



**TOKAT VE ÇEVRESİNDEKİ
SERT KENELERDE
KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜNÜN
REAL TIME RT-PCR YÖNTEMİ İLE TEŞHİSİ**

Neslihan MUTLUAY

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Şaban TEKİN
2009
Her hakkı saklıdır**

T.C

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOKAT VE ÇEVRESİNDEKİ SERT KENELERDE
KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜNÜN
REAL TIME RT-PCR YÖNTEMİ İLE TEŞHİSİ

Neslihan MUTLUAY

TOKAT
2009

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. şaban TEKİN danışmanlığında, Neslihan MUTLUAY tarafından hazırlanan bu çalışma 11/09/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. şaban TEKİN

İmza:

Üye : Doç. Dr. İsa GÖKÇE

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet BURSALI

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Metin YILDIRIM

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Neslihan MUTLUAY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOKAT VE ÇEVRESİNDEKİ SERT KENELERDE KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜNÜN REAL TIME RT-PCR YÖNTEMİ İLE TEŞHİSİ

Neslihan MUTLUAY

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şaban TEKİN

ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı (Hemorajik) Ateşi (KKHA) hastalığı KKHA virüsünün sebep olduğu zoonotik bir hastalık olup Türkiye'nin de dahil olduğu bir çok ülkede ölümcül endemik vakalara sebep olmaktadır. Tokat bölgesinde KKHA'nın değişik biyolojik numunelerdeki tanısıyla ilgili çalışmalar çok sınırlıdır. Bu çalışmada Tokat ve çevresinde çeşitli hayvan ve insanlardan toplanan kenelerdeki KKHA varlığı real time RT-PCR yöntemiyle test edilmiştir. Sonuçlara göre real time RT-PCR tekniğiyle, kenelerdeki KKHA prevalansı %18 olarak bulunmuştur. KKHAV varlığı özellikle *Hyalomma* ve *Rhiphicephalus* türlerinde tespit edilmiştir. Bu çalışma bölge kenelerinde KKHA varlığını kanıtlamakla birlikte, hangi kene türlerinin risk taşıdığını göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca bu çalışmada kenelerde KKHA tanısında real time RT-PCR tekniğinin çok daha hassas olması nedeniyle en uygun teknik olduğu belirlenmiştir. Özet olarak bu sonuçlar bölge kenelerinin, insan veya hayvanlara KKHAV bulaştırma potansiyelinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bölgede KKHA gibi kene kökenli hastalıkların kontrol edilebilmesi, daha etkili ve uzun süreli kene mücadele stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

2009, 38 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kene, KKHA, KKHAV, real time RT-PCR, Tokat.

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF CRIMEAN-CONGO HAEMORRHAGIC FEVER VIRUS (CCHFV) IN HARD TICKS IN TOKAT AND VICINITY

Neslihan MUTLUAY

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Şaban TEKİN

ABSTRACT

Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF), a zoonotic disease caused by CCHF virüs results in fatal cases in many countries including Turkey. There are very limited number of studies on detection of CCHFV in ticks in Tokat province and vicinity. In the present study, presence of CCHFV in ticks was tested by using real time RT-PCR method. According to results, prevalence of CCHF in ticks was found to be 18 % using real time RT-PCR. The results indicate that CCHFV may efficiently be detected in ticks using real time RT-PCR suggesting that real time RT-PCR is the most sensitive method for the detection of CCHFV in tick samples. The CCHFV was primarily detected in *Hyalomma* and *Rhiphicephalus* species. Results show that ticks of the region have very high potential for the transmission of the CCHF virus to animals and humans and therefore the more effective tick control strategies precautions have to be taken against ticks.

2009, 38 pages

Key Words: CCHF, CCHFV, real time RT-PCR, Ticks, Tokat.

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım sırasında ve halen desteklerinden dolayı saygıdeğer hocam Doç. Dr. Şaban TEKİN'e, yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ahmet BURSALI'ya, her zaman her konuda desteğini benden esirgemeyen sevgili aileme, çalışmamda emeği geçen, öğrenim hayatım boyunca ve her zaman yanımda olan herkese teşekkür ederim. Ayrıca projemize örnek temini konusunda araç ve lojistik desteklerini eksik etmeyen Tokat Valiliği, Tokat Tarım İl Müdürlüğü ve Tokat İl Sağlık Müdürlüğü yetkililerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ ve LİTERATÜR ÖZETİ.....	1
1.1. Tarihçe.....	1
1.2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı'nın Dünya'daki ve Türkiye'deki.....	
Yayılımı.....	2
1.2.1. Dünya'daki Yayılımı ve Salgın Lokasyonları.....	2
1.2.2. Türkiye'deki Yayılımı ve Salgın Lokasyonları.....	5
1.3. Keneler ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü.....	8
1.4. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü.....	11
1.4.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Yapısı ve Özellikleri.....	11
1.4.2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Patojenitesi ve Diğer.....	
Özellikleri.....	13
1.4.3. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Replikasyonu	13
1.4.4. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Doğal Döngüsü ve Temel	
Bulaşma Yolları.....	14
1.4.5. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Genetik Çeşitliliği.....	15
1.5. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Bulaşma Yolları.....	16
1.6. Kırım Kongo Kanamalı Ateşinde Risk Grupları	16
1.7. Kırım Kongo Kanamalı Ateşinden Korunma Yolları.....	17
1.8. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Tanısı.....	18
1.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	18
1.8.1.1. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	19
1.8.1.2. Real Time PCR.....	19
2. MATERYAL VE METOD.....	21
2.1. Materyal.....	21

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler.....	21
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	21
2.1.3. Probe ve Primerlerin Hazırlanışı.....	22
2.2. Metod.....	22
2.2.1. Total RNA Ekstrasyonu.....	22
2.2.2. cDNA Sentezi.....	24
2.2.3. Real Time RT-PCR.....	25
2.2.3.1. Real Time RT-PCR Reaksiyon Koşulları.....	27
2.2.3.2. TaqMan Hidroliz Prob Testi.....	28
3.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4. SONUÇ.....	31
5. KAYNAKÇA.....	32
6. ÖZGEÇMİŞ.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. KKKA hastalığının dünyadaki yayılımı	2
Şekil 1.2. KKKA hastalığının Türkiye’deki yayılımı.....	6
Şekil 1.3. Kenelerin yaşam evreleri.....	10
Şekil 1.4. KKKA virüsünün yapısı.....	12
Şekil 1.5. Bunyaviridae familyasına ait virüslerin replikasyon döngüleri	14
Şekil 1.6. Kenelerin hayat döngüsü.....	15
Şekil 2.1. TaqMan Real Time PCR kuantifikasyonu	28
Şekil 3.1. Çalışmamızdaki Real Time RT-PCR sonucuna ait grafik örneği.....	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Dünyada görülen KKKA vakalarının % mortalite oranları	3
Çizelge 1.2. KKKA hastalığının Türkiye’deki dağılımı ve % mortalite oranları.....	7
Çizelge 1.3. 2007-2008 yılına ait KKKA vakaları ve ölüm sayıları.....	7
Çizelge 1.4. 2008 yılına kadar Türkiye’deki KKKA vakalarının illere göre dağılımı.....	8
Çizelge 1.5. Kenelerin sistematikteki yeri.....	9
Çizelge 1.6. Bunyaviridae ailesine ait virüsler	11
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan Real time PCR dizaynı.....	26
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan Real time PCR koşulları.....	27

1.GİRİŞ VE LİTERATÜR ÖZETİ

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), kenelerle taşınan virüslerden kaynaklanan ve adından da anlaşılabilceği gibi neden olduğu kanamalar ile hayatı tehdit edebilen bir hastalıktır. KKKA, Bunyaviridae ailesinden Nairovirüs türü içinde tanımlanan virüsün etken olduğu, ateşli ve özellikle kanamanın ön planda olduğu bir hastalıktır. Günümüzde Afrika'nın pek çok bölgesinde, Asya'da ve Avrupa'da görülmekte olup, insanlarda %10-50 mortalite ile seyreden zoonoz karakterli bir hastalıktır (Bossi ve ark., 2004; Burt ve Swanepoel, 2005).

1.1. Tarihçe

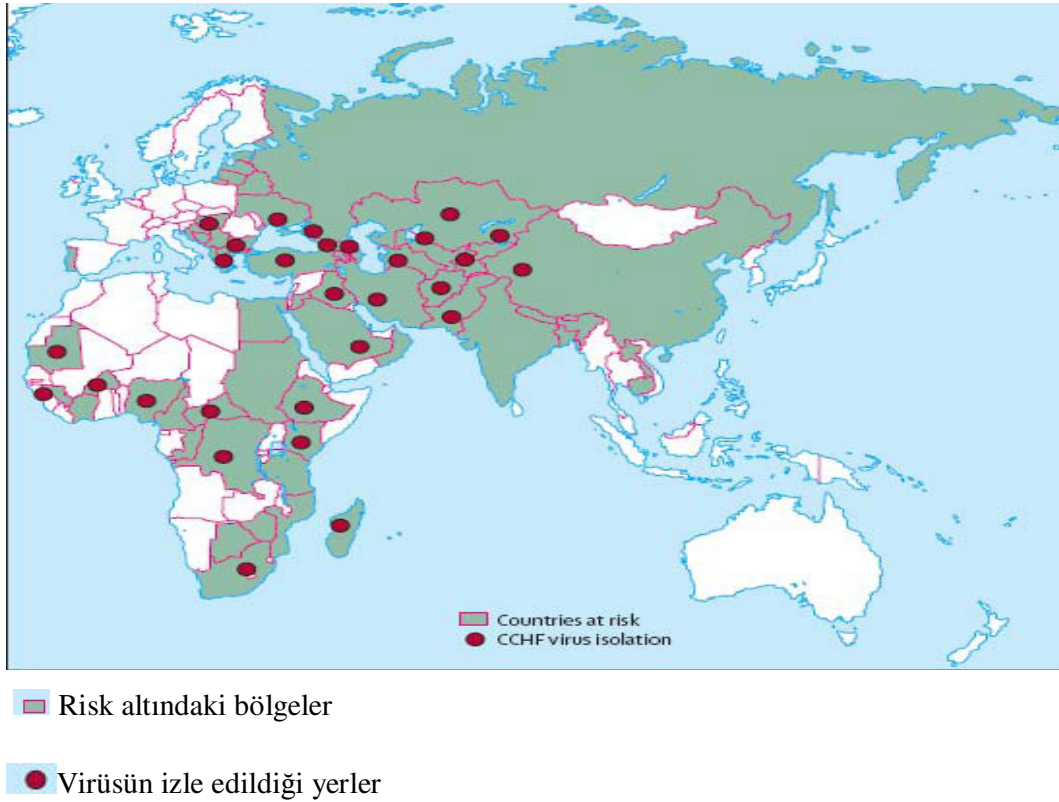
KKKA'nın tarihteki ilk varlığına XII. yüzyılda Tacikistan'da rastlanmıştır. Hastalık başlıca *Hyalomma* cinsi sert kenelerle bulaşan, insanlarda; idrarda, rektumda, dışetlerinde ve kavitede kanamalara yol açan hemorajik bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Ergonul, 2006; Yashina ve ark., 2003; Hoogstraal, 1979).

