalışmasının sonuçları incelendiğinde ise diğer çalışmaların aksine koyunlarda tespit edilen seroprevalans, sığırlarda tespit edilen seroprevalansa göre daha düşük oranda bulundu. Bu farklılığın, tez çalışması sırasında yapılan örneklemelerin hayvan türlerine farklı yaşlarda dağılım göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Evcil hayvanlarda tespit edilen seroprevalans oranları, örneklemeinin yapıldığı ülke, bölge ve mevsim gibi biyolojik olmayan risk faktörlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Genellikle yaz aylarında evcil hayvanlarda seroprevalans oranları artarken kış ve ilkbahar aylarında azalma görülmektedir. Rusya’da yapılan bir çalışmada ise KKKAV spesifik antikorların tespiti için en uygun zamanın Eylül ayı olduğu bildirilmiştir (Spengler ve ark., 2016a). Bu tez çalışmasında aylara göre seroprevalans oranları %14,81-47,62 arasında tespit edildi. Koyunlarda yapılan

örneklemenin aylara göre dağılımı düzenli olmadığı ve keçilerde yeterli örnek toplanılamadığından dolayı bu hayvan türlerinde istatistiksel analiz yapılamadı. Sığırlar örneklerinde yapılan Ki-Kare testi ($p<0,001$) ile tespit edilen seroprevalans oranlarının aylara göre anlamlı farklılıklar gösterdiği görüldü. Sığırlarda, aylara göre en yüksek seroprevalans oranı %63,93 olarak Kasım ayında saptandı. Mevsimlere göre sığırlarda seroprevalans oranları %35,54-38,05 arasında tespit edilerek, yapılan tez çalışmasında mevsimsel olarak seroprevalans oranlarında bir farklılığın olmadığı görüldü. Yapılan incelemelerde, sığırlarda Kasım ayında tespit edilen yüksek seroprevalans oranının örnekleme yapılan hayvanların yaş dağılımından kaynaklandığı anlaşıldı. Şöyle ki, sığırlarda seroprevalans oranının en yüksek tespit edildiği Kasım ayı içerisinde yapılan 61 adet sığır örnekleme oranının 55 adedi (%90,16) iki yaş ve üzeri hayvanlardan alındığı belirlendi.

Araştırmacılar tarafından cinsiyetin biyolojik olmayan risk faktörü olabileceği ve buna bağlı olarak tespit edilen seroprevalans oranlarında farklılıklar görülebileceği düşünülerek yapılan bazı çalışmalarda cinsiyetin etkisi araştırılmıştır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda cinsiyete bağlı seroprevalans oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Adam ve ark., 2013; Spengler ve ark., 2016a; Wilson ve ark., 1990). Yapılan bu tez çalışmasında da tespit edilen seroprevalans oranlarının cinsiyete göre dağılımları incelendi. Ki-Kare testi ($p=0,126$) ile yapılan istatistiksel analiz ile koyunlarda bulunan seroprevalans oranlarının cinsiyete bağlı olarak anlamlı farklılık göstermediği tespit edildi. Ancak sığırlarda yapılan Ki-Kare testinde ($p<0,001$) cinsiyete bağlı olarak seroprevalans oranlarının anlamlı şekilde farklılık gösterdiği saptandı. Dişi sığırlarda seroprevalans oranı %50,27 ve erkek sığırlarda ise %16,58 olarak bulundu. Sığırlarda toplam 939 adet örnekleme yapılarak 340 adet seropozitif hayvan tespit edilirken, 547 adet dişi sığır örnekleme oranının 275 adedinde seropozitiflik tespit edildi.

Yapılan bu tez çalışmasında, önceki çalışmaların aksine cinsiyete bağlı olarak sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranlarında farklılıkların olduğu görüldü. Ancak

daha ayrıntılı yapılan incelemelerde, örnekleme yapılan dişi ve erkek sığırların yaş dağılımlarında da farklılıklar olduğu tespit edildi. Örnekleme yapılan toplam 547 adet dişi sığırın 498 adedinin (%91,04) iki yaş ve üzerinde olduğu ve erkek sığırlarda yapılan toplam 392 adet örnekleminin ise 338 adedinin (%86,22) bir ile üç yaş arasında olduğu görüldü. Ayrıca hem dişi hem de erkek sığırlarda yaşın artmasına bağlı olarak seroprevalans oranlarının da yükseldiği tespit edildi. Bu bilgiler göz önüne alındığında dişi ve erkek sığırların seroprevalans oranlarındaki farklılığın sadece cinsiyete bağlı olarak değişkenlik göstermediği, aynı zamanda yaş faktöründe bu seroprevalans oranları üzerine etkisinin olduğu düşünülmektedir. Bu nokta da tesis olan antikor yanıtının ne kadar süreyle tespit edilebilir seviyede kaldığı ile ilgili somut bulgular olmasa da özellikle çalışma kapsamında kullanılan sığır popülasyonunun yaşı ve seroprevalans değerleri dikkate alındığında, bu çalışmada tespit edilen serokonversiyonun geçmiş yıllara ait olabileceği öngörüsünü kuvvetlendirmektedir.

Evcil hayvanlarda yapılan çalışmalarda, seroprevalans oranlarının yaşa bağlı olarak anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda yaşın artmasına bağlı olarak tespit edilen seroprevalans oranlarının yükseldiği görülmektedir. Sığır, koyun ve keçilerde yaşın biyolojik olmayan risk faktörü olarak önemli olduğu vurgulanmaktadır (Adam ve ark., 2013; Bokaie ve ark., 2008; Mostafavi ve ark., 2012; Spengler ve ark., 2016a; Wilson ve ark., 1990).

Bu tez çalışmasında, örnekleme yapılan hayvanlar yaşlarına göre dört farklı gruba ayrıldı. Sığır ve koyun örneklerinin tür ayrımı yapılmadan yaş gruplarına göre seroprevalans oranları incelendiğinde Ki-Kare testi ($p < 0,001$) ile anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Sığır ve koyunlarda tespit edilen seroprevalans oranları, 0-12 aylık yaştaki hayvanlarda %5,63, 13-24 aylık yaştaki hayvanlarda %14,34, 25-36 aylık yaştaki hayvanlarda %33,51 ile 37 ay ve üzeri yaştaki hayvanlarda ise %57,19 olarak bulundu.

Koyunlarda seroprevalans oranlarının yaş grupları içerisinde yaşın artmasına bağlı olarak yükseldiği tespit edildi. Yaş gruplarına göre koyunlarda en yüksek seroprevalans %42,86 ile 37 ay ve üzeri yaştaki hayvanlarda bulundu. Ancak koyunlarda yapılan örneklerin yaş gruplarına göre düzenli dağılmadığı ve 0-12 ay yaştaki koyunlarda toplam örnekleminin %86,42'sini oluşturduğu görüldü. Buna bağlı olarak hem tespit edilen seropozitiflik hem de seroprevalans oranları açısından örnekleme yapılan tüm koyunlar göz önüne alındığında 0-12 aylık yaştaki hayvanlar ön plana çıkmaktadır. Tüm koyun örneklerinde tespit edilen 24 adet seropozitifliğin 18 adedi bu yaş grubundaki hayvanlarda tespit edilirken yapılan toplam 383 adet koyun örneklemesine göre seroprevalans %4,71 olarak yine bu yaş grubunda tespit edildi. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın yapılan örnekleminin yaş gruplarına düzenli dağılım göstermediğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her yaş grubunun kendi içerisinde tespit edilen seroprevalans oranları yaşın artmasına bağlı olarak yükselmekte ve bu sonuçlar yapılan önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Koyun örneklerinde yapılan Ki-Kare testinde, örnek dağılımının düzenli olmaması ve tespit edilen seropozitif hayvan sayılarının az olmasından dolayı istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

Bu tez çalışmasında, sığır örneklerinde yapılan Ki-Kare testi ($p<0,001$) ile yaşın seroprevalans oranı üzerine anlamlı etkisinin olduğu tespit edildi. Hem yaş gruplarının kendi içerisinde seroprevalans oranları hem de tüm sığır örneklerinde yaşlara göre seroprevalans oranlarının, yaşın artmasına bağlı olarak yükseldiği görüldü. Yaş gruplarına göre tespit edilen en yüksek seropozitiflik (176/306) ve seroprevalans oranı (%57,52) 37 ay ve üzeri yaştaki sığırlarda saptanıldı. Sığırlarda tespit edilen seropozitiflik ve seroprevalans oranlarının yaşın artmasına bağlı olarak her yaş grubunda artış gösterdiği görüldü. Ayrıca, bu sonuçlara benzer şekilde mezbahalarda kesimi yapılan sığır sayılarının da yaşa bağlı olarak arttığı gözlemlendi.

Tez çalışmasından elde edilen seroprevalans oranları, örnekleme yapılan mezbahalarda kesimi yapılan hayvan türlerinde virusun farklı oranlarda sirküle

olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, meydana gelen insan vakaları açısından önemli bir risk grubu olan mezbaha çalışanları, kasaplar ve hayvan yetiştiricileri gibi KKKAV ile enfekte hayvanların etleri, kan ve diğer vücut sıvıları ile teması olan insanlarda oluşabilecek enfeksiyon riskine işaret etmektedir. Özellikle hastalığın endemik olarak görüldüğü İran'da mezbaha çalışanları veya kasaplarda meydana gelen birçok vaka bildirimi yapılmıştır (Fazlalipour ve ark., 2016; Jamshidi ve ark., 2017; Raoofi ve ark., 2012). Yine İran'da yapılan bir çalışmada, mezbaha çalışanlarında seroprevalans oranı %14,8 olarak tespit edilmiştir (Chinikar ve ark., 2012). Ayrıca, İran'da 2000-2009 yılları arasında meydana gelen insan vakalarının en önemli kısmı mezbaha çalışanları ve kasaplarda görüldüğü bildirilmektedir (Chinikar ve ark., 2010).

Evcil hayvanlarda tespit edilen seroprevalans oranlarının hayvan kaynaklı bulaşma açısından risk durumlarının ortaya konulması için tek başına yeterli olmadığı düşünülmektedir. Çünkü tespit edilen seropozitiflik tek başına mevcut bir enfeksiyonu değil aynı zamanda geçirilmiş bir enfeksiyona bağlı olarak şekillenen antikor cevabı da gösterebilmektedir. Risk durumunun daha iyi yorumlanabilmesi için viremi dönemindeki hayvanların tespiti ve prevalansı da önemlidir. Bu amaçla yapılan bu tez çalışmasında kesimi yapılan hayvan türlerinde qRT-PCR ile virus varlığı da araştırıldı.

