

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI

KIRIM KONGO HEMORAJİK ATEŞİ VİRÜSÜ
ENFEKSİYONUNA KARŞI SEROLOJİK TEŞHİS
YÖNTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

NURETTİN ÇANAKOĞLU

2012

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRIM KONGO HEMORAJİK ATEŞİ VİRÜSÜ
ENFEKSİYONUNA KARŞI SEROLOJİK TEŞHİS
YÖNTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**NURETTİN ÇANAKOĞLU
ELAZIĞ – 2012**

ONAY SAYFASI

Doç.Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

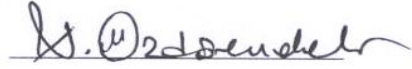


Prof. Dr. Yusuf BOLAT

Viroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ



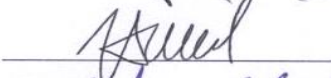
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yusuf BOLAT



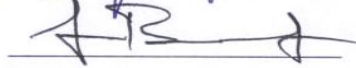
Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ



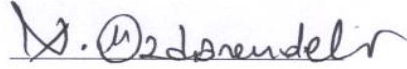
Prof. Dr. Mustafa HASÖKSÜZ



Prof. Dr. Hakan BULUT



Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ



Bu tez mensubu olmaktan gurur duyduğum Yüce Türk milletine ithaf edilmiştir...

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora öğrenimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda desteğini ve tecrübesini esirgemeyen, bu alanda yetişmemde büyük emeği bulunan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye, başta Prof. Dr. Yusuf BOLAT olmak üzere Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer Öğretim Üyelerine, doktora öğrenimim boyunca her türlü sabrı ve desteği gösteren, varlığıyla bana güç veren biricik eşim Sıddıka Sadet ÇANAKOĞLU'na, doktoram boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım, dostum Engin BERBER'e, katkılarından dolayı M. Deniz YÖRÜK'e, Dr. Cemal ORHAN'a ve son olarak beni yetiştirip bu günlere getiren canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

NURETTİN ÇANAKOĞLU

Bu tez 108 G 126 no'lu TUBITAK KAMAG 1007 projesi kapsamında yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
GRAFİK LİSTESİ	xi
RESİM LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
1. ÖZET.....	xix
3. GİRİŞ	1
3.1. Hastalığın Tarihçesi	2
3.2. Sınıflandırma.....	3
3.3. Viral Yapı ve Virüsün Moleküler Biyolojisi.....	4
3.4. Epidemiyoloji.....	10
3.5. Viral Patogenez	15
3.6. Klinik Bulgular	17
3.7. Tedavi.....	19
3.8. Teşhis	21
3.9. Amaç	24
4. GEREÇ VE YÖNTEM	26
4.1. KKKAH Karşı Antijen ELISA Testinin Geliştirilmesi	26
4.1.1. Virüs Çoğaltılması	26
4.1.2. Hücre Kültüründe Viral Antijenlerin Üretimi.....	26
4.1.3. Pseudo-plak Titrasyon Testi.....	27

4.1.4. Viral Antijenlerin Konsantre Edilmesi	30
4.1.5. Virüs İnaktivasyonu	30
4.1.6. Lowry Testi	31
4.1.7. Tavşan İmmünizasyonları	31
4.1.8. Tavşan Antikor Titrelerinin Belirlenmesi	32
4.1.9. Tavşan Antikorlarının Pürifikasyonu	33
4.1.10. Tavşan Serumlarının İşaretlenmesi	34
4.1.11. İnsan Serumlarında KKKAH Antijeninin Belirlenmesi Amacıyla ELISA Testi Geliştirilmesi.....	34
4.2. İnsan Serum Örneklerinde RNA Ekstraksiyonu	35
4.3. cDNA Elde Edilmesi.....	35
4.4. Real-time PCR Protokolü.....	36
4.5. Vectorbest Antijen ELISA Kit Protokolü	36
4.6. Kene Örneklerinde KKKAH Antijeninin Belirlenmesine Yönelik ELISA Testi Geliştirilmesi.....	37
4.7. Kene Örneklerinde PCR Testi.....	38
4.8. İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	38
4.9. Vector Best İndirekt ELISA Kit Protokolü.....	39
4.10. Sığır Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	39
4.11. Koyun Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	40