KKKA ilk kez II. Dünya savaşı yıllarında, 1944 ve 1945 yılı yaz aylarında Batı Kırım steplerinde çoğunlukla ürün toplamaya yardım eden Sovyet askerleri arasında görülmüş ve 200' den fazla kişiyi etkilemiştir. O zamanlar Kırım Hemorajik Ateşi adı verilmiştir (Ergonul, 2006; Chamberlain ve ark., 2005). İlerleyen yıllarda hastalığın Orta Asya Türk Cumhuriyetleri başta olmak üzere eski SSCB ülkelerinde, Yugoslavya ve Bulgaristan'da da görüldüğü anlaşılmıştır. Daha sonra Kongo virüs 1956 yılında Zaire'de ateşli bir hastadan izole edilmiştir. 1967 yılında 5'i laboratuvar kaynaklı 12 KKKA olgusundan virüs yenidoğan farelere enjekte edilerek izole edilmiştir. 1956 yılında izole edilen virüs ile 1967 yılında izole edilen virüsün aynı olduğu gösterilmiştir. 1969 yılında ise Kongo virüs ile Kırım Hemorajik Ateşi virüslerinin aynı virüs olduğu belirlenerek Kırım Kongo Kanamalı Ateşi olarak yeniden adlandırılmıştır (Simpson, 1978; Ergonul, 2006; Bakır ve ark., 2005).

1.2. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Dünyadaki ve Türkiye’deki Yayılımı

1.2.1.Dünyadaki Yayılımı ve Salgın Lokasyonları

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığı, ülkemizin de içinde bulunduğu geniş bir coğrafyada görülmektedir. Hastalık Afrika, Batı Asya, Ortadoğu ve Güney Avrupa’da yaygın olarak görülmektedir. (Hoogstraal, 1979; Swanepoel, 1995). Ayrıca Kazakistan, Özbekistan, Dubai, Makedonya, Yunanistan, Arap Yarımadası, Pakistan, Irak, Afganistan, Kuveyt, Rusya, Yugoslavya, İran, Kosova, Makedonya, Bulgaristan, Çin ve Moritanya’da KKKA salgınları bildirilmiştir (Şekil 1.1)(Çizelge 1.1).



Şekil 1.1 KKKA hastalığının dünyadaki yayılımı (Ergonul, 2006).

Çizelge 1.1. Dünyada görülen KKKA vakalarının % mortalite oranları (Süleiman ve ark., 1980; Altaf ve ark., 1998; Nabeth ve ark., 2004; Anonim, 2007a; van de Wal ve ark., 1985;

Papa ve ark., 2002b; Whitehouse, 2004; Chinikar ve ark., 2006; Ergonul, 2006; Ozkurt ve ark., 2006).

Ülke Adı	Zaman	Olgu Sayısı	Mortalite (%)
Sovyetler Birliği	1944-1945	200 ve üzeri	?
Bulgaristan	1953-1974 1975-1996 1997-2003	1105 279 124	%17 %11 %22
Çin	1965-1994 1997	260 26	54 (%21) 5 (%20)
Afrika	1981 1984-1994	123 48	27 (%22) %24
Pakistan	1994 2002	7 100 ve üzeri	%28.5 En az 2
Kosova	2001	69	6 (%8.6)
Birleşik Arap Emirlikleri	1979-1994 1994-1995	63 35	%15.5 22 (%62)
Suudi Arabistan	1979 1989-1990	5 40	%40 12 (%30)
İran	2000-2006	341	%16.7
Rusya	1999	65	6 (%9)
Irak	1979	10	7 (%70)
Türkiye	2002-2006	1103	59 (%5.4)

1967 Özbekistan, 1976 Bağdat ve 2000 yıllarında Pakistan'da meydana gelen salgınlardan KKKA virüsünün çeşitli suşlarından küçük genomik RNA segmentlerinin tüm dizisi belirlenmiştir (Ahmad, 2000; Hewson ve ark., 2004).

Afrika'da görülen salgınlar deve kuşu kesimleri sırasında gözlenmiştir (Ergonul,2006). 1984'te devekuşu kesiminde yer alan çalışanlar enfekte olmuştur. 1996 yılında deve kuşu

mezbahası çalışanlarında 17 hastalık vakası saptanmıştır. Enfeksiyon nedeninin ya hayvanların kanlarıyla ya da derilerinin yüzülmesi sırasında birebir temas yoluyla enfekte kenelerden bulaştığından şüphelenilmiştir (Whitehouse, 2004). Hemorajik vakaların Afrika'da ilk kez tanınması 1960'lı yıllarda olduktan sonra Kongo'ya ek olarak Burkina, Faso, Tanzania ve Senegal'den de vakalar bildirilmiştir. En çok vaka bildirimi yapılan Afrika Ülkeleri'nden olan Güney Afrika'da 1981 yılına kadar 123 KKHA vakası tanımlanmış, bunlardan 27'si, (%22) mortalite ile seyretmiştir (Simpson ve ark., 1967).

Bulgaristan'da 1960'lı yıllarda 14 sağlık çalışanından %40'ı KKKA nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Oldfield, 1991). Bu ülkede yapılan genetik çalışmalar sonucunda, KKKA virüsü "*Rhipicephalus bursa*" türü kenelerden izole edilmiştir (Papa, 2004).

Birleşik Arap Emirlikleri'nde ilk vaka 1979'da Dubai'de hastanede tespit edilmiştir. Enfeksiyon kaynağı olarak Irak, Kenya ya da Pakistan'dan ithal edilen sığırlar gösterilmiştir. Bununla birlikte ana kaynak belirsizdir. 1993'e kadar yeni bir vaka tespit edilmemiştir. 1994'te mezbaha çalışanlarında salgın görülmüş, 35 şüpheli sağlık kuruluşlarına başvurmuştur. Ölüm oranı %62 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca çiftlik, mezbaha çalışanları ve deri işleme çalışanlarında 28 şüpheli vakadan 16'sında virüs saptanmıştır (Schwarz ve ark., 1996). Suudi Arabistan'da; Dubai'de Kasım 1979'da hastane salgınıyla ortaya çıkan vakalarda, hasta kaydının yapılmasından hemen sonra 5 vakadan 2'sinde ölüm gözlenmiştir (Suleiman ve ark., 1980). Ayrıca Mekke şehri ve dolaylarında 1989-1990 yılları arasında mezbaha çalışanları arasında 40 KKKA olgusu tanımlanmıştır. KKKA virüsünün koyun ithalatı ve enfekte keneler ile bölgeye girdiği düşünülmektedir (El-Azazy, 1997).

Son yıllarda İran'da KKKA vakalarında artma olmuştur. 2000-2006 yılları arasında 873 şüpheliden 341 vakanın KKKA virüsü taşıdığı doğrulanmış ve doğrulanan 341 hastadan 57'si ölmüştür. 2002 yılında ise enfekte olmuş 9 İran'lı hastadan KKKA virüsü izole edilmiş ve genetik olarak incelenmiştir. (Chinikar ve ark., 2004; Mardani ve ark., 2006).

Çin'in Kuzey-Batı'sında 1965 yılında vaka mortalite oranı %80 olan bir salgın tanımlanmış, daha sonra 1965-1994 yılları arasındaki yaklaşık 30 yıllık süre içinde de 260 KKHA bildirimi yapılmıştır, bu vakalardan 54'ünün (%21) ölüm ile sonuçlandığı belirtilmektedir (Papa ve ark., 2002). Kosova'da 2001 yılı ilkbahar ve yaz mevsimi boyunca virüs ortaya çıkmış; 69 vakanın 6'sı ölümle sonuçlanmıştır (Papa ve ark., 2002).

2003'de Moritanya Sağlık Bakanlığı'nın bildirdiği 35 vakanın 18'i laboratuvar sonuçlarıyla doğrulanmış, 6 vakanın öldüğü saptanmıştır. Virüs salgını hastane acil servisinde 5'i hastane çalışanı, 10'u hasta ve ziyaretçi olmak üzere toplam 15 kişide gözlenmiştir (Nabeth ve ark., 2004). Umman'dan 1995-1996 yıllarında 4 vaka, Afganistan'dan 1998 yılı Mart ayı içinde 12'si (%64) mortaliteyle sonuçlanan 19 vaka, Kazakistan'dan 1999 yılında ikisi fetal 10 vaka, Rusya'nın Stavropol bölgesinden 1999 yılında altısı (%9) kaybedilen 65 vaka, Kosova'dan 2001 Haziran ayı içinde 69 vaka (18'inde tanı kesin, altısı kaybedilmiş) bildirimi yapılmıştır (Williams ve ark., 2000; Papa ve ark., 2002; Gear ve ark., 1982; Golovljova, 2004; Al-Tikriti ve ark., 1981; Khan ve ark., 1997). 2006 yılında Rusya'nın Güney Bölgeleri'nde 4'ü kaybedilen 50 vakanın kesin tanısı konulmuştur. Bu vakaların 8'i Stavropol'da, 21'i Kalmykia özerk bölgesinde, 14'ü Rostov bölgesinde, 3'ü Astrakhan bölgesinde ve 4'ü de Volgograd'dan bildirilmiştir (Simpson ve ark., 1967). Bunların yanı sıra daha bir çok ülkede ve ülkemizde KKKA virüsü varlığı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

1.2.2. Türkiye 'deki Yayılımı ve Salgın Lokasyonları

Türkiye'de ilk kez 2002 yılının bahar ve yaz aylarında Tokat başta olmak üzere ülkemizin bazı illerinde görülmüş ve yapılan çalışmalar sonucu hastalığın KKKA olduğu saptanmıştır (Bakır ve ark., 2005; Garcia ve ark., 2006). Bu yılda özellikle Tokat SSK Hastanesi'nde bir hemşirenin ölümünden sonra spekülasyonlar üzerine başlatılan araştırmalar hastalığın tanınmasını sağlamıştır (Karti ve ark., 2004).

Başta Karadeniz ve Orta Anadolu olmak üzere (Şekil 1.2) Sivas, Çorum, Amasya, Yozgat, Gümüşhane, Erzurum, Erzincan, Kastamonu, Bolu, Ankara gibi toplamda yaklaşık 22 ilde vakaların ortaya çıkması ile KKKA hastalığının görüldüğü alanlar daha da genişletilmiştir (Karti ve ark., 2004).