Hayvan türlerinde virus izolasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Spengler ve ark., 2016a). Ülkemizde yapılan bir çalışma ile koyun ve keçilerde virus genomunun varlığı ortaya konulmuştur (Albayrak ve ark., 2012). Yapılan bu tez çalışması ile mezbahalarda kesimi yapılan hayvan türlerinden toplam 1337 adet plazma örneği KKKAV genom varlığı yönünden qRT-PCR ile test edilmiştir. Plazma örneklerinin dokuz adedinde KKKA virüs genomik (g) RNA'sı tespit edildi ve hastalığın prevalansı %0,67 olarak bulundu. Virus gRNA'sı tespit edilen dokuz adet örneğin iki adedi koyunlardan alınan örneklerde ve yedi adedi ise sığırlardan alınan örnekler olduğu gözlemlendi. Keçilerde ise virus gRNA'sına

rastlanılmadı. Hayvan türlerine göre hastalığın prevalansı sığırlarda %0,74 ve koyunlarda %0,52 olarak tespit edildi.

Tez süresince örnekleme yapılan her üç ilde de birer mezbahada virus gRNA'sı saptandı. Samsun ili Veziköprü ilçesi Belediye mezbahasında bir adet sığır örneğinde, Sivas ili Merkez ilçesi özel Yurtseven mezbahasında altı adet sığır örneğinde ve Tokat ili Zile ilçesi Belediye mezbahasında ise iki koyun örneğinde virus gRNA'sı tespit edildi. Aylara göre virus gRNA'sı tespit edilen örneklerin dağılımına bakıldığında, iki adet örneğin Nisan ayına ve yedi adet örneğin ise Mayıs ayına ait olduğu görüldü. Diğer aylarda KKKA virüs gRNA pozitifliği tespit edilemedi.

Yapılan değerlendirmelerde, kan örneklerinde virus gRNA'sı tespit edilen koyunların 12 ay yaştan küçük, yedi adet sığır örneğinin ise 25 ay ve üzeri yaştaki hayvanlardan alındığı görüldü. Ayrıca söz konusu örneklerin KKKAV spesifik antikor varlığı yönünden durumları incelendiğinde, iki adet sığırın seropozitif ve yedi adet örneğin ise seronegatif oldukları tespit edildi.

Hayvanlarda KKKAV enfeksiyonlarının klinik belirti göstermeden iki haftaya kadar uzayabilen bir viremi meydana getirmesi, gRNA'sının tespiti amacıyla yapılan çalışmaların en önemli zorluk noktası olarak kabul edilmektedir (Spengler ve ark., 2016a). Ülkemizde yapılan ve bu tez çalışması ile örnekleme yapılan iller bakımından benzerlik gösteren bir çalışmada koyun ve keçilerde prevalans oranı %8,57 olarak tespit edilmiştir (Albayrak ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında ise önceki çalışmaya göre daha düşük oranda prevalans tespit edildi. Albayrak ve ark. (2012) tarafından yapılan bu çalışmada, örnekleme yapılan hayvanlarda kene enfestasyonu mevcut iken bu tez çalışmasında kene enfestasyonu görülmedi. Bu sebeple, prevalans oranlarındaki farklılığın kene enfestasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca ülkemizde Sağlık Bakanlığı ve Gıda, Tarım ve Hayvancılık

Bakanlığı tarafından özellikle hastalığın endemik olduğu bölgelerde çeşitli eğitim çalışmaları ve hayvanlarda uygunlanmak üzere antiparaziter ilaç dağıtımı yapılmaktadır. Bu tez çalışmasının yapıldığı Samsun ilinde ortalama yıllık olarak 152.280 hayvan dozunda ilaç, Sivas ilinde 509.471 hayvan dozunda ilaç ve Tokat ilinde 154.300 hayvan dozunda ilaç yetiştiricilere dağıtılmaktadır (GTHB, 2016). Bakanlıklar tarafından yürütülen bu faaliyetlerin de prevalans oranlarında tespit edilen düşüklükte etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Mezbahalarda kesimi yapılacak hayvanlara yetiştiriciler tarafından kesimden belli bir süre önce antiparaziter ilaç uygulandığı bilinmektedir. Bu uygulama hayvanlarda kilo artışı üzerine olumsuz etkisi olan iç ve dış parazitlerle mücadele amacıyla yapılmaktadır. Yapılan bu uygulamalara rağmen kene aktivasyonunun fazla olduğu Nisan ve Mayıs aylarında kesilen hayvanlarda virus gRNA'sının tespit edilmesi hayvan kaynaklı bulaşma açısından önemli halk sağlığı riskini işaret etmektedir.

Diğer taraftan, İslam inanisında önemli bir yeri olan Kurban Bayramından sonra da insan vakalarında artışın görülebileceği bildirilmiştir (Leblebicioglu ve ark., 2015). Hicri takvime göre zamanı belirlenen Kurban Bayramı her yıl miladi takvime göre 10 gün önceden kutlanmaktadır. Ülkemiz gibi Müslüman popülasyonunun fazla olduğu ve KKKAV enfeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü ülkeler için bu durumun önemli bir halk sağlığı riski taşıyabileceği düşünülmektedir. Kurban Bayramının önümüzdeki 10-15 yıl içerisinde kene aktivasyonunun yoğun olduğu aylarda kutlanacak olması ve kurban kesme faaliyetlerinin halen daha pek çok ülkede halk tarafından gerçekleştiriliyor olması, hayvan kaynaklı hastalığın görülme riskini arttırabilecektir (Leblebicioglu ve ark., 2015). Yapılan bu tez çalışmasında tespit edilen prevalans oranları ve vRNA'sının tespit edildiği aylar göz önüne alındığında bu durumun daha iyi anlaşılabilceği düşünülmektedir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından, insanlarda meydana gelen KKKAV vakalarında, hastaların serumlarında tespit edilen viral yük miktarlarının hastalığın akibeti hakkında bilgi verebileceği bildirilmektedir. Araştırmacılar tarafından hastaların KKKAV viral yük seviyelerinin 10^8 veya 10^9 kopya/mL eşdeğerinin üstünde bulunduğu durumlarda hastalığın genellikle ölümle sonuçlanabileceği ve altında bulunan durumlarda ise ölümün daha az görüldüğü bildirilmektedir (Bente ve ark., 2013; Çevik ve ark., 2007; Kubar ve ark., 2011). Bu durum göz önüne alındığında insanların, viremi döneminde hayvanlar veya onların kan ile diğer vücut sıvılarıyla teması sonucunda ne kadar virus miktarına maruz kalacağının ortaya konulmasının önemli olduğu düşünülmektedir. Özellikle mezbaha çalışanları ve kasaplar gibi meslek grupları açısından bu durumun daha önemli olduğu görülmektedir. Yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde, viremideki hayvanların tespitine yönelik çalışmalar bulunmasına rağmen hayvanlarda tespit edilen viral yük miktarını bildiren çalışmalara ulaşılamamıştır. Bu amaçla, yapılan bu tez çalışmasında virus gRNA'sı tespit edilen hayvanların kanlarında bulunan viral yük tespit edilmeye çalışıldı. Yapılan qRT-PCR ile virus gRNA'sı tespit edilen hayvanların kanlarında viral yük miktarı $4,10 \times 10^1$ - $2,40 \times 10^3$ kopya/mL arasında tespit edildi.

İnsanlarda görülen KKKAV enfeksiyonlarının en önemli bulaşma kaynağı olarak kabul edilen kenelerde yapılan çalışmalarda, viral yük miktarı $4,8 \times 10^1$ - $6,8 \times 10^7$ kopya/mL arasında tespit edilmiştir (Mertens ve ark., 2013; Özupak, 2017). Yapılan bu tez çalışmasında ise hayvanlarda tespit edilen en yüksek viral yük miktarı $2,40 \times 10^3$ kopya/mL olarak bulundu. Kenelerde ve hayvanlarda tespit edilen viral yük miktarları karşılaştırıldığında, hastalığın enfekte hayvanlar veya onların kanları aracılığıyla bulaşmasındaki risk durumu daha iyi anlaşılabilecektir.

Çeşitli araştırmacılar tarafından KKKAV S segmentine göre yapılan filogenetik analizler sonucunda, coğrafik dağılımları farklı yedi virus hattına ayrılmaktadır (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Mild ve ark., 2010). Ülkemizde görülen KKKAV izolatları, Avrupa hat I ve Avrupa hat II içerisinde yer almaktadır

(Mild ve ark., 2010). Avrupa hat II içerisinde, Yunanistan izolatu olan AP92 ile ülkemiz izolatları olan AP92 benzeri izolatlar olarak adlandırılan viruslar bulunmaktadır. Bu hat içerisinde yer alan virus izolatlarının, genel olarak orta/zayıf şiddetli insan vakalarına neden olduğu bildirilmektedir (Midilli ve ark., 2009). Ülkemiz izolatlarının büyük kısmı ise Avrupa hat I içerisinde yer almaktadır. Bu virus hattı içerisinde iki adet grup tanımlanmıştır. Ayrıca grup II içerisinde, iki adet alt grup bulunmaktadır (Kalaycioglu ve ark., 2012; Ozkaya ve ark., 2010).

Sunulan bu çalışmada, KKKA virüsü gRNA'sı tespit edilen örnekler tek aşamalı RT-PCR ile test edildi. Bu örneklerden dört adedi tek aşamalı RT-PCR ile pozitif bulundu. Ticari olarak yaptırılan dizi analizleri sonucunda örneklerden bir adedinden analiz edilebilir kalitede veri elde edildi. Diğer üç örneğin dizi analizlerinde filogenetik analiz için yeterli uzunlukta sekans elde edilemedi. Dizi analizi yapılan örneğin filogenetik analizinde, Avrupa hat I içerisinde bulunan grup II ve alt grup IIa'da yer aldığı görüldü.