4.12. Keçi Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	41
4.13. Fare Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	42
4.14. SDS ve Western Blot Analizi.....	43
4.15. Monoklonal Antikor Üretimi	45
4.15.1. Myelomma Hücrelerinin Üretilmesi	45
4.15.2. Fare İmmünizasyonları.....	45
4.15.3. Füzyon.....	46
4.15.4. Hibridoma Hücrelerinin Üretilmesi	47
4.15.5. Pozitif Klonların Belirlenmesi	48
4.15.6. Limiting Dilüsyon	49
4.16. İstatistiksel Analiz.....	49
5. BULGULAR	50
5.1. Viral Üremenin Tespiti	50
5.2. Tavşan Hiperimmün Serum Elde Edilmesi.....	52
5.3. Tavşan Hiperimmün Serumlarının Pürifikasyonu ve İşaretlenmesi	53
5.4. İnsan Serumlarında KKKAH Antijenlerinin Belirlenmesi Amacıyla Antijen ELISA Testinin Geliştirilmesi	53
5.5. İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	72
5.6. Sığır Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	73

5.7. Koyun Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	77
5.8. Keçi Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi.....	79
5.9. Monoklonal Antikor Üretimi	82
7. TARTIŞMA	85
8. KAYNAKLAR	93
9. ÖZGEÇMİŞ.....	103

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Geliştirilen antijen ELISA ve Vectorbest ile Real-time PCR serum sonuçlarının karşılaştırılması.	54
Tablo 2. Vectorbest antijen ELISA ve geliştirilen antijen ELISA testinin karşılaştırılması	56
Tablo 3. Real-time PCR ve geliştirilen antijen ELISA testinin karşılaştırılması.	56
Tablo 4. Pozitif serum örneklerinin real-time PCR kopya sayıları	57
Tablo 5. Ankara RSHM Başkanlığı’nda antijen ELISA ve real-time PCR ile test edilen serumların karşılaştırılması.	61
Tablo 6. Samsun RSHM’de antijen ELISA ve real-time PCR ile test edilen serumların karşılaştırılması.	63
Tablo 7. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde antijen ELISA ve real-time PCR ile test edilen serumların karşılaştırılması.	66
Tablo 8. Antijen ELISA ile test edilen kene örneklerinin toplandığı odaklar ve pozitiflik yüzdeleri.	69
Tablo 9. Çorum, Tokat, Erzurum, Yozgat, Edirne ve Bingöl illerinden toplanan sığır serumları ve pozitiflik yüzdeleri.	74
Tablo 10. Tokat ve Yozgat illerinden toplanan koyun serumları ve pozitiflik yüzdeleri.	78
Tablo 11. Tokat ve Yozgat illerinden toplanan keçi serumları ve pozitiflik yüzdeleri.	79
Tablo 12. Monoklonal antikör üretiminde kullanılan fareler ve serum antikör seviyeleri	83

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. KKKAH virüs izolatlarının filogenetik analizleri	4
Şekil 2. Viryonun şematik görünümü.	5
Şekil 3. Nairovirus genusuna ait genom segmentlerinin şematik görünümü.....	7
Şekil 4. Virüsün replikasyon siklusu.	10
Şekil 5. Türkiye’de KKKAH yönünden belirlenen risk bölgeleri	11
Şekil 6. KKKAH virüsünün doğadaki sirkülasyonu.....	13
Şekil 7. KKKAH’nın coğrafik dağılımı.	15
Şekil 8. KKKAH’nın klinik seyri.	18

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Tavşan hiperimmün serumlarının indirekt ELISA testi ile haftalara ait antikor titrelerinin gösterilmesi.	52
Grafik 2. Pozitif serumlara ait Real-time PCR sonuçları ve deteksiyon limiti. ...	58
Grafik 3. Ankara RSHM Başkanlığı'ndan gönderilen 208 adet insan serumlarının ELISA değerlerinin gösterilmesi.....	59
Grafik 4. Ankara RSHM Başkanlığı'nda test edilen 21 adet serumun 450 nm dalga boyunda okunan ELISA değerleri.	60
Grafik 5. Samsun RSHM Başkanlığı'nda test edilen 41 adet serumun ELISA değerleri.....	62
Grafik 6. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesinde antijen ELISA ile test edilen 47 adet serum örneklerinin O.D. değerleri.	65
Grafik 7. Antijen ELISA ile pozitif belirlenen kene örneklerinin real-time PCR sonuçlarının gösterilmesi.	71
Grafik 8. İndirekt ELISA ile test edilen serum örneklerine ait sonuçların gösterilmesi	72
Grafik 9. Çorum iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.....	75
Grafik 10. Tokat iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.....	75
Grafik 11. Erzurum iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.	76