Şekil 1.2. KKKA hastalığının Türkiye’deki yayılımı (Anonim, 2006a)

Yapılan bir çalışmada, KKKA hastalığının, Türkiye’de daha çok Kelkit vadisi ve çevresindeki kırsal alanlarda çiftçilik ve hayvancılıkla uğraşan kesimlerde görüldüğü belirtilmiştir (Karti ve ark., 2004). Özellikle Tokat ve çevresinde, hayvancılığın yoğun olduğu bölgelerde, insanlarda KKKA seroprevalansının %18 civarında olduğu tespit edilmiştir (Tekin ve ark., 2008). 2002-2004 yılları arasında Türkiye’deki KKKA hastalığı mortalitesinin %1-13 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Çizelge 1.2) (Ozkurt ve ark., 2006). Sağlık bakanlığı verilerine göre ülkemizde 2002-2006 yılları arasında laboratuvar tanısı doğrulanmış toplam 907 vaka bildirilmiş ve bunların 36’sı ölümle sonuçlanmıştır (Anonim,2007a). 2007 yılında sağlık bakanlığı verilerine göre laboratuvar tanısı konulmuş 432 KKKA vakasının 25’i hayatını kaybetmiştir. 2008 yılında ise 28 kişi hayatını kaybetmiştir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.2. KKKA hastalığının Türkiye’deki dağılımı ve % mortalite oranları (Ozkurt ve ark., 2006; Anonim, 2007a)

Ülke adı	Bölge	Zaman	Olgu sayısı	Mortalite (%)
Türkiye	İç Anadolu Karadeniz	2002-2003	35	1 (%2.8)
Türkiye	Doğu-Karadeniz	2002-2003	19	2 (%10)
Türkiye	İç Anadolu Karadeniz	2003	92	11 (%12)
Türkiye	Türkiye geneli	2004	249	13 (%5.2)
		2005	266	13 (%5)
		2006	438	27(%6.1)

Çizelge 1.3. 2007-2008 yılına ait KKKA vakaları ve ölüm sayıları

Ülke	Zaman	Olgu Sayısı	Ölüm Sayısı
Türkiye	2002-2003	150	6
	2004	249	13
	2005	266	13
	2006	438	27
	2007	432	25
	2008	285	28

Bugüne kadar belirlenen KKKA vakalarının Türkiye’de en çok Tokat ilinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. 2008 yılına kadar Türkiye’deki KKKA vakalarının illere göre dağılımı

Türkiye’deki İller	Vaka Sayıları
Tokat	327
Sivas	129
Yozgat	133
Çorum	107
Erzurum	65
Gümüşhane	62
Amasya	36
Çankırı	31
Kastamonu	22
Ankara	23

Yapılan çalışmalar sonucu vakaların %90’ını kene ısırığına maruz kalan, tarım ve hayvancılıkla uğraşan kişilerin oluşturduğu saptanmıştır. Hastalıktan ikinci sırada etkilenen grubu ise sağlık çalışanlarının oluşturduğu belirlenmiştir (Ergonul, 2006). Özellikle 2007 yılında 2 hemşire hayatını kaybederken, 2008 yılında ise Ankara’da 4, Diyarbakır’da 4 olmak üzere 8 sağlık çalışanı KKKA hastalığından hayatını kaybetmiştir. 2002’den bu yana Türkiye’de KKKA hastalığından 116 kişi hayatını kaybetmiştir.

1.3. Keneler ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü

Keneler kanla beslenen ve hastalık ajanlarını hayvan ve insanlara taşıyan en önemli Artropod vektörlerdendir. *Argasidae* (yumuşak keneler) ve *Ixodidae* (sert keneler) olmak üzere iki aile içerisinde incelenmektedir (Çizelge 5). Dünyada tanımlanmış yaklaşık 900 kene türünden,6 familyaya ait en 30 tür kene Türkiye’de bulunmakta ve bunlar KKKA virüsünün taşınmasına vektörlük etmektedir (Horak ve ark.,2002;

Anderson ve ark.,2005).Ülkemizde kenelerin sistematik bakımından incelenmesine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır (Ozkan, 1978).

Çizelge 5. Kenelerin sistematikteki yeri (Anonim, 2007b).

Phylum	Arthropoda
Classis	Arachnida
Ordo	Acarina
Family	<i>Argasidae</i> (yumuşak keneler) <i>Ixodidae</i> (sert keneler)
Genus	<i>Ixodes</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Amblyomma</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Boophilus</i> , <i>Rhipicephalus</i>

Amblyomma türleri dışında birçok kene türü KKKA virüsüne vektörlük etmektedir. Özellikle *Hyalomma* cinsi keneler Türkiye’nin de içinde bulunduğu coğrafyada çok yaygın olarak bulunmakta ve KKKA virüsü taşıyan temel kene cinsini temsil etmektedir (Karaer, 1997).

Keneler dünyanın bütün kara parçalarında bulunan ve karada yaşayan eklembacaklıların en kalabalık grubunu oluşturan canlılardır. Yaşamları süresince değişik canlılar üzerinde (küçük kemirgenler, kuşlar, sürüngenler, çiftlik hayvanları veya büyük yabani memeli hayvanlar ve insanlar) zorunlu ektoparazit olarak bulunurlar (Watts ve ark., 1988). Dişi ve erkek keneler kan emme sırasında konak üzerinde çiftleşir ve dişi keneler yumurtalarını bitki, toprak, taş veya mera gibi ortamlara birbirine yapışık şekilde bütün olarak bırakırlar (Şekil 1.3) (Balashov, 2005; Barker ve ark., 2004).

Keneler, yumurta döneminden sonra larva-nimf dönemlerine geçerek ergin olurlar (Şekil 1.3). Yumurtadan çıkan larvalar, gelişimlerini tamamlamak amacıyla konak ararlar. Buldukları ilk konukçu genellikle rodentlerdir (Barker, 1999).



Şekil 1.3. Kenelerin yaşam evreleri.

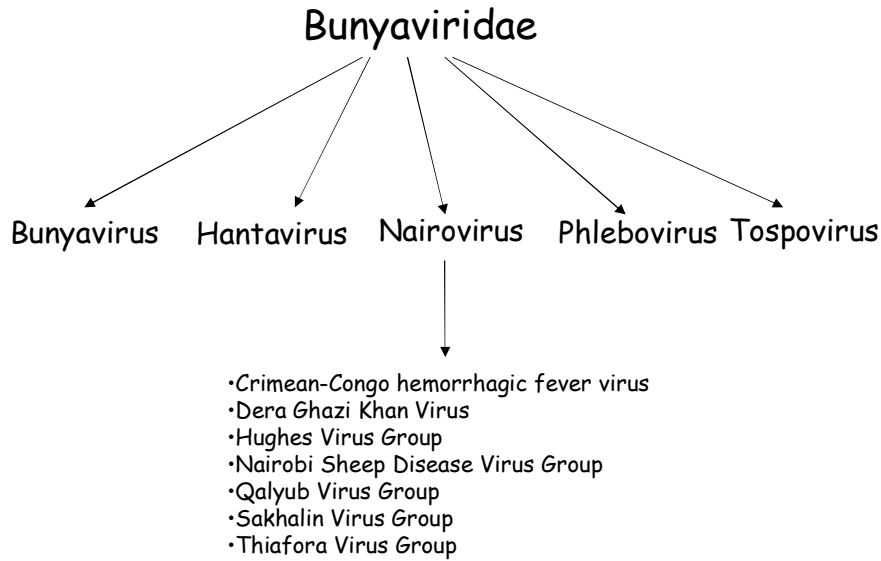
Konaktan beslenmesini tamamlayan larvalar, konaktan ayrılarak kendilerini tekrar toprağa bırakırlar ve nimf haline dönüşürler. Nimfler de yeni bir ikinci konak (evcil ve yabani hayvan, insan) aramaya başlarlar ve kan emdikten sonra ergin forma dönüşürler (Aiello ve ark., 2004). Dişi ergin keneler, kendilerine tekrardan konak bulurlar, kan emip çiftleşirler ve doyduktan sonra da konağı terk ederek toprağa geçerler. Toprağın uygun bir yerinde yumurtalarını bırakır ve ölürler. Keneler yaşam döngülerini bu şekilde devam ettirirler (Watts ve ark., 1988; Vredevoe, 1997; Dohm ve ark., 1996; Faye ve ark., 1999). Keneler KKKA virüsünün asıl rezervuarıdır. Virüs kenenin bütün organlarında çoğalır ve kenenin yaşamı boyunca infektivitesini korur (Ergonul, 2006).

1.4. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü

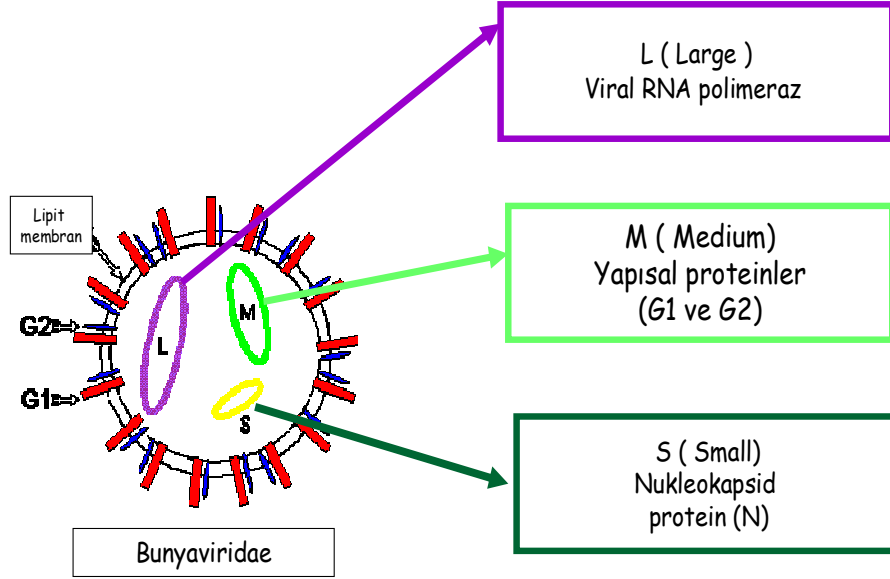
1.4.1.KKKA Virüsü'nün Yapısı ve Özellikleri

KKKA virüsü Bunyaviridae ailesinden Nairovirüs türü içinde yer alan bir virüstür (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. Bunyaviridae ailesine ait virüsler (Whitehouse, 2004)



Bunyaviridae ailesine mensup RNA virüsleri 3 segmentli ve negatif poleriteli genoma sahip olup zarflı ve tek iplikçikli RNA parçacığından oluştuğu belirlenmiştir. Virüsün tamamı yaklaşık 100 nanometre çapında ve sferik görünümündedir (Şekil 1.4). Bu virüsler, lipit ve deterjanlara dayanıksız olup hızla inaktive olabilmektedir. Konak haricinde ve ultraviyole ışınlarına maruz bırakıldıklarında ise ölürler. 56°C’de ve 30 dakikada inaktive olan bu virüsler, 40°C’de kanda 10 gün yaşayabilmektedirler (Lerx ve ark., 1985).