Dünya genelinde tespit edilen KKKA izolatlarının S segmentine ait genom dizilimleri incelendiğinde, Avrupa hat II içerisinde yer alan AP92 izolatının diğer hatlarda bulunan izolatlarla yüksek genetik farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu sebeple, ilk kullanılan RT-PCR yöntemleri ile diğer virus hatlarında bulunan izolatlar tespit edilirken AP92 izolatının tespiti için farklı primerlerin kullanılması gerekliliği düşünülmektedir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar ile S segmentinde yüksek derecede korunaklı bir bölgenin varlığı ortaya konularak, bu bölgeye özgü primerlerin dizayn edilmesi ile yedi virus hattını tespit edebilen RT-PCR yöntemleri geliştirilmiştir (Bente ve ark., 2013; Dreshaj ve ark., 2016, OIE, 2014). Bu tez çalışmasında qRT-PCR yönteminde kullanılan primer ve problemlerin AP92 veya AP92 benzeri izolatları tanıma yetenekleri test edilmemesine rağmen primer ve problemlerin dizilimleri ile Avrupa hat II içerisinde yer alan bu izolatların genom dizilimi karşılaştırıldığında yüksek oranda birbiri ile örtüştüğü görülmektedir. Ancak tek aşamalı RT-PCR yönteminde kullanılan primerlerin dizilimleri ile bu izolatların

genom dizilimleri karşılaştırıldığında fazla sayıda amino asidin farklı olduğu tespit edildi (Albayrak ve ark., 2010; Rodriguez ve ark., 1997). Bu tez çalışması sırasında qRT-PCR ile test edilerek virus gRNA'sı tespit edilen beş adet örneğin, tek aşamalı RT-PCR'da arzu edilen düzeyde pozitif sonuç vermediği saptandı. Bu bilgiler temelinde söz konusu örneklerin, ülkemizde varlığı daha önce tespit edilen AP92 benzeri virus izolatları ile yakın ilişkili olabileceği ve bu yüzden tek aşamalı RT-PCR yöntemi ile arzu edilen düzeyde pozitif sonuç alınamadığı düşünülmektedir.



5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ülkemiz açısından önemli bir halk sağlığı problemi olan KKKAV enfeksiyonlarının, endemik olarak görüldüğü üç ilde (Samsun, Sivas, Tokat) faaliyet gösteren mezbahalarda kesimi yapılan ruminant türlerinde hastalığın varlığı ve yaygınlığının saptanması, virus sirkülasyonunda ve insanlara bulaşmasında bu hayvan türlerinin ne kadar etkin olabileceklerinin araştırılması, hayvan türleri arasında viremi olasılığı ile mevsimsel dağılımının yapılması, olası viremik hayvanlarda kantitatif real time RT-PCR yöntemi kullanılarak viral yükün tespiti ve son konak olan insanların kesim esnasında temas edebilecekleri maksimum viral yük miktarlarının ortaya konulması, daha önceki çalışmalarda potansiyel bulaşma kaynakları için bildirilmiş viral yük miktarları ile bu çalışma sonucunda tanımlanacak viral yükler arasındaki ilişkinin sorgulanması amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan testler sonucunda elde edilen verilere göre;

1. Koyun ve keçilerde bu tez çalışması ile elde edilen seroprevalans oranları, hastalığın endemik olarak görüldüğü illerde daha önce yapılan çalışmalara göre düşük oranlarda tespit edilmiştir. Sığırlarda bu çalışma ile tespit edilen seroprevalans oranları ile önceki yıllarda yapılan çalışmalar benzerlik göstermektedir.
2. Hayvanlarda KKKAV varlığının ve sirkülasyonun önemli göstergelerinden kabul edilen seroprevalans oranları, örnekleme yapılan illere ve hayvan türlerine göre farklı oranlarda tespit edilmiştir. Bu durum örnekleme yapılan illerde ve hayvan türlerinde farklı oranlarda KKKAV'nin varlığını ve sirküle olduğunu ortaya koymaktadır.

3. Sivas ve Tokat illerine göre daha az sayıda insan vakasının görüldüğü Samsun ilinde özellikle sığırlarda tespit edilen seroprevalans daha düşük oranda tespit edilmiştir. Bu durum, birçok araştırmacı tarafından kabul edilen hayvanlarda tespit edilen seroprevalans oranları ile insan vaka sayıları arasındaki ilişkiyi doğrular niteliktedir.
4. Dünya genelinde yapılan birçok çalışmasının aksine yapılan bu tez çalışmasında sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranı koyun ve keçilerde tespit edilen seroprevalans oranından daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun örnekleme yapılan hayvanların yaş dağılımından kaynaklandığı düşünülmektedir.
5. Mezbahalarda kesimi yapılan hayvanlarda yapılan örneklemeler incelendiğinde sığırların genel olarak iki yaş ve üzerinde kesildiği, koyun ve keçilerin ise bir yaş altında kesildiği görülmüştür. Bu nedenle örnekleme yapılan sığırların yaşı ve seroprevalans değerleri dikkate alındığında, bu çalışmada sığırlarda tespit edilen serokonversiyonun geçmiş yıllara ait olabileceği düşünülmektedir.
6. Bu tez çalışmasında, hayvanlarda tespit edilen seroprevalans oranlarının mevsimsel olarak farklılık sergilemediği görülmüştür.
7. Bu tez çalışması ile hastalığın endemik olarak görüldüğü her üç ilde de viremi safhasında hayvanların kesiminin yapıldığı ve bu durumun özellikle mezbaha çalışanları açısından risk oluşturduğu ortaya konulmuştur.
8. Viremi safhasındaki hayvanların Nisan ve Mayıs aylarında tespit edilmesi, kene aktivasyonuna bağlı olarak hayvan kaynaklı bulaşma olasılığı halk sağlığı açısından mevsimsel olarak farklılık sergilediğini göstermektedir.

9. Hayvanlarda tespit edilen prevalans değeri göz önüne alındığında Sağlık Bakanlığı ile Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ortaklaşa yürütülen faaliyetlerin olumlu sonuçlar verdiği ancak hayvan kaynaklı bulaşmanın halk sağlığı açısından halen daha önemli riskler taşıdığı düşünülmektedir.
10. İslam inancında önemli bir yeri olan Kurban Bayramı'nın ilerleyen yıllarda kene aktivasyonunun fazla olduğu aylarda kutlanacak olması nedeniyle hayvan kaynaklı bulaşmanın minimum seviyede olabilmesi ve hayvan hareketlerine bağlı olarak hastalığın farklı coğrafik alanlara yayılmasının önlenmesi için ülkesel bir mücadele stratejisinin geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.
11. Bu tez çalışması sırasında örnekleme yapılan hayvanlarda kene enfestasyonuna restlanılmamış olması, ilgili bakanlıklar tarafından yetiştiricilere dağıtılan antiparaziter ilaçların olumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir. Ayrıca, Kurban Bayramı öncesinde hayvanlara ve özellikle hastalığın endemik olduğu bölgelerden yapılacak hayvan hareketlerinden önce antiparaziter ilaç uygulamasının önemli fayda sağlayacağı düşünülmektedir.
12. Bu tez çalışması ile moleküler yöntemlerle ilk defa hayvanlardaki viral yük miktarları tespit edilmiş olup kesim esnasında mezbaha çalışanlarının maruz kalabileceği maksimum virus miktarı ortaya konulmuştur.
13. Daha önceki çalışmalarda vektör kenelerde tespit edilen viral yük miktarlarına göre hayvanlarda tespit edilen viral yük miktarlarının daha düşük olduğu görülmesine rağmen halk sağlığı açısından hayvan kaynaklı bulaşmanında önem arz ettiği bu çalışma ile gösterilmiştir.

14. Yapılan sekans analizi sonucunda hayvanlarda tespit edilen KKKAV'nin önceki çalışmalarla benzer virus hatlarında yer aldığı görülmüştür. Ayrıca bazı örneklerde, qrt RT-PCR ile vRNA'sı tespit edilmesine rağmen tek aşamalı RT-PCR ile vRNA'sı tespit edilememiş olması ve testler sırasında kullanılan primerlerin sekansları da düşünüldüğünde örnekleme yapılan hayvanlarda AP92 veya AP92 benzeri virus izolatlarında sirküle olduğunu düşündürmektedir.



ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Hastalığının Endemik Olduğu Bazı İllerde (Samsun, Sivas, Tokat) Kesilen Ruminant Türlerinde KKKA Virus Varlığının Virolojik ve Serolojik Olarak Araştırılması

Bu çalışmada, KKKAV enfeksiyonlarının endemik olarak görüldüğü, Samsun, Sivas ve Tokat illerinde kesimi yapılan hayvan türlerinde (sığır, koyun ve keçi) hastalığın varlığı ve yaygınlığı hem serolojik hem de virolojik yöntemler kullanılarak araştırıldı. Bu hayvan türlerinin doğadaki virus sirkülasyonunda ve hastalığın insanlara bulaşmasında ne kadar etkin rol alabilecekleri ortaya konulmaya çalışıldı. Kesimi yapılan hayvan türleri arasında viremi olasılığı ile mevsimsel dağılımın belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca viremik hayvanlarda viral yük miktarlarının moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve son konak olan insanların kesim sırasında maruz kalabilecekleri maksimum viral yük miktarlarının ortaya konulması amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda, Samsun, Sivas ve Tokat illerinde faaliyet gösteren ikişer adet mezbaha seçilerek örnekleme yapıldı. Mezbahalar, 1 Eylül 2013-31 Ağustos 2014 arasında düzenli olarak ziyaret edildi ve kesimi yapılan hayvan türlerinden kan örnekleri alındı. Bu süre zarfında toplam 1337 adet serum ve plazma örneği toplandı. KKKAV antikorlarının tespiti amacıyla serum örnekleri ELISA ile test edildi. Sığırlarda seroprevalans oranı %36,21 (340/939), koyunlarda %6,27 (24/383) ve keçilerde ise %6,67 (1/15) olarak tespit edildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda (Ki-Kare, $p < 0,001$) sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranlarının, örnekleme zamanı, hayvanın yaşı ve cinsiyeti gibi biyolojik olmayan risk faktörlerine bağlı olarak değişiklikler gösterdiği belirlendi. Koyun ve keçilerde ise anlamlı farklılıklara rastlanılmadı.