Grafik 12. Yozgat iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.	76
Grafik 13. Edirne iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.	77
Grafik 14. Yozgat Kuruçay köyünden toplanan koyun serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.....	78
Grafik 15. Tokat Ağamusa köyünden toplanan koyun serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.....	79
Grafik 16. Yozgat Kuruçay köyünden toplanan keçi serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.....	80
Grafik 17. Tokat Ağamusa köyünden toplanan keçi serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi.	81

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Vero E6 hücrelerinde fare beyinde izole edilen virüsün pseudo-plak testi ile görüntülenmesi (VK. Virüs kontrol, HK. Hücre kontrol).	50
Resim 2. Enfekte olmayan Vero E6 hücreleri (A) ve enfeksiyonun 5.gününde Vero E6 hücrelerinin (B) görünümü.	51
Resim 3. Viral proteinlerin ve büyüklüklerinin western blot testi ile görüntülenmesi.	51
Resim 4. Antijen ELISA yöntemiyle test edilen serumların ELISA pleytindeki görünümü.	58
Resim 5. Antijen ELISA testi ile test edilen kene örneklerinin ELISA pleytindeki görüntüsü.	70
Resim 6. Kene örneklerine ait PCR sonuçlarının agaroz jelde gösterilmesi.	71
Resim 7. İndirekt ELISA testi ile test edilen insan serumlarının ELISA pleytindeki görünümü.	73
Resim 8. Sığır (1), koyun (2) ve keçi (3) serumlarının western blot ile görüntülenmesi.	82
Resim 9. Antikor izotiplendirmesinde kullanılan striplerin görünümü.	84

KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
BHK-21	: Yavru hamster böbrek hücresi
BME	: Beta merkaptto etanol
bp	: Baz çifti
BSL	: Biyogüvenlik seviye laboratuvar
β -gal	: Beta galaktozidaz
cm ²	: Santimetre kare
CO ²	: Karbondioksit
CPK	: Kreatin fosfokinaz
cRNA	: Kopya ribonükleik asit
dH ₂ O	: Distile su
DMEM F-12 HAM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen-diamin-tetra asetik asit
ELISA	: Enzim ilintili immünsorbent deneyi
FBS	: Fötal sığır serumu
FCS	: Fötal buzağı serumu
Fd	: Delta fragmenti
ffu	: Fokus formasyon ünite

Gc	: Karboksi terminal uç glikoproteini
Gn	: Amino terminal uç glikoproteini
GP	: Glikoprotein
HAT	: Hipoksantin-aminopterin-timidin
HRP	: Horseradish peroksidaz
HT	: Hipoksantin timidin
ICAM-1	: İntrasellüler adezyon molekül 1
IFA	: İmmünfloresan deneyi
IFN	: İnterferon
IgG	: Immünglobülin G
IgM	: Immünglobülin M
IL	: Interlöykin
ISG-20	: interferon tarafından uyarılan gen orijinli protein 20
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
KKKA	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi
KKKAV	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü
KKKAHV	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü
L	: Large segmenti
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LLC-MK2	: Macaca mulatta maymun böbrek epitel hücresi
M	: Medium segmenti
mg	: Miligram
ml	: Mililitre

MLV-RT	: Mürin Lökomi virüs tersine transkriptaz enzimi
mM	: Milimolar
MOI	: Enfeksiyon oranı
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MWCO	: Moleküler ağırlık cut-off
MxA	: İnsan MxA proteini
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
N	: Normalite
NBT	: Nitro-blue tetrazolium
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NP	: Nükleoprotein
NSm	: Yapısal olmayan M proteini
O.D.	: Optik dansite
ORF	: Açık okuma bölgesi
°C	: Santigrat derece
OTU	: Ovaryan tümör proteini
P56	: Protein 56
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG	: Polietilen glikol
pfu	: Plak formasyon ünite
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu

PreGc	: Gc prekürsörü
PreGn	: Gn prekürsörü
RdRP	: Ribonükleik asit bağımlı ribonükleik asit polimeraz enzimi
RIG-1	: Retinoik asit indükleyici gen 1
RKPL	: Aminoasit motifi
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
RRLL	: Aminoasit motifi
RSHM	: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi
RT-PCR	: Tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
S	: Small segmenti
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SKI-1	: Subtilisin/keksin-izozim-1 proteini
SP2O-Ag14	: Fare myelomma hücre hattı
SVCAM-1	: Çözünebilir vasküler hücre adezyon molekül 1
SW-13	: İnsan böbreküstü bezi karsinoma hücresi
TBST	: Tris tampon solüsyonu
TEMED	: Tetra metil etilen diamin
TEN	: Tris EDTA sodyum klorür
TMB	: Tetra metil benzidin
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa

TÜBİTAK-MAM	: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi
U/L	: Ünite/ Litre
USCDC	: Birleşik Devletler Salgın Koruma ve Kontrol Merkezi
Vero E6	: Yeşil maymun böbrek hücresi
vRNA	: Viral ribonükleik asit
X-Gal	: 5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranozid

1. ÖZET

KIRIM KONGO HEMORAJİK ATEŞİ VİRÜSÜ ENFEKSİYONUNA KARŞI SEROLOJİK TEŞHİS YÖNTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKAH), insanlarda şiddetli hastalık ve hemorajiye neden olan ve yüksek mortaliteyle seyreden kene kaynaklı bir hastalıktır. KKKAH viral genomu her biri ayrı ayrı enkapsüle olmuş negatif anlamlı tek iplikli 3 segmentten oluşur. KKKAH virüsü insanlara enfekte kenelerin ısırmasıyla veya viremik insan ve hayvanlarla direkt temas sonucu bulaşır. Hastalık Afrika, Avrasya ve Ortadoğu’da çok geniş bir alanda rapor edilmiştir. Türkiye’de 2002 yılında bir salgın bildirilmiştir. Bu tarihten itibaren KKKAH vakalarının her yıl sürekli olarak artış göstermesi virüsü halk sağlığı problemi haline getirmektedir. İnsanlarda anti-KKKAH IgG ve IgM’lerin tespiti için İmmunofloresan testleri (IFA) ve enzim ilintili immunosorbent deneyleri (ELISA) kullanılmaktadır. Virüs deteksiyonu hastalığın erken döneminde teşhis için en çok tercih edilen metottur. Akut dönemde enfeksiyonun teşhisinde kullanılan testler hücre kültürü ve tersine transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonudur (RT-PCR). Hastalığın spesifik bir tedavisi bulunmadığından erken teşhis oldukça önemlidir. Hastalığın erken dönemlerinde teşhis edilen hastalarda destekleyici tedavi etkili olabilmektedir. Bu çalışmada insanlarda KKKAH’nın erken teşhisi için antijen ELISA testi geliştirildi. Ankara, Sivas ve Samsun’dan toplanan hasta serumları geliştirilen antijen ELISA ile test edildi ve sonuçlar Vectorbest® Vectocrimean-CHF-Ag ELISA kiti ile karşılaştırıldı. Sonuçlara göre geliştirilen antijen ELISA testinin özgüllüğü % 94 ve hassasiyeti % 95 olarak

belirlendi. Geliştirilen antijen ELISA testi endemik bölgeden toplanan kene örneklerine adapte edildi. Ayrıca koyun, keçi, sığır, fare ve tavşan anti-KKKAH IgG'lerinin belirlenmesi için indirekt ELISA testi geliştirildi. Sonuç olarak hücre kültüründen elde edilen KKKAH viral antijenler kullanılarak KKKAH antijen ve antikorlarının tespiti amacıyla ELISA tabanlı bir teşhis sistemi geliştirildi.

Anahtar kelimeler: KKKAH, Antijen ELISA, İndirekt ELISA, Teşhis

2. ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SEROLOGICAL DIAGNOSTIC METHODS FOR CRIMEAN CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS INFECTION

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a tick-born viral zoonotic disease that causes hemorrhage and severe illness in humans with high mortality rates. CCHF virus genome consists of three molecules of negative-sense single-stranded RNA, each encapsulated separately. CCHF virus is transmitted to humans through infected tick bites or from direct contact with viremic animals or humans. The disease has been reported in widespread areas of Africa, the Middle East, and Eurasia. A large Crimean-Congo hemorrhagic fever outbreak occurred in Turkey in 2002. The numbers of Crimean-Congo hemorrhagic fever cases have gradually increased in Turkey making the virus a public health concern. For the detection of anti-CCHFV IgG and IgM, immunofluorescence assays (IFAs) as well as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) have been used for human cases. Virus detection is the primary method of diagnosis of early stage disease. Diagnostic assays for acute Crimean-Congo hemorrhagic fever infection include virus culture, reverse transcription-PCR (RT-PCR). Early diagnosis of CCHF is extremely important since there is no specific treatment for CCHF. Supportive treatment would be effective for the CCHF patients with diagnosed at early stage of the disease. In this study, antigen capture ELISA has been developed for early diagnosis of CCHF for humans. The patient sera obtained from Ankara, Sivas and Samsun have been tested with the antigen capture ELISA and results compared with Vectorbest® Vectocrimean-CHF-Ag ELISA kit. The

specificity and sensitivity of antigen capture ELISA calculated 94 % and 95 % respectively when compared to the Vectorbest[®] Vectocrimean-CHF-Ag ELISA. Moreover, the antigen capture ELISA was adapted for the tick samples collected from the CCHF endemic area. We also developed an indirect ELISA for the detection of anti-CCHFV IgG from domestic animals such as goat, cattle and sheep as well as laboratory animals such as rabbit and mice. As a conclusion, diagnostic systems for CCHF, such as enzyme immunoassays for the detection of CCHF virus antigens and antibodies were developed by using cell culture based CCHF virus antigens.