Şekil
1.4.

KKKA virüsünün yapısı (Whitehouse, 2004)

Bu kategori içerisinde yer alan Nairovirüs'lerin moleküler analizler sonucu negatif iplikli, tek zincirli üç RNA segmenti içerdiği gösterilmiştir. Bu segmentler L, M ve S segmentleridir. Large (L) segmenti $4.1-4.9 \times 10^6$, medium (M) segmenti $1.5-1.9 \times 10^6$, small (S) segmenti ise $0.6-0.7 \times 10^6$ moleküler ağırlık içermektedir. S segmenti viral nükleokapsit proteinini, L segmenti RNA bağımlı viral RNA polimerazı, M segmenti ise G₁ ve G₂ olarak adlandırılan yapısal glikoproteinlerini kodlamaktadır (Bishop, 1996).

Yapılan sistematik çalışmaları sonucu Nairovirüs'lerin 34 türü bulunduğu ve bunlardan sadece 3 türün insanlarda duyarlı hücreler üzerindeki alıcılara tutunarak hücre içine alınması sonucu hastalığa yol açtığı saptanmıştır (Bossi ve ark., 2004). Nairovirüsler genetik yapısındaki farklılıklara göre 7 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; KKKA virüsü, Dera Ghazi Khan virüsü, Hughes virüs grubu, Nairobi Sheep Disease (NSD) virüs grubu, Qalyup virüs grubu, Sakhalin virüs grubu ve Thaifora virüs grubu'dur (Clerx ve ark., 1981). Türkiye'de elde edilen KKKA virüslerinin Rus ve Balkan virüs gruplarına %99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Ergonul, 2006).

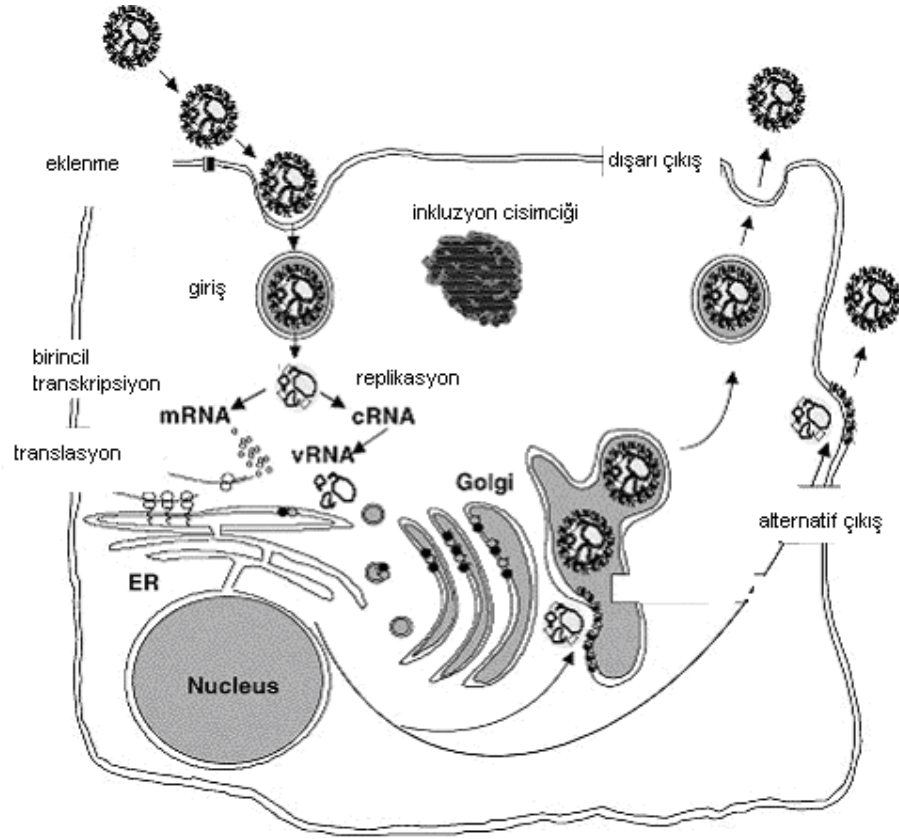
1.4.2.KKKA Virüsünün Patojenitesi ve Diğer Özellikleri

KKKA virüsü Nairovirüsler içinde en patojen olan virüstür. İnsanlarda enfeksiyon sonrası yaygın olarak görülmektedir. Virüs glikoproteini kene, omurgalı konakçı seçiminde ve insanlardaki yüksek patojeniteden sorumludur. Viral glikoproteinlerin önemli bir bölümü, hücre içi proteazlarla; küçük bir bölümü de salınan proteazlarla daha küçük parçalara yıklmaktadır. Viral glikoprotein ve hücrel proteazların etkileşiminin, konakçı seçimi ve patojenitede rol aldığı düşünülmektedir. Virüs temel olarak mononükleer fagositleri, endoteli ve karaciğeri enfekte ederek ağır hemorajiyle seyreden yüksek ateşe neden olmaktadır. Histopatolojik incelemeler ile; karaciğerde hemoraji nekroz., akciğerde hemoraji, dalakta lenfosit tüketimi, birçok organda hemoraji ve hücrel nekroz olduğu gösterilmiştir.

KKKA virüsü, virülansının çok yüksek olmasına rağmen dış ortamda nispeten dayanıklılığını yitirmektedir. Konak dışında varlığını sürdürmesi uzun sürmemektedir. Ultraviyole ışın ile hızla öldüğü saptanmıştır. Ortam pH'ına duyarlıdır; düşük pH'da hızla inaktif olur (Drosten ve ark.,2003; Kara, 2006).

1.4.3.KKKA Virüsünün Replikasyonu

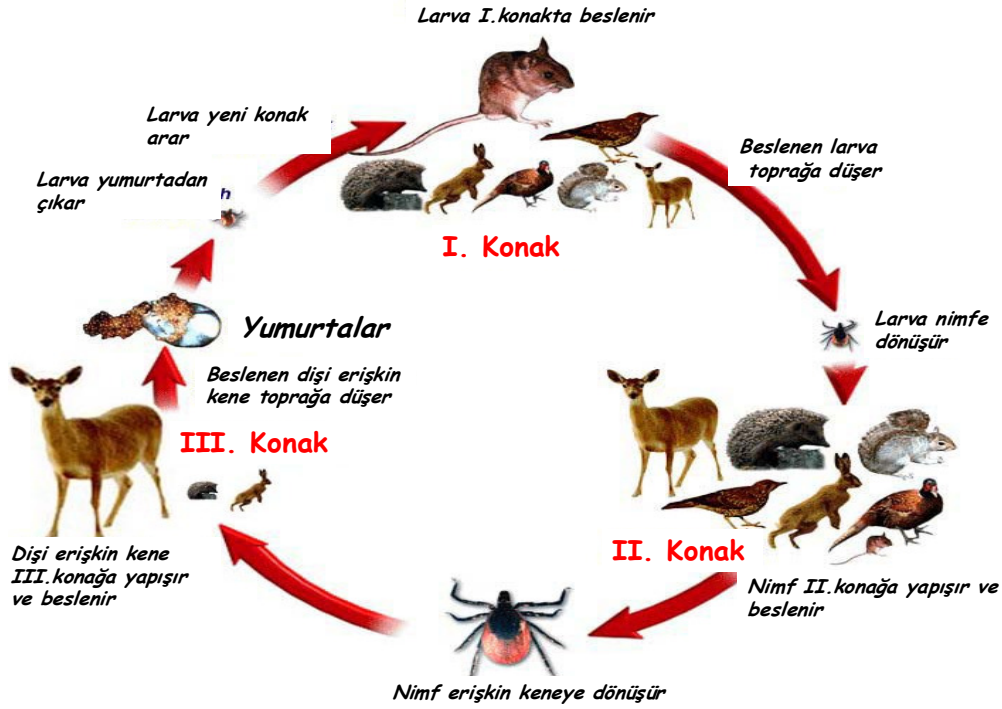
Viral glikoproteinlerin, duyarlı hücrelerdeki reseptör bölgelerini tanımaktan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Duyarlı hücrelerdeki reseptörlere bağlanan virüsler, endositoz yoluyla hücre içine alınırlar ve virüs çoğalması stoplazma içerisinde meydana gelir. Olgunlaşmış virüsler (virionlar) tomurcuklanarak endoplazmik retikulumdan ayrılırlar ve golgi bölgesinde stoplazmik veziküller içine alınırlar. Buradan da füzyon işlemi ile virüs en dıştaki zarını da alarak hücre dışına çıkar (Şekil 1.5) (Donets ve ark., 1977; Whitehouse, 2004; Schmaljohn ve ark., 2001; Ellis ve ark., 1981).



Şekil 1.5. Bunyaviridae familyasına ait virüslerin replikasyon döngüleri (Whitehouse, 2004)

1.4.4.KKKA Virüsünün Doğal döngüsü ve Temel Bulaşma Yolları

Virüsün ortaya çıkması mevsimsel özelliklere bağlıdır. Hastalık etmeninin döngüsü yabani hayvan-kene arasında geçmektedir. Ekolojik dengenin bozulduğu ve baskın türlerin ortaya çıktığı durumlarda odakların genişlediği tespit edilmiştir. Keneler hayvanların aksine rezervuardır (Anonim, 2007c). Virüs; kenelerin enfekte hayvanı emmesi sonucunda keneye geçer, kenelerin tüm hayat döngüsü sırasında taşınır ve bulunduğu konakları enfekte eder (Şekil 1.6). Kene türünün konak sayısının fazlalığı virüsün diğer canlı gruplarına ve insanlara bulaşma ihtimalini arttıran faktörlerden biridir (Ergonul, 2006).



Şekil 1.6. Kenelerin hayat döngüsü (Anonim, 2007c)

1.4.5.KKKA Virüsünün Genetik Çeşitliliği

Nairovirus içinde yer alan KKKA virüsü Artropodlardaki diğer RNA virüslerinden daha fazla genetik çeşitliliğe sahiptir. Protein işlevleri bakımından önemli bölgeler korunmuş olmasına rağmen L, M ve S segmentlerinin nükleotid ve aminoasit kısımlarındaki değişiklik oranları sırasıyla %22, %31, %20 ile %10, %27, %8 şeklindedir.

KKKA virüsünün taşınmasında ve yayılmasında rol alan rezervuarlar domuz, fare, tavşan gibi küçük yabani kemirgen hayvanlar iken, virüsün başlıca vektörü kenelerdir.