Sığır, koyun ve keçilerden toplanan plazma örnekleri viremik hayvanların tespiti için kantitatif rt RT-PCR ile test edildi. 1337 plazma örneğinin dokuzunda virus RNA'sı tespit edildi ve prevalans oranı %0,67 olarak bulundu. Hayvan türlerine göre prevalans oranları, sığırlarda %0,74 (7/939) ve koyunlarda %0,52 (2/383) olarak tespit edildi. Keçilerde virus RNA'sına rastlanılmadı. Hastalığın aylara göre prevalans oranları ise Nisan ayında %1,24 ve Mayıs ayında %5,18 olarak bulundu. Örneklenen hayvanlarda virus RNA'sına diğer aylarda rastlanılmadı. Viremideki bu hayvanlarda viral yük miktarları $4,10 \times 10^1$ - $2,40 \times 10^3$ kopya/mL olarak hesaplandı.

Elde edilen verilere göre, sığırlarda tespit edilen seroprevalans oranının diğer hayvan türlerine göre daha yüksek olduğu görüldü. Kesimi yapılan hayvanlarda seroprevalans oranlarının özellikle yaşa bağlı olarak önemli farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Viremik hayvan sayısının az olmasına rağmen, viral yük miktarı ($2,40 \times 10^3$ kopya/mL) yüksek bulundu. Bu durum özellikle mezbaha çalışanlarının hastalık açısından ciddi risk altında olduklarını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: ELISA, Evcil hayvanlar, Kantitatif rt RT-PCR, KKKAV, Viral yük.

SUMMARY

Virological and Serological Investigation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) in Ruminant Species Slaughtered in Some CCHF-Endemic Provinces (Samsun, Sivas, Tokat)

In this study, the presence and prevalence of the disease were investigated by both serologically and virologically in slaughtered ruminant species (cattle, sheep and goat) in Samsun, Sivas and Tokat provinces where CCHFV infections are endemic. It has been tried to show how effectively these animal species can play a role in the circulation of the virus in the environment and in transmission of the disease to humans. It was aimed to determine the seasonal distribution and viremia possibility among the slaughtered animal species. In addition, this study was conducted to determine the quantities of viral load in viremic animals by molecular methods and to determine the maximum viral load amounts that people as the last host can be exposed during the slaughter.

In this context, two slaughterhouses operating in Samsun, Sivas and Tokat provinces were selected and sampled. The slaughterhouses were regularly visited from 1 September 2013 to 31 August 2014 and blood samples were taken from slaughtered animal species. A total of 1337 serum and plasma samples were collected during this period. The serum samples were tested by ELISA for the detection of CCHFV antibodies. The seroprevalence rate in cattle was determined as 36,21% (340/939), in sheep 6,27% (24/383) and in goats 6,67% (1/15). As a result of the statistical analyzes (chi-square, $p < 0,001$), it was determined that the seroprevalence rates determined in cattle changes according to non-biological risk factors such as sampling time, age and gender of the animal. No significant differences were found in sheep and goats.

The plasma samples collected from cattle, sheep and goats were tested by quantitative rt RT-PCR for detection of viremic animals. Viral RNA was detected in nine of the 1337 plasma samples and the prevalence rate was found to be 0,67%. The prevalence rates according to animal species were 0,74% (7/939) in cattle and 0,52% (2/383) in sheep. Viral RNA was not found in goats. The prevalence rates of the disease according to the months were 1,24% in April and 5,18% in May. The virus RNA in the sampled animals was not found in other months. The viral load quantities in these animals were calculated as $4,10 \times 10^1$ - $2,40 \times 10^3$ copies/mL.

According to the obtained data, it was observed that the seroprevalence rate determined in cattle was higher than other animal species. It was determined that seroprevalence rates in slaughtered animals showed significant differences, especially with respect to age. Although the number of viremic animals was low, the amount of viral load was high ($2,40 \times 10^3$ copies/mL). This indicates that especially slaughterhouse workers are at serious risk of illness.

Keywords: ELISA, Domestic animals, Quantitative rt RT-PCR, CCHFV, Viral load.

KAYNAKLAR

- ADAM IA, MAHMOUD MAM, ARADAIB IE (2013). A seroepidemiological survey of Crimean-Congo hemorrhagic fever among cattle in North Kordufan state, Sudan. *Viol J*, **10**: 178.
- AKINCI E, BODUR H, SUNBUL M, LEBLEBICIOGLU H (2016). Prognostic factors, pathophysiology and novel biomarkers in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antivir Res*, **132**: 233-243.
- AKUFFO R, BRANDFUL JAM, ZAYED A, ADJEI A, WATANY N, FAHMY NT, HUGHES R, DOMAN B, VOEGBORLO SV, AZIATI D, PRATT D, AWUNI JA, ADAMS N, DUEGER E (2016). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in livestock ticks and animal handler seroprevalance at an abattoir in Ghana. *BMC Infect Dis*, **16**: 324.
- ALBAYRAK H, OZAN E, KURT M (2010). Molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV) but not West Nile virus (WNV) in hard ticks from provinces in northern Turkey. *Zoonoses Public Hlth*, **57**: e156-e160.
- ALBAYRAK H, OZAN E, KURT M (2012). Serosurvey and molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in northern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **44**: 1667-1671.
- ATKINSON B, LATHAM J, CHAMBERLAIN J, LOGUE C, O'DONOGHUE L, OSBORNE J, CARSON G, BROOKS T, CARROLL M, JACOBS M, HOPKINS S, HEWSON R (2012). Sequencing and phylogenetic characterisation of a fatal Crimean-Congo haemorrhagic fever case imported into the United Kingdom, October 2012. *Euro Surveill*, **17**: 48.
- BENTE DA, FORRESTER NL, WATTS DM, MCAULEY AJ, WHITEHOUSE CA, BRAY M (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antivir Res*, **100**: 159-189.
- BERGER S (2017). Infectious diseases of Pakistan. Los Angels. Gideon Informatics. 59-60.
- BOKAIE S, MOSTAFAVI E, HAGHDOOST AA, KEYVANFAR H, GOOYA MM, MESHKAT M, DAVARI A, CHINIKAR S (2008). Crimean Congo hemorrhagic fever in northeast of Iran. *J Anim Vet Adv*, **7**: 343-350.
- BOWMAN AS, NUTTALL PA (2008). Ticks: Biology, disease and control. 1rt Ed. New York. Cambridge Universty Press. 1-27.
- BURT FJ, PAWESKA JT, ASHKETTLE B, SWANEPOEL R (2009). Genetic relationship in southern African Crimean-Congo haemorrhagic fever virus isolates: evidence for occurrence of reassortment. *Epidemiol Infect*, **137**: 1302-1308.
- CARROLL SA, BIRD BH, ROLLIN PE, NICHOL ST (2010). Ancient common ancestry of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Mol Phylogenet Evol*, **55**: 1103-1110.
- CDC (2017). Centers for Disease Control and Prevention. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/vhf/crimean-congo/> [Accessed 13 Mart 2017].

- CHAMBERLAIN J, COOK N, LLOYD G, MIOULET V, TOLLEY H, HEWSON R (2005). Co-evolutionary patterns of variation in small and large RNA segments of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*, **86**: 3337-3341.
- CHINIKAR S, GHIASI SM, MORADI M, GOYA MM, SHIRZADI MR, ZEINALI M, MESHKAT M, BOULOY M (2010). Geographical distribution and surveillance of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *Vector-Borne Zoonot*, **10**: 705-708.
- CHINIKAR S, MOGHADAM AH, PARIZADEH SMJ, MORADI M, BAYAT N, ZEINALI M, MOSTAFAVI E (2012). Seroepidemiology of Crimean Congo hemorrhagic fever in slaughterhouse workers in North eastern Iran. *Iraian J Publ Health*, **41**: 72-77.
- CHINIKAR S, BOUZARI S, SHOKRGOZAR MA, MOSTAFAVI E, JALALI T, KHAKIFIROUZ S, NOWOTNY N, FOOKS AR, SHAH-HOSSEINI N (2016). Genetic diversity of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains from Iran. *J Arthropod-Borne Dis*, **10**: 127-140.
- ÇEVİK MA, ERBAY A, BODUR H, EREN SS, AKINCI E, ŞENER K, ÖNGÜRÜ P, KUBAR A (2007). Viral load as a predictor of outcome in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis*, **45**: e96-100.
- DEMİR ZC, BASTUG A, BODUR H, ERGUNAY K, OZKUL A (2017). MicroRNA expression profiles in patients with acute Crimean Congo hemorrhagic fever reveal possible adjustments to cellular pathways. *J Med Virol*, **89**: 417-422.
- DEYDE VM, KRISTOVA ML, ROLLIN PE, KSIAZEK TG, NICHOL ST (2006). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol*, **80**: 8834-8842.
- DRESHAJ S, AHMETI S, RAMADANI N, DRESHAJ G, HUMOLI I, DEDUSHAJ (2016). Current situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southeastern Europe and neighboring countries: a public health risk for the European Union. *Travel Medicine and Infectious Disease*, **14**: 81-91.
- DUH D, SAKSIDA A, PETROVEC M, AHMETI S, DEDUSHAJ I, PANNING M, DROSTEN C, AVSIC-ZUPANC T (2007). Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerg Infect Dis*, **13**: 1769-1772.
- ERGONUL O (2006). Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis*, **6**: 203-214.
- ERGONUL O, WHITEHOUSE CA (2007). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: A Global Perspective. The Netherlands. Springer.
- ERGUNAY K, WHITEHOUSE CA, OZKUL A (2011). Current Status of Human Arboviral Diseases in Turkey. *Vector-Borne Zoonot*, **11**: 731-741.
- ERGUNAY K, TUFAN ZK, BULUT C, KINIKLI S, DEMIROZ AP, OZKUL A (2014). Antibody responses and viral load in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever: a comprehensive analysis during the early stages of the infection. *Diagn Microb Infect Dis*, **79**: 31-36.
- FAZLALIPOUR M, BANIASADI V, MIRGHIASI SM, JALALI T, KHAKIFIROUZ S, AZAD-MANJIRI S, MAHMOODI V, NADERI HR, ZARANDI R, SALEHI-VAZIRI M (2016).

Crimean-Congo hemorrhagic fever due to consumption of raw meat: Case reports from east-north of Iran. *Jpn J Infect Dis*, **69**: 270-271.