Key words: CCHF, Antigen capture ELISA, Indirect ELISA, Diagnosis

3. GİRİŞ

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı (KKKAH) Asya, Doğu Avrupa, Ortadoğu ülkeleri ve Afrika'nın bazı bölgelerinde görülen ölümcül viral zoonoz bir hastalıktır (1). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Virüsü (KKKAHV) *Bunyaviridae* ailesine mensup *Nairovirus* genusunda yer almaktadır. Bunyavirüsler 350'den fazla virüsü barındırmaktadır. *Bunyaviridae* ailesinde *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus* olmak üzere 5 farklı genus bulunmaktadır (2). *Nairovirus* genusu, Uluslararası Viral Taksonomi Komitesince yapılan sınıflandırmaya göre 7 farklı tür ve 34 farklı virüs suşuna sınıflandırılmıştır. Bunların tamamının *Ixodid* keneler tarafından nakledildiği bilinmektedir (3). *Nairovirus* genusunda iki önemli serogrup bulunur. Bunlar, (i) KKKAH virüsü ve Hazara virüsünün dahil olduğu KKKA serogrubu (ii) Nairobi Koyun hastalığı virüsü ve Dugbe virüsünün dahil olduğu Nairobi koyun hastalığı serogrubudur (4).

Virüs sığır, koyun, keçi ve tavşan gibi memelilerden izole edilmiştir ancak bu hayvanlarda klinik tablo oluşturmamakta sadece geçici viremi şekillenmektedir (5, 6, 7, 8). Klinik hastalık tablosu sadece insanlarda gözükmemektedir (1). Hastalık Afrika, Asya ve Avrupa'nın birçok bölgesinde sporadik olarak görülüp, yaklaşık %3 - %30 mortaliteyle seyretmektedir (2). Hastalık ülkemizde 2002 yılından beri görülmektedir ve on yılda 6000'den fazla konfirme vaka bildirilmiştir. Endemik bölgelerde kırsal kesimde tarım ve hayvancılıkla uğraşanlar, veteriner hekimler ve sağlık çalışanları risk altındadır. Hastalığın spesifik bir tedavisi yoktur. Bu yüzden erken teşhis oldukça önem kazanmaktadır.

3.1. Hastalığın Tarihçesi

Hastalık ilk kez 12. yüzyılda Tacikistan'da tanımlanmıştır. Hastalarda kanlı idrar, kusma ve balgam ile rektum, barsaklar, diş etleri ve abdominal boşlukta kanamalar bildirilmiştir (9). Hastalığın göçmen kuşların paraziti olan bir bit türü veya kene kaynaklı olduğu düşünülmüştür (2). Hastalık Asya'da farklı bölgelerde “*khungribta*”, “*karakhalak*” ve “*khunymuny*” gibi farklı isimlerle adlandırılmıştır (1). Onaltıncı ve onyedinci yüzyıllarda Orta Asya'da benzer semptomlarla seyreden kanamalı ateş vakalarının görüldüğü bildirilmiştir (2).

Modern çağda klinik olarak hastalık ilk kez 1944-1945 yıllarında Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği'nde tanımlanmıştır (10). İkinci Dünya Savaşı sırasında Kırım'da bulunan yaklaşık 200 Sovyet askeri hastalığa yakalanmıştır (1). Daha sonra 1953 yılında Bulgaristan'da 487 kişiyi etkileyen bir endemi bildirilmiştir (9). Kongo ve Zaire'de 1956 yılında benzer kanamalı ateşli bir hastalığa rastlanmıştır (2).

Chumakov ve ark ilk kez 1967 yılında, hastaların kan ve dokularından elde ettikleri örnekleri yeni doğan fare beyinlerine enjekte ederek virüsü izole etmişlerdir (11, 12). Drosdov suşu olarak adlandırılan bu virüs suşu daha sonraki deneysel çalışmalar için prototip suş olarak kullanılmıştır (13, 14). Daha sonra bu suşun 1956 yılında Kongo'da endemiye neden olan virüs suşuyla antijenik olarak aynı olduğu belirlenmiş ve hastalık Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı olarak adlandırılmıştır (14, 15, 16).