KKKA virüsü, kenelerde uzun süre kalabilmekte ve bundan dolayı kenelerin birden fazla kökeni barındırma olasılığı genetik çeşitliliği kolaylaştıran bir durum haline gelebilmektedir (Hewson, 2007).

1.5. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Bulaşma Yolları

KKKA virüsü insanlara başlıca *Hyalomma* cinsi sert kenelerin ısırmasıyla bulaşmaktadır (Watts ve ark., 1988). Hastalık en çok *Hyalomma* cinsi kenelerle bulaşsa da sadece bu cinsle sınırlı değildir. *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Ixodes* cinsi sert kenelerin ve bazı yumuşak kenelerin de bu virüsü taşıdığı gösterilmiştir (Morikawa ve ark., 2002). Keneler beslenme esnasında enfekte hayvanlardan kan emerken virüsleri alırlar, gelişme dönemlerinde vücutlarında bulunan virüsü herhangi başka bir hayvana ya da insana kan emme sırasında salgıladıkları salgı ve dışkıları ile bulaştırırlar (Le Due, 1989). Hastalık hayvanlarda belirtisiz seyrederken insanlarda oldukça öldürücü olabilmektedir.

KKKA hastalığı kene ısırmasının yanı sıra, vücudunda virüs bulunan hayvanların kanlarına, vücut sıvılarına veya diğer dokularına temas etmekle bulaşabildiği gibi bu hastalığa yakalanmış insanların sekresyon, kan ve doku sıvılarıyla temas sonucunda da virüs bulaşabilmekte ve bu şekilde insandan insana geçebilmektedir (Elaldı, 2004). Bu durumun çeşitli semptomlar içerdiği ve yüksek mortaliteye sahip olduğu belirlenmiştir (Flick ve ark., 2005). En ciddi enfeksiyon riskinin burun, ağız, dışeti, vajina ve enfeksiyon alanları olduğu belirlenmiştir (Drosten ve ark., 2003). Bunların yanı sıra hastalığın anneden çocuğa da geçtiği bildirilmiştir (Saijo ve ark., 2004). Omurgasızlar arasında virüsün yalnızca kenelerde olduğu belirlenmiştir (Watts ve ark., 1988). Virüsün keneden keneye geçişi ise trans-ovariol (dışiden - yumurtaya) veya trans-stadial (larvadan nimfe, nimfden erişkine) şekilde gerçekleşmektedir (Whitehouse, 2004).

1.6. Kırım Kongo Kanamalı Ateşinde Risk Grupları

Kene ile ilgili öyküsü olan (kene ısırığı, temas gibi) kişiler risk gruplarını başında yer almaktadır. Hayvan kesimi yapan mezbaha işçileri, veterinerler, hasta hayvanla teması olanlar, tarım çalışanları ve hayvancılıkla uğraşan kişiler hastalık riski taşımaktadır (Swanepoel ve ark., 1985; El-Azazy ve ark., 1997; Dunster ve ark., 2002, Tekin et al. 2008). Bunların yanı sıra, kasaplar, endemik bölgelerde görev yapan sağlık personeli, hasta hayvan ile teması olanlar, askerler, kamp yapanlar ve deri fabrikası çalışanları da yüksek oranda risk altındadırlar (Bakir ve ark., 2005, Tekin et al. 2008).

1.7. Kırım Kongo Kanamalı Ateşinden Korunma Yolları

Kene ile mücadele birinci basamağı oluşturmaktadır. Keneler yumurta dönemleri hariç diğer biyolojik evrelerinde insanlara saldırarak kan emebilir. Genel olarak da konakçı spesifitesi göstermezler. Coğrafik bölgelere göre ve türlere göre değişmekle beraber,

KKHA'yı bulaştıran *Hyalomma* soyuna ait keneler genel olarak Nisan ve Eylül ayları arasında aktiftirler; bu dönemlerdeki salgınların sebebi de budur. Bu nedenle öncelikle konakçılar kenelerden uzak tutulmalı ve kenelerin kan emmeleri engellenmelidir.

Mümkün olduğu kadar kenelerin bulunduğu alanlardan (hayvan barınakları, piknik amaçlı gidilen su kenarı, otlak şeklindeki yerler, çalı çırpı ve gür ot bulunan yerler, av alanları, orman vb.) kaçınılması gerekmektedir. Eğer bu tür ortamlarda bulunuluyorsa çıplak ayakla veya kısa giysiler giyilmemelidir (lastik çizme giyilmeli veya pantolonların paçaları çorap içine alınmalı), boyuna mendil veya eşarp sarılmalıdır, vücut belirli aralıklarla kene yönünden aranmalı; vücuda yapışmamış olanlar dikkatlice toplanmalı, yapışan keneler ise ezilmeden ve kenenin ağız kısmı koparılmadan (bir pensle sağa sola oynatarak, çivi çıkarır gibi) alınmalıdır.

Hayvancılıkla uğraşanlar hayvanlarını kenelere karşı uygun akarisitlerle ilâçlamalı ve hayvan barınakları kenelerin yaşayamayacağı şekilde yapılmalı, çatlaklar tamir edilmeli ve badana yapılmalıdır. Gerek insanları gerekse hayvanları kene saldırılarından korumak için “repellent” olarak bilinen böcek kaçıranlar cilde sürülerek veya elbiselere emdirilerek kullanılabilir. Aynı maddeler hayvanların baş veya bacaklarına uygulanabilir; ayrıca, bu maddelerin emdirildiği plâstik şeritler, hayvanların kulaklarına veya boynuzlarına takılabilir (Vassilenko ve ark., 1990).

Mera, çayır, çırpı ve gür otların bulunduğu yerler gibi kenelerin yaşamasına müsait alanlarda, diğer canlılara ve çevreye zarar vermeyen insektisit uygulamalarına başvurulabilir.

1.8. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Tanısı

KKKA gibi bir çok virüsün kenelerdeki varlığı değişik yöntemlerle belirlenebilir. Bunlar arasında serolojik olarak ELİSA yöntemi, ve moleküler teknikler olarak da PCR çeşitlerinden

kantitatif RT-PCR yöntemi ve REAL TIME PCR tekniği başta gelmektedir. Bu tekniklerden özellikle ELİSA yöntemi serolojik olması ve hassasiyetinin moleküler metodlara göre çok düşük olması nedeniyle daha kenelerde virüs tespitinde çok sınırlı olarak kullanılmaktadır. KKKA virüs enfeksiyonunun erken teşhisi için, PCR çeşitlerinden en çok tercih edilen RT-PCR yöntemi ise çok gelişmiş ve yaygın olarak kullanılan, yüksek derecede özgün, duyarlı ve hızlı bir teknik olmasına rağmen, duyarlılık seviyesi REAL TIME PCR'a göre daha düşüktür daha çok kalitatif olarak kullanılır. REAL TIME PCR ise RT-PCR'a göre çok hassas ve hem kalitatif hem de kantitatif olarak kullanılabilen, daha özgün ve duyarlı bir moleküler teknik olup özellikle virüs tespitinde dünyada çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Yeni geliştirilmiş olan REAL TIME PCR pahalı bir teknik olmasına rağmen yüksek duyarlılığa sahip olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir.

1.8.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, laboratuvar ortamında spesifik DNA dizilerinin; primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir. PCR, çok az sayıdaki DNA'nın 1-5 saat içerisinde çoğaltılmasını sağlamaktadır. Standart bir PCR protokolü yoktur. Bileşenler çoğaltılacak DNA bölgesinin özelliklerine göre değişir.

KKKA virüsünün moleküler tanısında PCR çeşitlerinden kalitatif RT-PCR ve çok gelişmiş bir teknik olan REAL TIME RT-PCR tekniği başta gelmektedir.

1.8.1.1.Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RNA PCR olarak da bilinen RT-PCR iki aşamalı olup PCR' dan önce RNA'nın ters transkriptaz (revers transkriptaz) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA) ya çevrilmesi, cDNA'dan da standart PCR yoluyla DNA'nın çoğaltılması esasına dayanır. RT-PCR işlemi tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleşebilir. *T.thermophilus* DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar mangan varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapılabilir (Mullis, 1990; Bardakcı ve ark., 2007). RT-PCR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesinde ve RNA düzeyinde gen anlatımında oldukça duyarlı bir yöntemdir.

1.8.1.2.Real Time PCR

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real Time RT-PCR, gerçek zamanlı reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu olup spesifik primer seti ve floresans problemlerin veya çift zincirli DNA ya spesifik floresans boyaların kullanımına dayanan bir yöntemdir. Real Time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.

Real time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, floresan boyalarla işaretlenmiş ve diziye spesifik problemlardan veya çift zincirli DNA ya spesifik floresans boyalardan (SBYR) yararlanılmaktadır. Real time PCR, reaksiyon esnasında her bir PCR döngüsünde sentezlenen ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp, reaksiyonda aşama aşama sonuna kadar oluşan tüm ürünü kontrol eden ve PCR'ı oluşurken izlemeye ve miktar belirlemeye imkan veren bir yöntemdir.

RT-PCR'da PCR sonundaki ürünler (amplikonlar) saptanır; analiz edilirken, Real Time PCR'da PCR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeye alınır. Real time PCR; pahalı bir teknik olmasına rağmen, duyarlılığı, verimliliği, özgüllüğü, tekrarlanabilirliği yüksek, hızlı ve kontaminasyon riskinin son derece az olması özellikleriyle diğer yöntemlere göre daha etkili ve güvenilir olduğu düşünülmektedir.

Bu nedenle çalışmamızda Tokat ve çevresinde kenelerde KKKA virüsü teşhisi ve prevalansı REAL TIME RT-PCR yöntemiyle belirlenmiş ve aynı zamanda sonuçlar klasik RT-PCR ile karşılaştırılmıştır.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmamız için Tokat ve çevresindeki yapılan arazi çalışmalarıyla hayvanlardan (çoğunlukla sığır olmak üzere, koyun, keçi, köpek, domuz, kaplumbağa, kirpi) ve insanlardan yaklaşık 5000 sert kene toplanmıştır. Kenelerin bir kısmı RNA Later solüsyonu ilave edilerek -80°C’de saklanmıştır. Toplanan kenelerden -80°C’de muhafaza edilen 700 adedi rastgele KKHA varlığını test etmek üzere 10’arlı gruplara ayrılmış ve KKKA virüsü varlığının tespitinde kullanılmak üzere viral RNA izolasyonu yapılarına kadar -80°C’de saklanmıştır.