GALE P, ESTRADA-PENA A, MARTINEZ M, ULRICH RG, WILSON A, CAPELLI G, PHIPPS P, DE LA TORRE A, MUNOZ MJ, DOTTORI M, MIOULET V, FOOKS AR (2010). The feasibility of developing a risk assessment for the impact of climate change on the emergence of Crimean-Congo hemorrhagic fever in livestock in Europe: a review. *J Appl Microbiol*, **108**: 1859-1870.

GTHB (2016). Türkiye Cumhuriyeti Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Samsun, Sivas ve Tokat İl Müdürlükleri resmi yazışmaları. Tarih: 12.12.2016.

GUVEN G, TALAN L, ALTINTAS ND, MEMIKOGLU KO, YORUK F, AZAP A (2017). An unexpected fatal CCHF case and management of exposed health care workers. *Int J Infect Dis*, **55**: 118-121.

HEKIMOGLU O, OZER N, ERGUNAY K, OZKUL A (2012). Species distribution and detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in field-collected ticks in Ankara province, Central Anatolia, Turkey. *Exp Appl Acarol*, **56**: 75-84.

IBRAHIM AM, ADAM IA, OSMAN BT, ARADAIB IE (2015). Epidemiological survey of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in cattle in east Darfur state, Sudan. *Ticks Tick-Borne Dis*, **6**: 439-444.

ICTV (2017). International Committee on Taxonomy of Viruses. [Online]. Available: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Accessed 13 Mart 2017].

JAMSHIDI M, DANESHI N, PARAD MT, JAMSHIDI A, VALIPOUR AA, DIFRAKHS A, KAJKOLAH K (2017). Crimean-Congo hemorrhagic fever: Report of three cases from Iran. *J Infect Dis Ther*, **5**: 1.

JONGEJAN F, UILENBERG G (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, **129**: 3-14.

KADANALI A, EROL S, ÖZKURT Z, ÖZDEN K (2009). Epidemiological risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever patients. *Turk J Med Sci*, **39**: 829-832.

KALAYCIOGLU AT, DURMAZ R, UYAR Y, UNALDI O, AKSEKILI E, OZKUL A, KORUKLUOGLU G, ERTEK M (2012). Lack of genetic diversity in Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Turkey: Assessment of present and future patterns of disease. *J Med Virol*, **84**: 471-478.

KESHTKAR-JAHROMI M, SAJADI MM, ANSARI H, MARDANI M, HOLAKOUIE-NAIENE K (2013). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Iran. *Antivir Res*, **100**: 20-28.

KIRBAŞ A, ÖZDEMİR H, AKSÖZEK A (2010). Elazığ, Samsun, Sivas, Tokat ve Yozgat illerindeki sığır ve koyunlarda Kırım Kongo kanamalı ateş virüs enfeksiyonunun seroprevalansının araştırılması. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, **24**: 137-142.

KÖKSAL I, YILMAZ G, ISKENDER S, ARSLAN M, YAVUZ I, AKSOY F, VATANSEVER Z (2011). The first Crimean-Congo hemorrhagic fever case in the winter season from Turkey. *Intervirology*, **54**: 144-145.

- KUBAR A, HACIOMEROGLU M, OZKUL A, BAGRIACIK U, AKINCI E, SENER K, BODUR H (2011). Prompt administration of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) virus hyperimmunoglobulin in patients diagnosed with CCHF and viral load monitorization by reverse transkriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis*, **64**: 439-443.
- KUHN JH, WILEY MR, RODRIGUEZ SE, BAO Y, PRIETO K, TRAVASSOS DA ROSA APA, GUZMAN H, SAVJI N, LADNER JT, TESH RB, WADA J, JAHRLING PB, BENTE DA, PALACIOS G (2016). Genomic characterization of the genus *Nairovirus* (Family *Bunyaviridae*). *Viruses*, **8**: 164.
- LEBLEBICIOGLU H, SUNBUL M, MEMISH ZA, AL-TAWFIQ JA, BODUR H, OZKUL A, GUCUKOGLU A, CHINIKAR S, HASAN Z (2015). Consensus report: Preventive measures for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever during Eid-al-Adha festival. *Int J Infect Dis*, **38**: 9-15.
- LEBLEBICIOGLU H, OZARAS R, IRMAK H, SENCAN I (2016). Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey: current status and future challenges. *Antivir Res*, **126**: 21-34.
- LUKASHEV AN (2005). Evidence for recombination in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*, **86**: 2333-2338.
- MARKLEWITZ M (2016). Diversity and evolutionary origin of the virus family *Bunyaviridae*. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Doktora Tezi, 1-7.
- MERTENS M, SCHMIDT K, OZKUL A, GROSCHUP MH (2013). The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antivir Res*, **98**: 248-260.
- MERTENS M, VATANSEVER Z, MRENOSKI S, KRSTEVSKI K, STEFANOVSKA J, DJADJOVSKI I, CVETKOVIKJ I, FARKAS R, SCHUSTER I, DONNET F, COMTET L, TORDO N, MECHLIA BM, BALKEMA-BUSCHMANN A, MITROV D, GROSCHUP MH (2015). Circulation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Former Yugoslav Republic of Macedonia revealed by screening of cattle sera using a novel enzyme-linked immunosorbent assay. *PLOS Neglect Trop D*, **9**: 3.
- MIDILLI K, GARGILI A, ERGONUL O, ELEVLI M, ERGIN S, TURAN N, ŞENGÖZ G, OZTURK R, BAKAR M (2009). The first clinical case due to AP92 like strain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and a field survey. *BMC Infect Dis*, **9**: 90.
- MILD M, SIMON M, ALBERT J, MIRAZIMI A (2010). Towards an understanding of the migration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*, **91**: 199-207.
- MOSTAFAVI E, CHINIKAR S, ESMAEILI S, AMIRI FB, TABRIZI AMA, KHAKIFIROUZ S (2012). Seroepidemiological survey of Crimean-Congo hemorrhagic fever among sheep in Mazandaran province, Northern Iran. *Vector-Borne Zoonot*, **12**: 739-742.
- MOSTAFAVI E, HAGHDOOST AA, KHAKIFIROUZ S, CHINIKAR S (2013). Spatial analysis of Crimean Congo hemorrhagic fever in Iran. *Am J Trop Med Hyg*, **89**: 1135-1141.
- MURPHY AF, GIBBS EPJ, HORZINEK MC, STUDDERT MJ (1999). *Veterinary Virology*. 3rd Ed. London. Academic Press. 472-473.

- MUSTAFA ML, AYAZI E, MOHAREB E, YINGST S, ZAYED A, ROSSI CA, SCHOEPP RJ, MOFLEH J, FIEKERT K, AKHBARIAN Z, SADAT H, LESLIE T (2011). Crimean-Congo hemorrhagic fever, Afghanistan, 2009. *Emerg Infect Dis*, **17**: 1940-1941.
- NABETH P, CHEIKH DO, LO B, FAYE O, VALL IOM, NIANG M, WAGUE B, DIOP D, DIALLO M, DIALLO B, DIOP OM, SIMON F (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis*, **10**: 2143-2149.
- OIE (2014). World Organisation for Animal Health. Terrestrial Manual Chapter 2.1.5. [Online]. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.05_CCHF.pdf [Accessed 17 Mart 2017].
- OZKAYA E, DINCER E, CARHAN A, UYAR Y, ERTEK M, WHITEHOUSE CA, OZKUL A (2010). Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Turkey: Occurrence of local topotype. *Virus Res*, **149**: 64-70.
- ÖZÜPAK T (2017). Kırım Kongo kanamalı ateşi virüsü'nün kene ve evcil ruminant (sığır, koyun ve keçi) kan ve sütlerinde varlığının araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Doktora Tezi, 15-27.
- PANAYOTOVA E, PAPA A, TRIFONOVA I, CHRISTOVA I (2016). Crimean-Congo hemorrhagic fever virus lineages Europe 1 and Europe 2 in Bulgarian ticks. *Ticks Tick-Borne Dis*, **7**: 1024-1028.
- PAPA A, WEBER F, HEWSON R, WEIDMANN M, KOKSAL I, KORUKOGLU G, MIRAZIMI A (2015). Meeting report: First international conference on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antivir Res*, **120**: 57-65.
- PSHENICHNAYA NY, NENADSKAYA SA (2015). Probable Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission occurred after aerosol-generating medical procedures in Russia: nosocomial cluster. *Int J Infect Dis*, **33**: 120-122.
- RAOOFI R, POURAHAMAD M, NAZER MR, POURNIA Y, CHINIKAR S (2012). Case series of Crimean-Congo disease: an outbreak in south of Fars, Iran. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, **14**: 96-100.
- RODRIGUEZ LL, MAUPIN GO, KSIAZEK TG, ROLLIN PE, KHAN AS, SCHWARZ TF, LOFTS RS, SMITH JF, NOOR AM, PETERS CJ, NICHOL ST (1997). Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg*, **57**: 512-518.
- SALEHI-VAZIRI M, BANIASADI V, JALALI T, MIRGHIASI SM, AZAD-MANJIRI S, ZARANDI R, MOHAMMADI T, KHAKIFIROUZ S, FAZLALIPOUR M (2016). The first case of Crimean-Congo hemorrhagic fever due to AP92 like strain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Jpn J Infect Dis*, **144**: 3422-3425.
- SCHUSTER I, MERTENS M, MRENOSKI S, STAUBACH C, MERTENS C, BRUNING F, WERNIKE K, HECHINGER S, BERXHOLI K, MITROV D, GROSCHUP MH (2016). Sheep and goats as indicator animals for circulation of CCHFV in the environment. *Exp Appl Acarol*, **68**: 337-346.