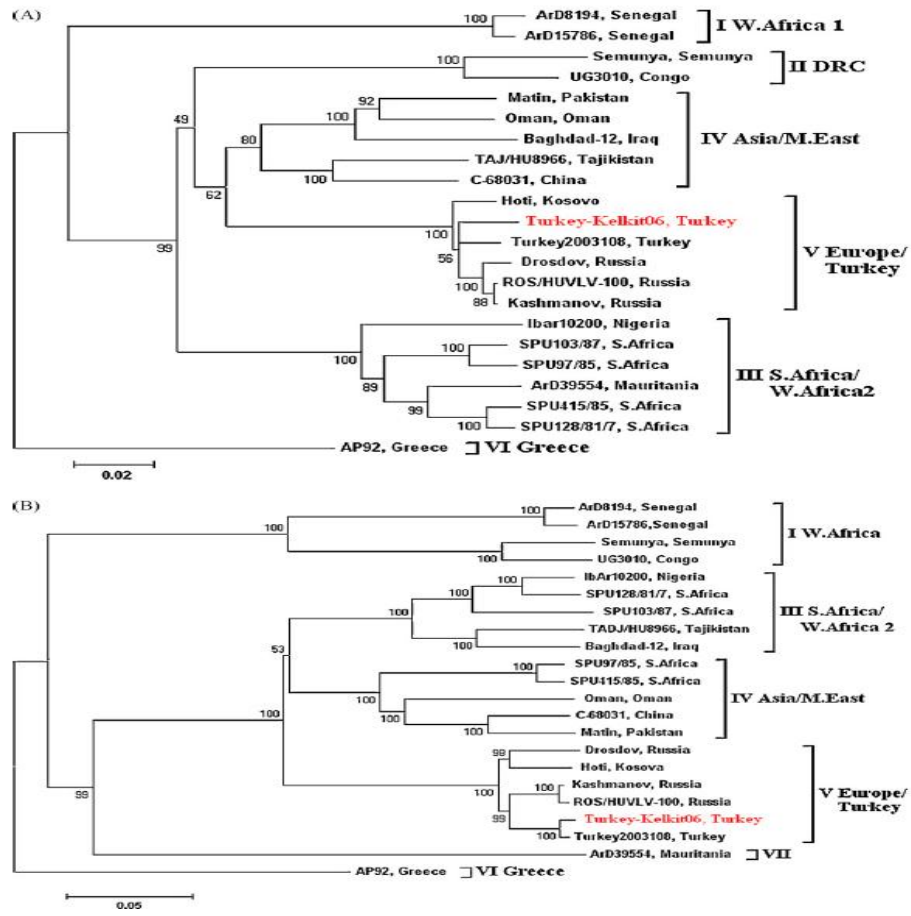
Daha sonraki yıllarda iklim değişiklikleri, çevresel ve coğrafik koşullar virüsün oldukça geniş coğrafyalara yayılmasına yardımcı olmuştur. Hastalık 2001 yılında Kosova'da rapor edilmiş, daha sonra 2002 yılında ilk kez Türkiyede

bildirilmiştir. Aynı yıllarda İran, Rusya ve Bulgaristan'da endemiler rapor edilmiştir.

3.2. Sınıflandırma

KKKAH virüsü *Bunyaviridae* ailesine mensup *Nairovirus* genusunda yer almaktadır (17, 18). Ailede yer alan virüslerin büyük çoğunluğu sivrisinek, kene gibi kan emen artropodlarla taşınmaktadır. Aile içerisindeki 4 genus (*Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* ve *Phlebovirus*) memelilerde enfeksiyona neden olmakta *Tospovirus* genusu ise bitkilerde enfeksiyona neden olan virüsleri içermektedir (19). Uluslararası Viral Taksonomi Komitesi'ne göre *Orthobunyavirus* genusunda 47, *Hantavirus* genusunda 22, *Nairovirus* genusunda 7, *Phlebovirus* genusunda 9, *Tospovirus* genusunda 8 tür yer almaktadır (20).