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

RNA water, Etanol, Sıvı azot, Viral RNA izolasyon kiti (Qiagen, Roche), cDNA kiti (Roche, Fermentas), LightCycler Taqman Master (Roche), Problar (5’- FAM-ACASRATCTAYATgCAYCCTgC--TMR), Primerler (CCReal P1=5’-TCTTYgCHgATgAYTCHTTYC-3’, CCReal P2= 5’-gggATKgTYCCRAAgCA-3’), dH₂O, DEPC Water, Erlen, Beher, Cam Şişeler (100 ml, 500 ml, 1000 ml’ lik), Mezür, Bistüri, Forcep, Enjektör, Petri kapları (Isolab), Pipet uçları (Corning, Neptune, Eppendorf), Mikrosantrifüj ve PCR tüpleri (Axygen) ile diğer laboratuvar malzemeleri kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

LightCycler 1.5 (Roche) Real Time PCR cihazı, Thermal cycler (Peqlab), Santrifüjler (Eppendorf, Hettich), Güç kaynağı (Consort), Otomatik pipetler (Eppendorf, Brand), Manyetik karıştırıcılar, Vorteks (Ika), Buz makinesi (Scotsman), Otoklav (Hiclave), Etüv (Memmert), Mikrodalga fırın (Arçelik), 4, -20 ve -80 °C’deki buzdolapları (Uğur, Arçelik, U410 premium), Fotoğraf makinesi (Sony) ve Saf su cihazları (Mes mp minipure, Millipore) kullanıldı.

2.1.3. Probe ve Primerlerin Hazırlanışı

Primerler prosedürde belirtilen miktarda pcr grade su eklenerek (P1,P2 = 650 µl) 20 µM olacak şekilde, probalar ise prosedüre göre 20 µM olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra primerler 5 µM, probalar 1 µM olacak şekilde elde seyreltilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. Total RNA Ekstrasyonu

Kenelerden total RNA izolasyonu yapmadan önce rastgele 10'arlı gruplar halinde ayrılan 700 adet kenenin her birinden aşağıda açıklanan yöntemlerle viral RNA izole edildi. Daha sonra her 10'arlı grup için numune başına 10'ar mikrolitre RNA alınarak toplam 100 mikrolitre hacimde 70 adet kene RNA karışımı hazırlandı. Bu numuneler REAL TIME RT-PCR yöntemiyle test edilmek üzere -80°C' de saklandı.

Kenelerden total RNA ekstrasyonu için Qiagen'nin 'QIAamp Viral RNA izolasyon' kiti ve Roche'un 'High Pure Viral RNA' kiti kullanıldı. Viral RNA ekstrasyonu kit üreticilerinin prosedürüne göre yapıldı.

-80 °C'den çıkarılan keneler sıvı azot içerisine alınır. Steril bir bistüri yardımı ile ortadan ikiye kesilen kenenin bütün dokuları (sadece dış iskeleti kalacak şekilde) forcep yardımıyla mikrosantrifüj tüplerine alınır. Dokular, 500 µl RNase free ddH₂O ile sulandırıldıktan sonra 20cc'lik iğneden geçirilerek homojenize edilir. Oluşan homojenat 14 000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek, süpernatant kısmı alınır ve her iki kit kullanılarak aşağıdaki şekilde total RNA izole edilir.

-RNA ekstrasyonu (QIAamp Viral RNA izolasyon kitine göre)

1. Carrier RNA içerisine 310 µl AWE Buffer (% 0.04 Sodyum azid) eklenerek solüsyon hazır hale getirildi.

2. 56 µl carrier RNA, 5600 µl AWL Buffer (Guanidin tiosiyanat)içerisine karıştırıldı (10 numune için).

3. 560 µl hazırlanan karışımdan, 560 µl de etanolden alınarak her biri eppendorf tüplerine eklendi.

4. Hazırlanan karışımın üzerine ise dokunun süpernatant kısmından 280µl ilave edilerek vortekslendi.

5. Filtreli kolonlara, 630 µl hazırlanan karışımdan ilave edildi.

6. 8 000 rpm’de 1 dk santifüj edilip, collection kısımları atıldı ve yerine yenisi yerleştirildi. Karışım bitene kadar bu işleme devam edildi.

7. Sonrasında her bir tüpe, 500 µl AW1 Buffer (Guanidin hidroklorid) eklendi.

8. 14 000 rpm’de 3 dk. santrifüj edilip, collection tüpleri atılarak yeni tüpler yerleştirildi.

9. Daha sonra 500 µl AW2 Buffer (Sodyum azid) eklendi.

10. 14 000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilip, collection tüpleri atılarak yeni tüpler yerleştirildi.

11. Sonrasında 1 dk. kadar tekrar santrifüj yapıldıktan sonra collection tüpleri atıldı ve yerine eppendorf tüpleri yerleştirildi.

12. Filtreli kısma 60 µl Elution Buffer ilave edilip 14 000 rpm’de 1 dk. santrifüj edildi.

13. Son basamakta ise, filtreli kolonlar atılarak eppendorf tüplerinde kalan ekstraksiyon ürünleri etiketlenerek -20 °C'ye kaldırıldı.

Rastgele olarak 10'arlı gruplar halinde ayrılan 700 adet kenenin her birinden yukarıda açıklanan yöntemlerle viral RNA izole edildi. Daha sonra her 10'arlı grup için numune başına 10'ar µl RNA alınarak toplam 100 µl hacimde 70 adet kene RNA karışımı hazırlandı. Bu numuneler REAL TIME RT-PCR yöntemiyle test edilmek üzere -80°C'e kaldırıldı.

2.2.2. cDNA Sentezi

Bu çalışmada kullanılan Real Time RT-PCR çalışması cDNA sentez ve Real Time PCR olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Çok sayıda kene örneğini tek tek çalışmanın zaman alması ve daha ekonomik olması nedeniyle hazırlanan 70 kene RNA karışımının her birinden kullanılarak 70 cDNA örneği sentezlendi. cDNA sentezi için Roche ve Fermentas olmak üzere iki ayrı kit kullanıldı.

-cDNA sentezi (Roche kitine göre)

1. Aşama da 9,4 µl Template RNA ve 2 µl Random hexamer primer karışımı -65 °C ' de 10 dakika thermal cyclerda inkübe edilir.
2. Aşamada her tüpe 8.6 µl lik enzim ve reaksiyon tamponu karışımı eklenerek toplam hacim 20 µl ye tamamlanır ve tüpler 45 °C'de 30 dakika, ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlanır.

Çalışmada 70 adet karışım ekstratına ait numunelerin cDNA sentezi bu yöntemlerle gerçekleştirilerek REAL TIME RT-PCR'da test edilmek üzere -80°C de saklanmıştır.

2.2.3. Real Time RT-PCR

Çalışmada 70 RNA karışımından sentezlenen cDNA örnekleri, bir pozitif bir de negatif kontrol kullanılarak Real Time PCR ile çalışılmıştır. Çalışmamızda KKHA için spesifik primer seti, FAM (5')-TAMRA (3') işaretli spesifik probe ve Taqman master (Roche, Germany) karışımı kullanılmıştır.

Her bir PCR reaksiyonunda kullanılacak maddelerin final konsantrasyonu ve stok miktarı üretici firma tavsiyesine göre seçilmiş, test edilmiş ve en uygun şartlar belirlenmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan Real time PCR dizaynı.

	Final konsantrasyon	Stok	1 x volume	nx volume
dH ₂ O			5 µl	n x 5 µl
Forward primer	0,5 µM	5 µM	2 µl	n x 2 µl
Reverse primer	0,5 µM	5 µM	2 µl	n x 2 µl
Probe fc	0,1 µM	1 µM	2 µl	n x 2 µl
Master mix	1X	5X	4 µl	n x 4 µl
Toplam			15 µl	
Template			5 µl	
Toplam			20 µl	

Her test sırasında daha önceden pozitif olduğu bilinen bir pozitif kontrol cDNA, negatif kontrol olarak da su (ddH₂O) kullanılmıştır. Reaksiyonlar 20 µl hacimde olup testler LightCycler1.5 Real Time PCR (Roche) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.1. Real Time RT-PCR Reaksiyon Koşulları

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan Real time PCR koşulları.

Program adı: Denatürasyon

Cycles : 1 Analysis Mode None

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None

Program adı: Amplifikasyon

Cycles :45-50

95	00:00:10	20	0	0	0	None
48	00:00:40	20	0	0	0	None
72	00:00:01	20	0	0	0	Single

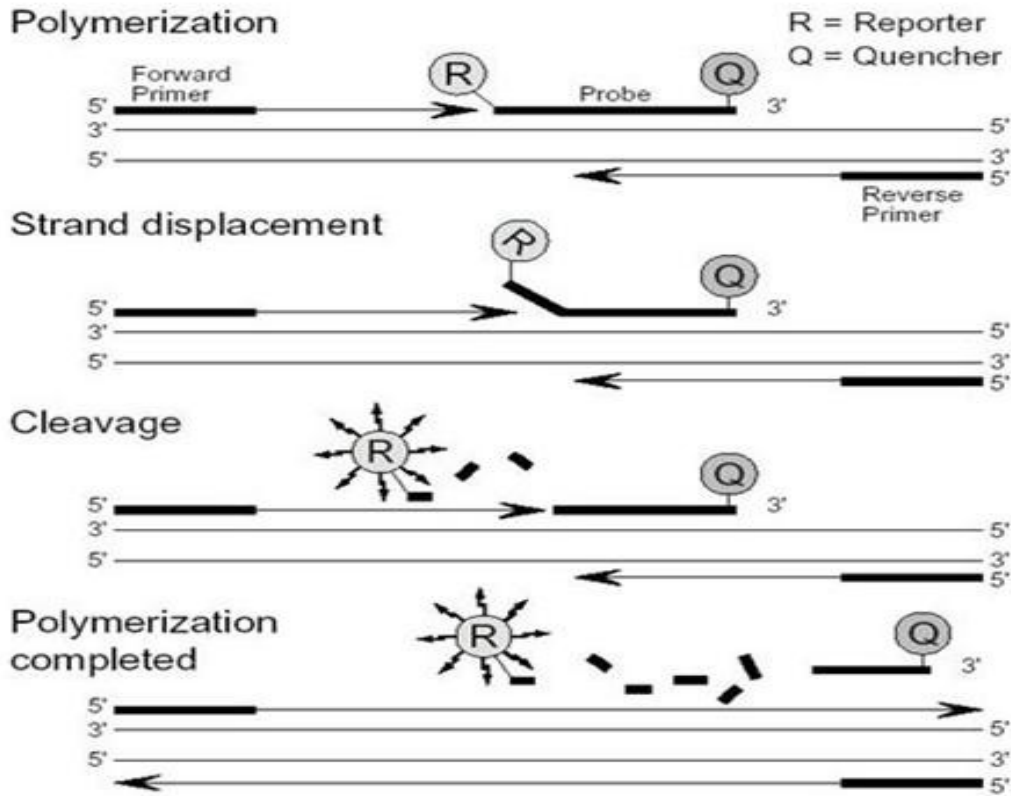
Program adı: Cooling

Cycles :1

40	00:00:30	20	0	0	0	None
----	----------	----	---	---	---	------

2.2.3.2. TaqMan Hidroliz Prob Testi (Taqman®assays - 5' Nuclease Assays)

TaqMan testleri (TaqMan®assays) olarak da bilinen hidroliz prob testlerinde, iki floresan etiket ihtiva eden tek bir prob kullanılmaktadır (Şekil 2.1). Probun 5' ucunda bir floresan reporter boya (örneğin; 6-FAM), 3' ucunda ise a floresan baskılayıcı (quencher) (örneğin; TAMRA) boya bulunur. Prob normal haldeyken, baskılayıcı reporter boyaya yakındır ve onun floresans sinyalini baskılar. Prob hedef sekansa hibridize olduğunda, Taq polimerazın 5'-nukleaz aktivitesi hidroliz probunu kırar ve reporter ve baskılayıcının birbirinden ayrılmasına neden olur. Bu durumda baskılayıcı reporter boyanın floresansını baskılayamaz ve reporter floresan ışık yayar. PCR sırasında artan miktarda hedef sekans kadar prob hidrolize olur ve floresans sinyal de artar (Şekil 2.1).