- SHARIFI-MOOD B, METANAT M, ALAVI-NAINI R (2014). Prevalance of Crimean-Congo hemorrhagic fever among high risk human groups. *Int J High Risk Behav Addict*, **3**: e11520.
- SHAYAN S, BOKAEAN M, SHAHRIVAR MR, CHINIKAR S (2015). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Lab Medicine*, **46**: 180-189.
- SİSMAN A (2013). Epidemiologic features and risk factors of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Samsun province, Turkey. *J Epidemiol*, **23**: 95-102.
- SPENGLER JR, BERGERON E, ROLLIN PE (2016a). Seroepideological studies of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in domestic and wild animals. *PLOS Neglect Trop D*, **10**:1.
- SPENGLER JR, ESTRADA-PENA A, GARRISON AR, SCHMALJOHN C, SPIROPOULOU CF, BERGERON E, BENTE DA (2016b). A chronological review of experimental infection studies of the role of wild animals and livestock in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Antivir Res*, **135**: 31-47.
- TCSB (2017). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Verileri. [Online]. Available: http://www.thsk.gov.tr/dosya/birimler/zoootik_hastaliklar_db/dokumanlar/kkka/KKKA_sunum_hekimler_icin.pdf [Accessed 20 Mart 2017].
- TUNCER P, YESILBAG K, ALPAY G, DINCER E, GIRISGEN AO, AYDIN L, UYAR Y, OZKUL A (2014). Crimean-Congo hemorrhagic fever infection in domestic animals in Marmara region, Western Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **61**: 49-53.
- WALKER PJ, WIDEN SG, FIRTH C, BLASDELL KR, WOOD TG, TRAVASSOS DA ROSA APA, GUZMAN H, TESH RB, VASILAKIS N (2015). Genomic characterization of Yogue, Kasokero, Issyk-Kul, Keterah, Gossas and Thiafora viruses: Nairoviruses naturally infecting bats, shrews and ticks. *Am J Trop Med Hyg*, **93**: 1041-1051.
- WEIDMANN M, AVSIC-ZUPANC T, BINO S, BOULOY M, BURT F, CHINIKAR S, CHRISTOVA I, DEDUSHAJ I, EL-SANOUSI A, ELALDI N, HEWSON R, HUFERT FT, HUMOLLI I, VAN VUREN PJ, TUFAN ZK, KORUKLUOGLU G, LYSSEN P, MIRAZIMI A, NEYTS J, NEIDRIG M, OZKUL A, PAPA A, PAWESKA J, SALL AA, SCHMALJOHN CS, SWANEPOEL R, UYAR Y, WEBER F, ZELLER H (2016). Biosafety standards for working with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*, **97**: 2799-2808.
- WHITEHOUSE CA (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antivir Res*, **64**: 145-160.
- WILSON ML, LEGUENNO B, GUILLAUD M, DESOUTTER D, GONZALEZ JP, CAMICAS JL (1990). Distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral antibody in Senegal: environmental and vectorial correlates. *Am J Trop Med Hyg*, **43**: 557-556.
- XIA H, ZHAO J, LI Y, YIN S, TANG S, ZHANG Z, YU J, KOU Z, FAN Z, LI T (2013). Infection and propagation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in embryonated chicken eggs. *Virus Res*, **173**: 344-349.
- YILMAZ GR, BUZGAN T, IRMAK H, SAFRAN A, UZUN R, CEVIK MA, TORUNOGLU MA (2009). The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *Int J Infect Dis*, **13**: 380-386.

ZIVCEC M, SCHOLTE FEM, SPIROPOULOU CF, SPENGLER JR, BERGERON E (2016).
Molecular insight into Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Viruses*, **8**: 106.



EKLER

EK-1 Etik Kurul İzin Yazısı

T.C.
SAMSUN VETERİNER KONTROL VE ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
BAŞVURU DEĞERLENDİRME FORMU

Sayı : 28	
Geliş Tarihi : 28	
Araştırma Yürütücüsü : Emre Özcan	
Araştırmanın Adı : Kırmızı Kongo Kanamalı Atezi (KKKA) Hastalığının Endemik	
Hayvan türleri ve sayıları : Olduğu Bazı illerde (Samsun, Sivas, Trabzon) kesilen & enzimant	
Pürlerinde KKKA Virüsü Varlığının Virülogik ve Genetik Olarak Araştırılması (1066.)	
Araştırma için seçilen hayvan türü uygun mu?	Evet ☒ Hayır ☐
Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı amaçlanmış mıdır?	Evet ☒ Hayır ☐
Hayvanlar için optimum şartlar sağlanmış mıdır?	Evet ☒ Hayır ☐
Araştırmacı / ların deney hayvanı sertifikası / yetkisi var mı?	Evet ☒ Hayır ☐
Araştırma protokolünde hayvanlara en az ağrı ve acı verecek önlemler alınmış ve bu konudaki standartlar gözetilmiş mi?	Evet ☒ Hayır ☐
Araştırmada çevre ve/veya iş sağlığını tehdit edecek kimyasal, biyolojik radyoaktif maddelerin bulaşması riski var mıdır?	Evet ☐ Hayır ☒
Araştırma sonunda hayvanlara yapılacak işlemler konusunda gerçekçi tespitler yapılmış mıdır?	Evet ☒ Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet ☒ Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi edildi ise atıkların imhası için gerekli önlem alınmış mıdır?	Evet ☒ Hayır ☐
Açıklamalar:	
☒ Tarafımdan değerlendirilen bu çalışma Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen ilkelere uygun bulunmuştur. ☐ Tarafımdan değerlendirilen bu çalışma Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen ilkelere uygun bulunmamıştır. ☐ Eksik kısımların tamamlanması uygun görülmüştür. ☐ Düzeltme gerekli görülmüştür. ☐ Araştırmacılarla görüşülme yapılması gerekli görülmüştür. ☐ Reddedilmesi uygundur. (Lütfen gerekçenizi yukarıdaki "Açıklamalar" bölümüne yazınız.)	
Etik Kurul Üyesi (Unvanı, Adı ve Soyadı) M. H. Uzun Vet. Hek.	Tarih 19.06.2013 Dr. N. N. Örmeci Vet. Hek.

EK-2 Etik Kurul İzinde Revizyon Kabul Yazısı



Sayı: 19572899-P.900/
Konu: Proje Başvurusu

Tarih:05.03.2014

Emre ÖZAN
Veteriner Hekim

İlgi: 03.03.2014 sayılı yazınız

Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na (SVKEMHDYK) 03.03.2013 tarihinde sunduğunuz yazınızla daha önce Etik Kurul Raporu aldığımız "Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Hastalığının Endemik Olduğu bazı İllerde (Samsun, Sivas, Tokat) Kesilen Ruminant Türlerinde KKKA Virus Varlığının Virolojik ve Serolojik Olarak Araştırılması " konulu projeniz de yapmak istediğiniz değişiklik ve öneriler 05.03.2014 tarihli Etik Kurul Toplantısında görüşülmüş olup yapılması uygun görülmüştür.

Gereğini arz/rica ederim.


Dr.Neslihan ÖRMANCI
Etik Kurul Başkanı

EK-3 Doktora Tez Konusunun Çalışılması Hakkında Bakanlık İzin Yazısı



T.C.
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü



Sayı : 55016929-325.01.53/20361
Konu : Doktora Tez Konusu Hakkında



.../.../2013

43136

SAMSUN VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 13/05/2013 tarihli ve 849 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazınızda Enstitünüz çalışanlarından Veteriner Hekim Emre ÖZAN'ın aldığı doktora eğitimi kapsamında yapacağı "Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Endemik Olduğu Bazı İllerde Kesilen Ruminant Türlerinde KKKA Virus Varlığının Virolojik ve Serolojik Olarak Araştırılması" isimli çalışma hususunda Bakanlığımız görüşü sorulmaktadır.

Bu çerçevede söz konusu çalışmanın yapılması, KKKA hastalığı ile mücadele açısından yararlı görülmekte olup, çalışma sonuçlarının Bakanlığımızla paylaşılması hususunda;

Bilgi ve gereğini rica ederim.

Habib CAN
Genel Müdür Yardımcısı

Sn. Emre ÖZAN'a

Eskişehir Yolu 9. Km. Lodumlu ANKARA
Telefon : 0 (312) 2587524
e-posta : ilkay.demirhan@tarim.gov.tr

Ayrıntılı bilgi için iritibat : Vet. Hekim İlkay DEMİRHAN
Faks : 0 (312) 2587521
Elektronik Ağ : www.gkgm.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : Emre
Soyadı : ÖZAN
Doğum yeri ve tarihi : Samsun-02.01.1983
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Evli
Askerlik durumu : Yaptı
İletişim adresi ve telefonu : Mevlana Mah. 745. Sok. Tuğra Park Sitesi
No.4 Kat.5 Daire.11 55200 Atakum/SAMSUN
+90 506 276 40 91

II-Eğitimi

2005 : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
(Lisans)
1999 : Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi
Yabancı Dili : ÜDS-63,75

III-Ünvanları

2005 : Veteriner Hekimi
1999 : Veteriner Sağlık Teknisyeni

IV-Mesleki Deneyimi

2015- Şu an : Samsun VKE Müdür Yardımcısı
2013-2015 : Samsun VKE Teknik Koordinatör
2012- Halen : Samsun VKE Kalite Yönetim Birim
Sorumlusu
2009-2013 : Samsun VKE Müdür Yardımcısı
2009- Halen : Samsun VKE Viroloji Laboratuvarı Sorumlusu
2007-2009 : Samsun VKE Viroloji Laboratuvarı Veteriner
Hekimi
2005-2007 : Çıldır Tarım İlçe Müdürlüğü Veteriner Hekimi
2003-2005 : Ardahan Tarım İl Müdürlüğü Veteriner Sağlık
Teknisyeni

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

2008 : Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları (SCI ve SCI expanded)

1. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2010). Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum,1972) İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis ve İnfeksiyöz Hematopoietik Nekrozis Virus Enfeksiyonlarının Varlığının Araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **57**:125-129.
2. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2010). Orta Karadeniz Bölgesinde Ruminant ve Tek Tırnaklılarda Kan Emici Sineklerle Nakledilen Bazı Arboviral Enfeksiyonların Seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **16**: 33-36.
3. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KURT M (2010). An Antigenic Investigation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) in Hard Ticks from Provinces in Northern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **42**: 1323-1325.
4. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2010). Serosurveillance for Equine Infectious Anaemia in the Ardahan Province of Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **42**: 1593-1595.
5. ALBAYRAK H, **OZAN E**, GUR S (2010). A Serologic Investigation of Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV) in Cattle and Gazella Subgutturosa Subgutturosa in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **42**: 1589-1591.
6. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2010). Molecular Detection of Avian Influenza Virus but not West Nile Virus in Wild Birds in Northern Turkey. *Zoonoses Public Health*, **57**: e71-e75.
7. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KURT M (2010). Molecular Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) but not West Nile Virus (WNV) in Hard Ticks from Provinces in Northern Turkey. *Zoonoses Public Health*, **57**: e156-e160.
8. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2012). The Investigation of Pestivirus and Rift Valley Fever Virus Infections in Aborted Ruminant Foetuses in the Blacksea Region in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **18**: 457-461.
9. ALBAYRAK H, OKUR-GUMUSOVA S, **OZAN E**, YAZICI Z (2012). Molecular Detection of Pestiviruses in Aborted Foetuses from Provinces in Northern Turkey. *Trop Anim Health Prod.*, **44**: 677-680.
10. ALBAYRAK H, YAZICI Z, OKUR-GUMUSOVA S, **OZAN E** (2012). Maedi-Visna Virus Infection in Karayaka and Amasya Herik Breed Sheep from Provinces in Northern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **44**: 939-941.

11. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KURT M (2012). Serosurvey and Molecular Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) in Northern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **44**: 1667-1671.
12. YAZICI Z, ALBAYRAK H, **OZAN E**, OKUR-GUMUSOVA S (2012). The First Investigation of West Nile Virus in Horses Using Real Time RT-PCR in Middle Black Sea Region in Turkey. *J Arthropod-Borne Dis*, **6**: 151-155.
13. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2013). Seroepidemiological Study of West Nile Virus and Rift Valley Fever Virus in Some of Mammalian Species (Herbivores) in Northern Turkey. *J Arthropod-Borne Dis*, **7**: 90-93.
14. AZKUR AK, ALBAYRAK H, RISVANLI A, PESTIL Z, **OZAN E**, YILMAZ O, TONBAK S, CAVUNT A, KADI H, MACUN HC, ACAR D, OZENC E, ALPARSLAN S, BULUT H (2013). Antibodies to Schmallenberg Virus in Domestic Livestock in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **45**: 1825-1828.
15. ALBAYRAK H, **OZAN E**, CAVUNT A (2013). A Serological Survey of Selected Pathogens in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Northern Turkey. *Eur J Wildl Res*, **59**: 893-897.
16. YAZICI Z, ALBAYRAK H, **OZAN E**, GUMUSOVA S (2015) Serological Status of Bovine Herpes Virus Type 1 in Cattle in Small Scale Private Farms in the Central Black Sea Region, Turkey. *Pak Vet J*, **35**: 101-102.
17. TOPLU N, OGUZOGLU TÇ, URAL K, ALBAYRAK H, **OZAN E**, ERTURK A, EPIKMEN ET (2015). West Nile Virus Infection in Horses Detection by Immunohistochemistry, In Situ Hybridization, and ELISA. *Veterinary Pathology*, **52**: 1073-1076.
18. GUMUSOVA S, ALBAYRAK H, **OZAN E**, YAZICI Z (2015). Detection of Enzootic Bovine Leucosis in Suspected Herd. *Pakistan J Zool*, **47**: 1196-1198.
19. YAZICI Z, GUMUSOVA S, TAMER C, CAGIRGAN AA, AKMAN A, **OZAN E**, KADI H, PALANCI HS, ALBAYRAK H (2017). Molecular identification and phylogenetic analysis of non-cytopathic bovine viral diarrhea virus isolate obtained from a local respiratory outbreak in Northern Turkey. *Med Weter*, **73**: 284-288.

Diğer Yayınları

1. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2011). Acute Bee Paralysis-Israel Acute Bee Paralysis and Kashmir Bee Virus Complex. *Arıcılık Araştırma Dergisi*. **3**: 11-14.
2. TURAN HM, **OZAN E**, ALBAYRAK H, CAVUNT A, MEMIS YS (2012). Efficiency of Three PPRV Vaccines Commercially Available in Turkey. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, **7**: 1-6.

3. **OZAN E**, TURAN HM, ALBAYRAK H, CAVUNT A (2012). Serological Determination of Pestivirus, Bluetongue Virus and Peste Des Petits Ruminants Virus in Small Ruminants in Samsun Province of Turkey. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, **7**: 27-33.
4. ALBAYRAK H, **OZAN E**, BEYHAN YE, KURT M, KILICOGLU Y (2012). A Serological Investigation of Some Aetiological Agents Associated with Abortion in Domestic Water Buffalo (*Bubalus bulalis* Linneaus, 1758) in Samsun Province of Northern Turkey. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, **7**: 155-160.
5. ALBAYRAK H, **OZAN E**, CAVUNT A, KADI H, KURT M, BOLUKBASI C, PEKMEZCİ Z, KAYA S (2013) Investigation of Tick and Mosquito-Borne Flaviviruses in Blacksea Region. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, **8**: 105-111.
6. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KADI H, CAVUNT A, TAMER C (2016) Seroprevalence of Pestiviruses in Some Goat Breeds in Samsun Province. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, **11**: 1-5.

Sözlü veya Poster Sunumları

1. ALBAYRAK H, **OZAN E**, (2008). Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde halk elinde yetiştirilen koyunlarda Maedi-Visna enfeksiyonunun seroprevalansı. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Van, 204-205.
2. ALBAYRAK H, **OZAN E**, YAZICI Z, OKUR-GUMUSOVA S (2008). Koyunlarda Malignant Catarrhal Fever enfeksiyonunun seroprevalansı. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Van, 208-209.
3. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KURT M (2009). Investigation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus(CCHF) in Ticks in Turkey, 3rd Annual Meeting Epizone, Antalya, 181.
4. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2009). Seroprevalance of Vector-Borne Disease in Ruminants(Cattle, Sheep) And Equides (Horse, Donkey, Mule) in Middle Blacksea Region in Turkey, 3rd Annual Meeting Epizone, Antalya, 162.
5. ALBAYRAK H, OKUR-GUMUSOVA S, **OZAN E**, YAZICI Z (2009). Pestivirus Diagnosis by RT-PCR and ELISA, 34th FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 286.
6. ALBAYRAK H, OKUR-GUMUSOVA S, YAZICI Z, **OZAN E** (2009). First Investigation of West Nile Virus by rRT-PCR in Turkey, 34th FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 287.
7. OKUR-GUMUSOVA S, ALBAYRAK H, **OZAN E**, YAZICI Z (2009). Diagnosis to Bovine Herpes Virus-1(BHV-1) in Turkey By ELISA, 34th FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 287.

8. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2009). First Investigation of West Nile Virus(WNV) in Wild Bird in Turkey, 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 224.
9. ALBAYRAK H, **OZAN E**, DURMAZ Y (2009). Investigating the Presence of Infectious Haematopoietic Necrosis(IHN) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Virus Infections in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss walbaum*), 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 130.
10. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2009). First Investigation of Avian Influenza Virus(AIV) in Wild Bird in Turkey, 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 223.
11. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KURT M (2009). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) and West Nile Virus (WNV): Molecular Diagnosis and Ticks Survey, 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, Hungary, 118.
12. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2009). Investigation of West Nile Virus(WNV) and Avian Influenza Virus (AIV) in Wild Birds in Turkey, Annual Meeting Arbo-Zoonet 2009, Saint Raphael, France, 19-20.
13. ALBAYRAK H, **OZAN E**, GUR S (2010). Sığır ve Kursaklı Ceylanlarda Epizootik Hemorajik Hastalığın Serolojik Olarak Araştırılması,IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Lefkoşa, KKTC, 210-211.
14. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2010). Ardahan İlinde Enfeksiyöz Anemisinin Seroprevalansı,IX. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Lefkoşa, KKTC, 208-209.
15. ALBAYRAK H, **OZAN E**, BEYHAN YE, KURT M, KILICOGLU Y (2011). Serological Survey of Etiological Agents Associated with Abortion in Domestic Water Buffalo (*Bubalus Bubalus Linneaus*, 1758) in the Samsun Province of Northern Turkey, the 8th ESVV Pestivirus Symposium, Hannover, Germany, 108.
16. ALBAYRAK H, **OZAN E**, CAVUNT A (2011). Molecular Detection of Pestiviruses but not Rift Valley Fever Virus in Aborted Foetuses in Northern Turkey, the 8th ESVV Pestivirus Symposium, Hannover, Germany, 106.
17. **OZAN E**, ALBAYRAK H (2011). Serological Detection of West Nile Virus but not Rift Valley Fever Virus in Different Mammalian Species in Northern Turkey, 3rd Annual Meeting Arbo-Zoonet, Saint Raphael, France.
18. ALBAYRAK H, **OZAN E**, CAVUNT A (2011). Molecular Surveillance for Tick-Borne and Mosquito-Borne Flaviviruses in Ticks and Wild Birds in Northern Turkey, 3rd Annual Meeting Arbo-Zoonet, Saint Raphael, France.

19. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KURT M (2012). Serosurvey and Molecular Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus (CCHFV) in Northern Turkey. IX. Internattional Congress of Veterinary Virology, Madrid, Spain, 149.
20. **OZAN E**, ALBAYRAK H, CAVUNT A, KADI H, KURT M (2012). The Investigation of Important Viral Diseases of Queen Bee Breeding Colonies in Turkey. IX. Internattional Congress of Veterinary Virology, Madrid, Spain, 170.
21. ALBAYRAK H, TURAN HM, **OZAN E**, CAVUNT A, MEMIS YS (2012). An Investigation on Efficiency of the Three Commercially Available PPRV Vaccines in Turkey. IX. Internattional Congress of Veterinary Virology, Madrid, Spain, 201.
22. ALBAYRAK H, **OZAN E** (2012). Misdiagnosis between Rift Valley Fever Virus (RVFV) and Peste des Petits Ruminants Virus (PPRV) by Using Only PCR. Joint Conference on Emerging and Re-emerging Epidemics Affecting Global Health. Italy.
23. **OZAN E**, ALBAYRAK H, KADI H, BOLUKBAS CS, PEKMEZCI Z, KURT M, KAYA S (2012). Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesindeki Sinek Cinslerinde Rift Valley Fever Virusunun Moleküler Olarak Araştırılması. X. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 266.
24. **OZAN E**, TURAN HM, ALBAYRAK H, CAVUNT A, KADI H (2012), Samsun İlindeki Küçük Ruminantlarda Pestivirus, Mavidil Virusu ve Küçük Ruminant Vebası Virusunun Serolojik Olarak Belirlenmesi. X. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 268.
25. ALBAYRAK H, **OZAN E**, EROGLU C, CAVUNT A (2013), Genetic Analysis od Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains in Northern Turkey, 5. European Congress of Virology, Lyon, France,S188.
26. ALBAYRAK H, **OZAN E**, CAVUNT A, KADI H (2013), Seroprevalance of Schmallenberg and Akabane Virus Infections in Domestic Ruminants in Northern Turkey, 5. European Congress of Virology, Lyon, France,S203.
27. ALBAYRAK H, **OZAN E**, CAVUNT A (2013), A Serological Survey of Selected Pathogens in Wild Boar (Sus scrofa) in Northern Turkey. 5. European Congress of Virology, Lyon, France,S206.
28. ALBAYRAK H, **OZAN E**, CAVUNT A, KADI H, KURT M, BOLUKBASI C, PEKMEZCI Z, KAYA S (2013), Molecular Surveillance for Tick Borne and Mosquito Borne Flaviviruses in Blacksea Region of Turkey, 5. European Congress of Virology, Lyon, France,S206.
29. ALKAN F, ALBAYRAK H, TIMURKAN OM, **OZAN E**, COSKUN N (2013), The Epidemiology of Bovine Ephemeral Fever in Turkey, 7th Annual Meeting Epizone, Brussels, Belgium,181.