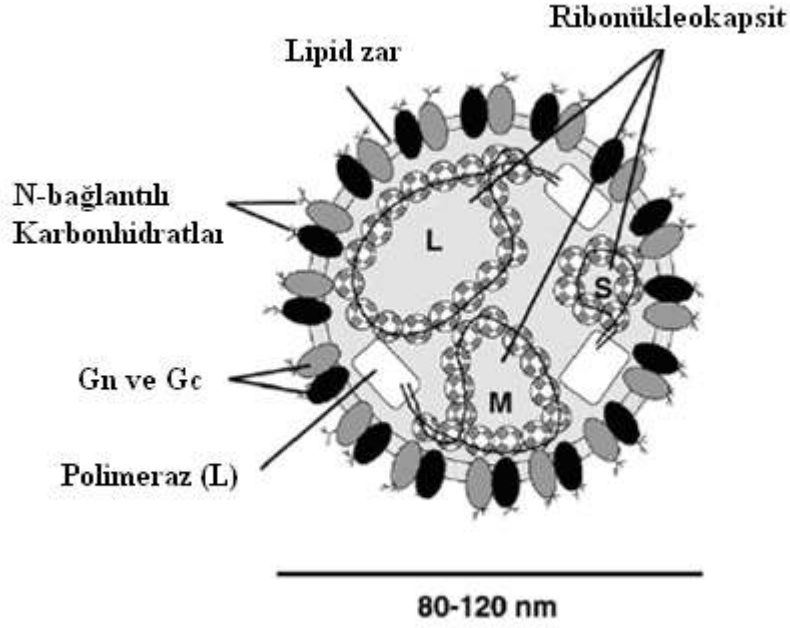
Karti ve ark. 2004 yılında Türkiye'deki hastalardan elde ettikleri izolatın S segmentini sekanslamışlar ve izolatın filogenetik karşılaştırmasını yapmışlardır. Daha sonra Özdamar ve ark. 2006 yılında Türkiye Kelkit vadisinden Turkey Kelkit06 nolu virüs suşunu izole etmişlerdir ve izolatın tüm genomunu 2008 yılında sekanslayıp filogenetik analizini yapmışlardır. Analiz sonuçlarına göre KKKAHV Turkey-Kelkit06 suşu Avrupa/Türkiye coğrafik hattında grup 5 içerisinde yer almaktadır. Ayrıca bu izolatın Deyde ve ark. 2006 yılında karakterize ettikleri Turkey200310849 adlı suş ile de % 98,8 identik olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 1) (21, 22, 23).



Şekil 1. KKAH virüs izolatlarının filogenetik analizleri (22).

3.3. Viral Yapı ve Virüsün Moleküler Biyolojisi

Virüs partikelleri yaklaşık 100 nm çapında ve sferik yapıdadır (24). Virüs 5-7 nm kalınlığında konakçıdan köken alan bir lipid bilayer zar ile çevrilidir ve bu zarın üzerinde 8-10 nm uzunluğunda glikoprotein çıkıntılar bulunmaktadır (25, 26, 27) (Şekil 2).



Şekil 2. Viryonun şematik görünümü (25).

Virüsün kimyasal bileşimi %2 RNA, %58 protein, %33 lipid ve %7 karbonhidrattan oluşmaktadır (28, 29).

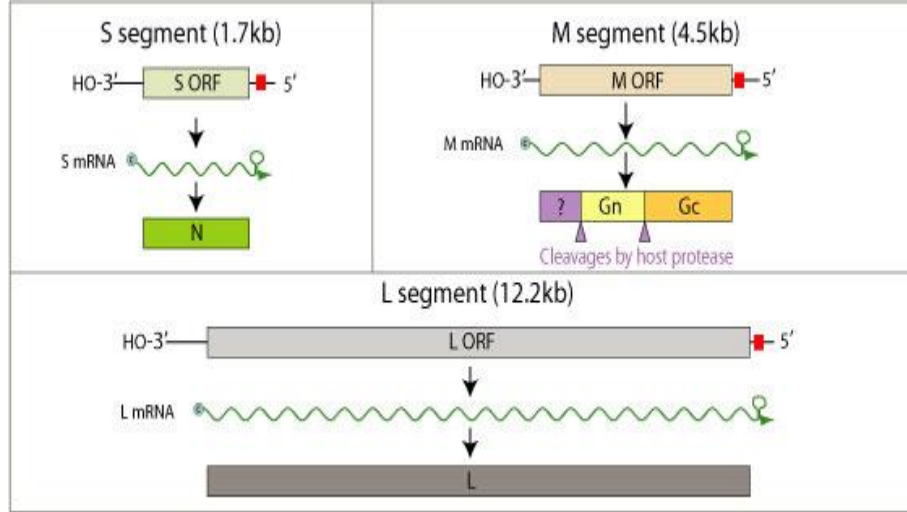
Virüs genomu small (S), medium (M) ve large (L) olarak adlandırılan 3 segmentli tek iplikli RNA'dan meydana gelmektedir (30, 31) (Şekil 3). Genomik RNA negatif polariteye sahiptir (2). KKKAHV Turkey Kelkit06 suşu 1673 nükleotit uzunluğunda S segmenti, 5364 nükleotit uzunluğunda M segmenti ve 12149 uzunluğunda L segmenti olmak üzere toplam 19186 nükleotit uzunluğuna sahiptir (22).