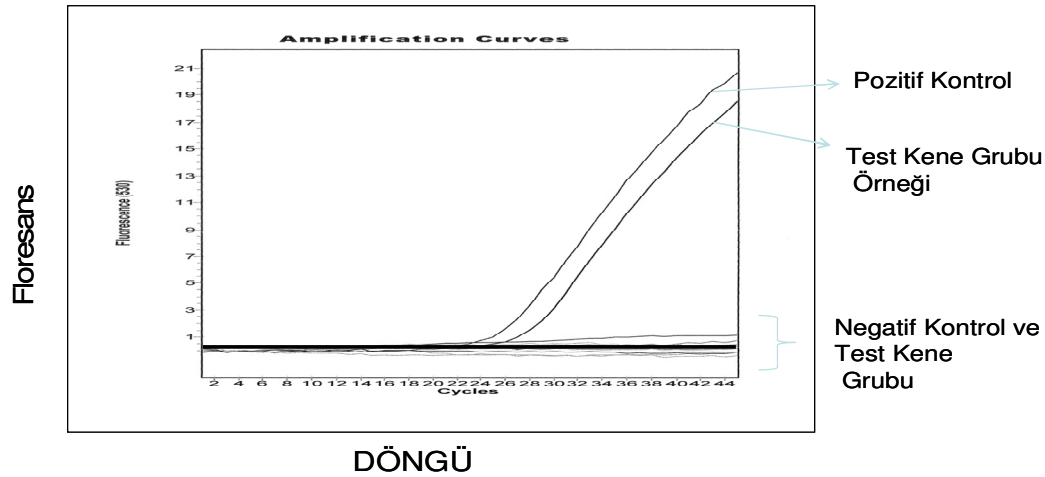


Şekil 2.1. TaqMan Real Time PCR kuantifikasyonu (Anonim 2008)

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

KKHA virüsü insanlarda ölümcül kanamalı ateşe sebep olan hayvan kaynaklı bir virüstür. Ülkemizde dahil dünyanın bir çok ülkesinde KKHA vakaları rapor edilmiştir (Ergönül et al., 2006). KKHA virüsü insanlarda ölüme sebep olduğu halde hayvanlarda hastalık asemptomatik olarak seyretmektedir (Athar, 2003). KKHA virüsü enfekte hayvanlardan viremi safhasında insan ve diğer hayvanlara ve bu hayvanlar üzerinde beslenen kenelere bulaşabilmektedir (Athar, 2003). Bu nedenle viremi safhasındaki hayvanlar özellikle hayvancılıkla uğraşanlar için risk teşkil etmektedir.

Sert keneler KKHA virüsünün vektörü olan ve virüsün hayvandan insana veya hayvandan hayvana bulaşmasını sağlayan temel vektör canlılardır. Bu nedenle keneler KKHA virüsünün yayılmasında birincil risk faktörüdürler. Bu nedenle kenelerin KKHA prevalansının bilinmesi bunlara karşı zamanında önlem alınmasını sağlayacaktır. Real time RT-PCR yöntemiyle yapılan testlerin sonuçlarına göre Tokat bölgesinde hayvanlardan toplanan kenelerde toplam 70 kene grubundan 13'ünde KKHA virüsü pozitif bulunmuştur. Bu sonuç bölge kenelerindeki KKHA virüsü prevalansının % 18 olduğunu ifade etmektedir ki bu oran oldukça yüksek bir orandır.



Şekil 3.1. Çalışmamızdaki Real Time RT-PCR sonucuna ait grafik örneği (Eşik değeri 25. döngü olarak kabul edilmiştir).

Bu oran özellikle RT-PCR sonucu daha önceki yıllara ait sonuçlardan daha yüksektir. Bu çalışmada bulunan % 18 lik sonucun Umman (%7.8, Williams, 2000) ve ülkemizde daha önce Tonbak, 2006 (% 3) tarafından bulunan sonuçlardan daha yüksek çıkmasının bir nedeni,

muhtemelen bu çalışmada daha önceki çalışmalarda kullanılan ELİZA veya klasik RT-PCR testlerinden daha hassas olan real time RT-PCR testinin kullanılmış olmasdır. Ayrıca bu sonuç bölgenin hiper endemik bir bölge olduğunu da ifade etmektedir.

Çalışmamızda KKHAV pozitif çıkan kene türleri de kısmen belirlenmiştir. Buna göre başlıca KKHAV pozitif kene türleri *Hyalomma sp* ve *Rhipicephalus sp* türleridir. Dolayısıyla bölgemizde *Hyalomma sp* yanısıra *Rhipicephalus sp* de KKHA riski taşımaktadır.

4. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada Tokat ve çevresinde yapılan arazi çalışmalarında çiftlik veya yaban hayvanlarından toplanan kenelerde KKKA virüsü varlığı ve prevalansı en gelişmiş moleküler tekniklerden biri olan REAL TIME RT-PCR yöntemiyle belirlenerek bölgemiz kenelerinin KKKA virüsü taşıma potansiyeli ortaya çıkartılmıştır. Bu tür virüslerin tanısında kullanılacak en uygun tekniğin seçilmesi de alınacak sonuçların güvenilirliğini arttıracak olması nedeniyle çok önemlidir. Kenelerde çok az kopya sayısında bulunan virüslerin tespit zorluğu göz önünde bulundurulursa, hassas, gerçek zamanlı, verimliliği yüksek, tekrarlanabilir olması özellikleriyle REAL TIME RT-PCR tekniğinin daha tercih edilebilir olduğu ortaya çıkmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada aldığımız sonuçlar bölge kenelerinin halen KKHA riski taşıdığını ve bölgede kenelerle ilgili daha ciddi ve uzun süreli mücadele yapılması gerektiğini de ifade etmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Anonim, 2006a. <http://www.eurosurveillance.org.tr/Keneler/pdf>
- Anonim, 2007a. http://www.saglik.gov.tr/saglik_bakanligi/Keneler
- Anonim, 2007b. <http://www.klimik.org.tr/KKHA/Keneler%20ve%20CCHF.pdf>
- Anonim, 2007c. <http://www.ism.gov.tr/indir/KIRIMKONGO.ppt>
- Anonim, 2008. http://www.e-oligos.com/eoweb/products/images/taqman_assay.jpg
- Ahmad, K., 2000. Outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Pakistan. *J Med Lancet*, 356, 1254.
- Aiello, S.E., and Mays, A., 2004. *Ixodes ricinus*. <http://www.cfsph.iastate.edu>
- Altaf, A., Luby, S., Ahmed, A.J., Zaidi, N., Khan, A.J., Mirza, S., McCormick, J., Fisher-Hoch, S., 1998. Outbreak of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever in Quetta, Pakistan: Contact Tracing and Risk Assessment. *Trop Med Int Health*. 3(11): 878 - 882.
- Al- Tikriti, S.K., Al- Ani, F., Jurji, F.J., Tantawi, H., Al- Moslih, M., Al- Janabi, N., Mahmud, M.I., Al- Bana, A., Habib, H., Al- Munthri, H., Al- Janabi, S., Al- Jawahry, K., Yonan, M., Hassan, F., Simpson, D.I., 1981. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Iraq. *Bull World Health Organ*, 59, 85- 90.
- Anderson, R.R. and Harrington, L.C., 2005. Tick Biology For The Homeowner.
- Athar MN, Khalid MA, Ahmad AM, Bashir N, Baqai HZ, Ahmad M, Balouch AH, Bashir K. Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak in Rawalpindi, Pakistan, February 2002: contact tracing and risk assessment. *Am J Trop Med Hyg*. 2005, 72:471-3.
- Bakır, M., Ugurlu, M., Dokuzoguz, B., Bodur, H., Tasyaran, M.A., Vahaboglu, H., 2005. Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Outbreak in Middle Anatolia: A Multicentre Study of Clinical Features and Outcome Measures. *J Med Microbiol*. 54(Pt4): 385-389.
- Balashov, Y.S., 2005. Bloodsucking Insects and Ticks and Mites, Vectors Of Transmissible Infections Of Humans and Domestic Animals *Entomological Review*. 58, 990-1007.
- Bardakçı, F., Yenidünya, A.F., 2007. Nükleik Asit Analiz Teknikleri. *Moleküler Biyoloji Teknikleri*, Editörler: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Nobel Yayınları, İstanbul, 543-546.
- Barker, S.C., and Mumell, A., 2004. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 12g Suppl, 515- 536.
- Barker, A.S., 1999. Mites and Ticks Of Domestic Animals. An Identification Guide