30. ALBAYRAK H, **OZAN E**, KADI H, CAVUNT A, ISIDAN H, DURMAZ Y (2014), Sequence Analysis of Infectious Pancreatic Necrosis Viruses Isolated from Turkey in 2013, 9th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Malaga, Spain, 51.
31. AZKUR AK, ALBAYRAK H, RIŞVANLI A, PESTİL Z, **OZAN E**, YILMAZ O, TONBAK Ş, CAVUNT A, KADI H, MACUN HC, ACAR D, OZENC E, ALPARSLAN S, BULUT H (2014). Türkiye'deki Evcil Ruminantlarda Schmallenberg Virüsüne Karşı Antikor Varlığı, XI.Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 1.
32. KADI, H., ALBAYRAK, H., KURT, M., KAYA, S., BOLUKBASİ, C.,S., PEKMEZCI, G.,Z., **OZAN,E.**, AYDIN, I., YAZICI, Z., OKUR-GUMUSOVA, S., BEYHAN, Y.,E. (2014), Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Bazı Kan Emici Sineklerde Arbovirasların Araştırılması, XI.Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 20.
33. **OZAN E**, ALBAYRAK H, ISIDAN H, DURMAZ Y, KADI H, CAVUNT A (2014), Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Gökkuşluğu Alabalık Çiftliklerinde Enfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) Virusunun İzolasyon ve İdentifikasyonu, XI.Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 37.
34. GUZEL M, TUTUNCU M, ALBAYRAK H, **OZAN E**, KOÇ RA, KADI H (2015), Enzootik Sığır Löykozunda Akut Faz Cevabı, 11.Veteriner İç Hastalıkları Kongresi, Samsun, Türkiye, 212-213.
35. GUMUSOVA S, ALBAYRAK A, **OZAN E**, YAZICI Z (2015), Enzootic Bovine Leukosis in Suspected Herd, Xth Internatinonal Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France, 265-266.
36. ALBAYRAK A, ISIDAN H, **OZAN E**, VAKHARIA V (2015), Molecular Characterization of the HAH-2 Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) from Turkey, Xth Internatinonal Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France, 271.
37. ALBAYRAK A, **OZAN E**, KADI H, CAVUNT A (2015), Molecular Detection and Seasonal Distribution of Lumpy Skin Disease Virus in Different Cattle Breeds from Provinces in Northern Turkey, Xth Internatinonal Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France, 272.
38. ALBAYRAK A, **OZAN E**, KADI H, CAVUNT A (2015), Serological Evidence of Food-and-Mouth Disease Virus Infection in Randomly Surveyed Goat Breeds in the Samsun Province of Turkey, Xth Internatinonal Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France, 276.
39. ALBAYRAK A, **OZAN E**, KADI H, CAVUNT A (2015), Seroprevalence and Distribution of Pestiviruses of Goat Breeds in the Samsun Province of Turkey , Xth Internatinonal Congress for Veterinary Virology, Montpellier, France, 276.

40. ALBAYRAK A, ISIDAN H, KALAYCI G, **OZAN E**, VAKHARIA V (2015), Genetic Analysis of the Complete G Gene of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus(VHSV) Isolates in Turkey, 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, 1.
41. ALBAYRAK A, **OZAN E**, VAKHARIA V (2015), Molecular Characterization of the Almus Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Isolate from Turkey, 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, 2.
42. YARIM GF, KAZAK F, SOZMEN M, KOCA I, ALBAYRAK H, YARIM M, CENESİZ S, **OZAN E** (2015). Kızılıcık (Cornus mas L.) Meyvesinin Sisplatinle İndüklenen Oksidatif Hasara Koruyucu Etkisinin in vitro İncelenmesi, 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, Samsun, Türkiye, 63-64.
43. TOPLU N, **OZAN E**, ALBAYRAK H, OĞUZOĞLU C, EPIKMEN T, AKCA Y, IPEK E, AKKOC A (2016). Gökkuşığı Alabalıklarında Deneysel Olarak Oluşturulan Persiste İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Hastalığında Apoptozis ve Tip 1 İnterferonların Doğal Bağışıklıktaki Rolü, 8.Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi, Samsun, Türkiye, 117-118.

VII-Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri

Proje Adı	Destekleyen Kuruluş	Projedeki Görevi	Başlangıç ve Bitiş Tarihleri
Ege Bölgesi İllerinde Önemli Arı Hastalıklarının Yaygınlığının Araştırılması	TAGEM	Araştırmacı	01.01.2009-2012
Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Gökkuşığı Alabalık Çiftliklerinde İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) Virusunun İzolasyon, İdentifikasyonu ve Dizi Analizi	TAGEM	Proje Lideri	01.01.2010-2014
Ana Arı Yetiştirme Kolonilerinde Önemli Arı Hastalıklarının Araştırılması	TAGEM	Araştırmacı	01.01.2010-2013
Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Bazı Sinek Cinsleri ile Nakledilen Arboviral–Enfeksiyonların Epidemiyolojisi	TAGEM	Proje Lideri	01.01.2011-2014

Gökkuşığı alabalıklarında enfeksiyöz pankreatik nekroz'un patogenezi üzerine deneysel bir araştırma: Apoptosis ve tip 1 interferonların innate (doğal) bağışıklıktaki rolü	TAGEM	Proje Lideri	01.01.2013-2016
Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virusunun Nükleokapsid Proteinine (NP) Karşı Gelişen Antikorların Hızlı Teşhisi İçin Lateks Aglutinasyon Testi Geliştirme Çalışması	TAGEM	Araştırmacı	01.01.2014-Halen
Sığırların Nodüler Ekzantemi Hastalığı'nın Vektör Kene-Konak İlişkisinin Araştırılması	TAGEM	Araştırmacı	01.01.2016-Halen
Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü Hastalığının CCHFV Seroprevalansının Adana İl Sınırları İçerisinde Keçi Koyun ve Sığırlarda Saptanması	Çukurova Üniversitesi (BAP)	Araştırmacı	02.05.2017-Halen
Türkiye'de İzole Edilen Enfeksiyöz Pankreatik Nekroz Virusuna Saha Suşlarının Genetik Analizi ve Moleküler Karakterizasyonu: Klasik ve Rekombinant Aşı Denemeleri ve Teşhis Kiti Geliştirilmesi	TÜBİTAK	Araştırmacı	01.04.2014-2017

VIII-Diğer Bilgiler

Aldığı Sertifikalar ve Eğitimler

1. Hücre Füzyonu Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, 02-06 Haziran 2008.
2. VIII. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, 07-09 Ekim 2008.
3. Training Course on Molecular Technology in the Field of Rabies, such as RT-PCR and Realtime PCR, Veterinary Control and Research Institute, Samsun, Turkey, 25-27 November 2008.

4. AB 7.Çerçeve Programı Uygulamalı Proje Hazırlama Eğitimi, Türkiye-Hollanda ve Almanya ülkeleri arasındaki Eşleştirme Projesi (TIFSA), TAGEM, Antalya, 19-22 Ekim 2009.
5. Veterinary Laboratory Networking for Highly Pathogenic Avian Influenza and other Poultry Disease, FAO Regional Network for Central Asia and Eastern Europe, FAO, Baku, Azerbaijan, 15-18 December 2009.
6. ISO/IEC 17025 Laboratuvar Akreditasyonu, Uzman Akreditasyon Danışmanlık, Samsun, 22-23 Şubat 2010.
7. Metot Validasyonu, Laboratuvar Akreditasyonu, Uzman Akreditasyon Danışmanlık, Samsun, 24 Şubat 2010.
8. Bilimsel Makale Yazımı, Sunu ve Etkili İletişim Kurma Teknikleri, Türkiye-Hollanda ve Almanya ülkeleri arasındaki Eşleştirme Projesi (TIFSA), TAGEM, Antalya, 06-08 Nisan 2010.
9. Epidemiology, Under the Technical Assistance for FMD Project, Turkey, 24-27 May 2010.
10. PPR Aşılama ve Koyun-Keçi Kimliklendirilmesi Eğiticilerinin Eğitimi Semineri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara, 21 Eylül 2010.
11. IX. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 5-7 Ekim 2010.
12. Büyükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin AB Standartlarında Geliştirilmesi Projesi, Milli Eğitim Bakanlığı, Belçika, 24 Ekim 2010 - 06 Aralık 2010.
13. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Samsun, 26 Aralık 2010.
14. Basic Veterinary Epidemiology Training Workshop, Colorado State University, Antalya, Turkey, 24-28 January 2011.
15. KKKA: Tanı, Epidemiyoloji, Korunma, Hazırlık ve Tedavide Yeni Yaklaşımlar-KKKA Çalıştayı, Avrupa Birliği ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, 19 Ekim 2011.
16. Canlı Hayvan ve Et İthalatında Yurtdışı Veteriner Kontrolleri, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, 25 Mayıs 2012.
17. IX. International Congress of Veterinary Virology and Joint Meeting with the European Society for Clinical Virology, Madrid, Spain, 4-7 September 2012.
18. ISO 17025 İç Denetçi Eğitimi, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü, Samsun, Türkiye, 09. Eylül 2013.
19. 5th European Congress of Virology, Lyon, France, 11-14 September 2013.
20. Xth International Congress of Veterinary Virology, Montpellier, France, 31 August – 3 September 2015.
21. 17th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, 7-11 September 2015.
22. 6th European Congress of Virology, Hamburg, Germany, 19-22 October 2016.