- and Information Source, The Stationary Office, London, 240.
- Bossi, P., Tegnell, A., Baka, A., Van Loock, F., Hendriks, J., Werner, A., Maidhoff, H., Gouvras, G., 2004. Task Force on Biological and Chemical Agent Threats, Public Health Directorate, European Commission, Luxemburg. Bichat Guidelines for the Management of Haemorrhagic Fever Viruses and Bioterrorism-Related Haemorrhagic Fever Viruses. *Euro Surveill.* 9(12): E11-E12.
- Bishop, D.H., 1996. Biology and molecular biology of bunyaviruses. *The Bunyaviridae*, Ed: Elliott, R.M. Plenum Press, New York, pp. 19-61.
- Burt, F.J., Swanepoel, R., 2005. Molecular Epidemiology of African and Asian Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Isolates. *Epidemiol Infect.* 133(4): 659-666
- 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(Pt 12): 3337-3341.
- Chinikar, S., Ahmadnejad, F., Fayaz, A., Hosseini, N., Afzali, N., Gooya, M., Zeinali, M Whitehouse, C. A., 2004. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Antiviral Res.* 2004; 64(3): 145 - 160.
- Clerx, J.P., Casals, J., Bishop, D.H., 1981. Structural characteristics of nairoviruses (Genus *Nairovirus*, Bunyaviridae). *J Gen Viral.* 55, 165-178.
- Dohm, D.J., Logan, T.M., Linthicum, K.J., Rossi, C.A., and Turell, M.J. , 1996. Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by *Hyalomma impeltatum* (Acari: Ixodidae) after experimental infection. *J. Med. Entomol.* 33(5), 848-851.
- Drosten, C., Kummerer, B.M., Schmitz, H., Gunther, S., 2003. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res.* 57, 61-87.
- Dunster, L., Dunster, M., Ofula, V., Bet, D., Kazooba-Voskamp, F., Burt, F., Swanepoel, R., DeCock, K.M., 2002. First documentation of human Crimean-Congo hemorrhagic fever, Kenya. *Emerg Infect Dis*, 8, 1005-1006.
- El- Azazy, O.M., Scrimgeour, E.M., 1997. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infection in the western province of Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91, 275-278.
- Elaldı, N., 2004. Kırım Kongo kanamalı ateşi epidemiyolojisi. *Klimik Dergisi*, 17 (3), 151-155.
- Ellis, D.S., Southee, T., Lloyd, G., Platt, G.S., Jones, N., Stamford, S., Bowen, E.T., Simpson, D.I., 1981. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus from Iraq, I. Morphology in BHK 21 cells. *Arch. Virol*, 70, 189-198.
- Ergonul, O., 2006. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Lancet Infect Dis*, 6, 203-214.

- Faye, O., Fontenille, D., Thonnon, J., Gonzalez, J.P., Cornet, J.P., and Camicas, J.L., 1999. Experimental transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. <http://www.pathexo.fr/pdf/1999n3/Faye.pdf>.
- Flick, R., Whitehouse, C.A., 2005. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Curr Mol Med*. 5(8): 753 - 760.
- Garcia, S., Chinikar, S., Coudrier, D., Billecocq, A., Hooshmand, B., Crance, J.M., Garin, D., Bouloy, M., 2006. Evaluation of a Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Recombinant Antigen Expressed by Semliki Forest Suicide Virus for IgM and IgG Antibody Detection in Human and Animal Sera Collected in Iran. *Journal of Clinical Virology* 35 (2006) 154-159.
- Gear, J.H., Thomson, P.D., Hopp, M., Andronikou, S., Cohn, R.J., Ledger, J., Berkowitz, F.E., 1982. Crimean-Congo haemorrhagic fever in South Africa. Report of a fatal case in the Transvaal. *S Afr Med J*, 62, 576-580.
- Golovljova, I., Vene, S., Sjölander, K.B., Vasilenko, V., Plyusnin, A., and Lundkvist A., 2004. Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus from Estonia. *J Med Virol*, 74, 580-588.
- Hewson, R., 2007. Molecular epidemiology, genomics and phylogeny of CCCHv. In: Crimean-Congo hemorrhagic fever, Ed: Ergonul, O., Whitehouse, C. Springer, Netherlands, 45-58.
- Hewson, R., Chamberlain, J., Mioulet, V., Lloyd, G., Jamil, B., Hasan, R., Gmyl, A., Gmyl, L., Smirnova, S.E., Lukashev, A., Karganova, G., Clegg, C., 2004. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: sequence analysis of the small RNA segments from a collection of viruses world wide. *Virus Res*, 102(2), 185-189.
- Hoogstraal, H., 1979. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol*, 15, 307-417.
- Horak, G.I., Camicas, L.J., Keirans, E.J., 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*, 28, 27-54.
- Kara, A., 2006. Kırım-Kongo Hemorajik Ateşi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 49: 175-184
- Karti, S.S., Odabasi, Z., Korten, V., et al. 2004. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis*, 10, 1379-1384.
- Karaer, Z., Yukarı, B.A., Aydın, L., 1997. Türkiye keneleri ve vektörlükleri. *Parazitoloji' de Arthropod Hastalıkları Vektörler*, Editörler: Özcel, M.A., Doldal, N. Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, 13.
- Khan, A.S., Maupin, G.O., Rollin, P.E., 1997. An outbreak of Crimean- Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates (1994-1995). *Am J Trop Med Hyg*, 57, 519-525.
- Le Due, J.V.V., 1989. Epidemiology of hemorrhagic fever viruses. *Res Infect Dis*, 11, 730-735.
- Lerx, J.P., Casals, J., Bishop, D.H., 1985. Structural characteristics of nairoviruses genus *Nairovirus*, Bunyaviridae. *J Gen Viral*, 55, 165-178.

- Mardani, M., Goya, M., Zainali, M., Jahromi, M.K., 2006. Clinico-Epidemiologic Feature and Outcome Analysis of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever in Iran (1999-2006).
- Morikawa, S., Qing, T., Xinqin, Z., Saijo, M., Kurane, I., 2002. Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolates in China. *Virology*, 296(1), 159-164.
- Mullis, K.B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262(4), 56-65.
- Nabeth, P., Cheikh, D.O., Lo, B., Faye, O., Vall, I.O., Niang, M., Wague, B., Diop, D., Diallo, M., Diallo, B., Diop, O.M., Simon, F., 2004. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis.* 10(12): 2143 - 2149.
- Ozkan, M., 1978. Erzurum ve çevre illeri kenelerinin sistematik yönden incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 524, 2-50.
- Ozkurt, Z., Kiki, I., Erol, S., Erdem, F., Yılmaz, N., Parlak, M., Gundogdu, M., Tasyaran, M.A., 2006. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Eastern Turkey: Clinical Features, Risk Factors and Efficacy of Ribavirin Therapy. *J Infect.* 52(3): 207 - 215.
- Papa, A., Bozovi, B., Pavlidou, V., Papadimitriou, E., Pelemis, M., Antoniadis, A., 2002b. Genetic Detection and Isolation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Kosovo, Yugoslavia. *Emerg Infect Dis.* 8(8): 852 - 854.
- Papa, A., Christova, I., Papadimitriou, E., Antoniadis, A., 2004. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Bulgaria. *Emerg Infect Dis.* 10, 1465-1467.
- Papa, A., Ma, B., Kouidou, S., Tang, Q., Hang, C., Antoniadis, A., 2002. Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains, China. *Emerg Infect Dis.* 8, 50-53.
- Saijo, M., Tang, Q., Shimayi, B., Han, L., Zhang, Y., Asiguma, M., Tianshu, D., Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S., 2004. Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Jpn J Infect Dis.* 57, 55-57.
- Schmaljohn, C.S., Hooper, J.W., 2001. Bunyaviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*. Ed: Knipe, D.M., Howley, P.M., Philadelphia, 1581-1602.
- Schwarz, T.F., Nsanze, H., Longson, M., Nitschko, H., Gilch, S., Shurie, H., Ameen, A., Zahir, A.R., Acharya, U.G., Jager, G., 1996. Polymerase Chain Reaction for Diagnosis and Identification of Distinct Variants of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg.* 55(2): 190 - 196.
- Simpson, D.I., 1978. Viral Hemorrhagic fevers of man. *Bull WHO*, 56, 819-832.
- Simpson, D. I., Knight E.M., Courtois, G., Williams, M.C., Weinbern, MP, Kibukamusoke, JW. Congo virus: a hithertoundescribed virus occurring in Human Africa. *isolationsclinical notes. East Afr Med J* 1967; 44: 86-92.
- Suleiman, M.N., Muscat-Baron, J.M., Harries, J.R., Satti, A.G., Platt, G.S., Bowen, E.T., Simpson, D.I., 1980. Congo-Crimean Haemorrhagic Fever in Dubai. An Outbreak at the Rashid Hospital. *Lancet.* 2(8201): 939 - 941.

- Swanepoel, R., Shepherd, A.J., Leman, P.A., Shepherd, S.P., Miller, G.B., 1985. A common source outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever on a dairy farm. *S Afr Med J*, 68, 635-637.
- Swanepoel, R., 1995. *Nairovirus* infections. Exotic viral infections. Ed: Porterfield, J.S., Chapman & Hall, London, pp. 285- 293.
- Tekin. Ş., Barut, Ş., Yüce, Ö., Aydoğan, G., Demir, F., Yıldırım, B., Bursalı, A., 2008. Prevalence of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) In Risk Groups in Tokat, Turkey. IUMS 2008. XIV. International Congress of Virology.
- Tonbak S, Aktas M, Altay K, Azkur AK, Kalkan A, Bolat Y, Dumanli N, Ozdarendeli A. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Genetic analysis and Tick Survey in Turkey. 2006. 44: 4120-4124.
- Van De Wal, B.W., Joubert, J.R., Van Eeden, P.J., King, J.B., 1985. A Nosocomial Outbreak of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever at Tygerberg Hospital. Part IV. Preventive and Prophylactic Measures. *S Afr Med J*. 68(10): 729 – 732
- Vassilenko, S.M., Vassilev, T.L., Bozadjiev, LG., Bineva, I.L., Kazarov, G.Z., 1990. Specific intravenous immunoglobulin for Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet* 1990; 335: 791-792.
- Vredevoe, L., 1997. Background information on the biology of ticks. <http://entomology.ucdavis.edu/faculty/rbkimsey/tickbio.html>.
- Watts, D.M., Ksiazek, T.G., Linthicum, K.J., Hoogstraal, 1988. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *The Arboviruses, Epidemiology and Ecology*, CRC press, Boca Raton FC, 177- 222.
- Watts, D.M., Ksiazek, T.G., Linthicum, K.J., Hoogstraal, H., 1988. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever.
- Whitehouse, C.A., 2004. Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res*, 64(3), 145-160.
- Williams, R.J., Al- Busaidy, S., Mehta, F.R., 2000. Crimean-Congo haemorrhagic fever: a seroepidemiological and tick survey in the Sultanate of Oman. *Trop Med Int Health*, 5, 99-106.
- Yashina, L., Vyshemirskii, O., Seregin, S., Petrova, I., Samokhvalov, E., Lvov, D., Gutorov, V., Kuzina, I., Tvunnikov, G., Tang, Y.W., Netesov, S., Petrov, V., 2003. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. *J Clin Microbiol*, 41(2), 860-862.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neslihan MUTLUAY
Doğum Tarihi / Yeri : 01.01.1983 / MERSİN

Öğrenim Durumu

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi / TOKAT	2006-2009
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi / TOKAT	2002-2006
Lise	Salim Yılmaz Lisesi / MERSİN	1996-1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2008-2009	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Laboratuvarı / MERSİN	Biyolog
2004-2005	Çukurova Bil-ge Laboratuvarları	Biyolog