S segmenti 56-1504 nükleotitler arasını kapsayan tek bir açık okuma bölgesine (ORF) sahiptir ve 482 aminoasit uzunluğundaki nükleoproteini (NP) kodlamaktadır. KKKAHV Turkey Kelkit06 suşu S segmenti grup 5 içerisinde yer

alan diğerk virüslerle % 97,4 aminoasit ve % 98,5 nükleotit benzerliğı göstermektedir (22).

M segmenti 78-5144 nükleotitler arasında yer alan bir ORF'a sahiptir ve 1688 amino asit uzunluğundaki bir poliprotein olarak translasyona uğramaktadır. PreGn (140 kDa) ile PreGc (85 kDa) olarak iki farklı protein prekürsörüne kesilmektedir. Bu prekürsörler proteolitik işlemler neticesinde Gn (37 kDa) ve Gc (75 kDa) olarak adlandırılan iki yapısal protein ve musin, GP160, GP85, GP38 ve NSm gibi yapısal olmayan proteinler sentez edilmektedir (22). Amino terminalinde gerçekleşen proteolitik işlemin hücresel proteazlar, Furin-like proteaz ve SKI-1 olarak isimlendirilen bir subtilaz enzimi kontrolünde gerçekleştiğı ve neticede Gn proteininin oluştuğı ortaya konmuştur (32, 33).

L segmenti 78-11915 nükleotitler arasında yer alan bir ORF'a sahiptir ve buradan 3945 amino asit uzunluğunda RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRP) enzimi kodlanmaktadır (22, 34, 35, 36, 37). Kinsella ve ark. yaptıkları bir çalışmada KKKAH virüsünün L segmenti ile *Nairovirüs* genusunda yer alan bir diğerk virüs olan Dugbe virüsünün aynı segmenti arasında %60 oranında amino asit sekans benzerliğı bulunduğunu ortaya koymuşlardır (38). Daha sonra yapılan çalışmalarda L segmentinde zinc-finger bölgesinin ve leucin zipper motifinin varlığı belirlenmiş ve L segmentinin viral helikaz karakteristik yapısını da gösterdiği ortaya konmuştur (39). Ayrıca L segmentinde ovarian tumor (OTU)-like proteazların varlığı gösterilmiştir (40). OTU-like proteazların L poliproteininin polimeraz ve helikaz olarak iki farklı proteine enzimatik olarak kesilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (41).



Şekil 3. *Nairovirus* genusuna ait genom segmentlerinin şematik görünümü (30).

Hedef hücrenin enfeksiyonu bir ya da daha fazla virüs glikoproteininin hücresel reseptörlere tutunmasıyla başlatılır. Bunyavirüslerde yapılan çalışmalar hem Gn hem de Gc'nin tutunmada rol oynadığını göstermektedir. Hücreye girişte hangi hücresel reseptörlerin rol oynadığı henüz bilinmemektedir (42, 43, 44). Ancak Dimitrov *ve ark.* yaptıkları bir çalışmada virüse duyarlı hücrelerin yüzeyinde nükleolin reseptörleri bulunduğunu saptamışlar ve bu reseptörlerin virüsün hücreye girişinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (45). Mirazimi *ve ark.* ise polarize MDCK hücrelerinde virüsün bazolateral olarak hücreye girdiğini göstermişlerdir (46). Hantaan virüslerde yapılan bir çalışmada virüsün reseptör bağımlı klatrin aracılı endositoz mekanizması ile hücre içine girdiği gösterilmiştir (47). Mirazimi *ve ark.* yaptığı bir başka çalışmada KKKAH virüsünün hücresel mikrotübülleri kullanarak hücre içine girdiğini göstermişlerdir (48).

Diğer zarlı virüslerin birçoğunda olduğu gibi bunyavirüsler de asidik pH'da hücre sitoplazması içinde serbest kalırlar. Endozom asidifiye olmaya başlayınca kapsitten sıyrılma gerçekleşir. Endozomal ve viral membranların

füzyonu sonucunda nükleokapsitler sitoplazma içerisinde serbest kalırlar ve genom replikasyonu sitoplazmada gerçekleşir (49).

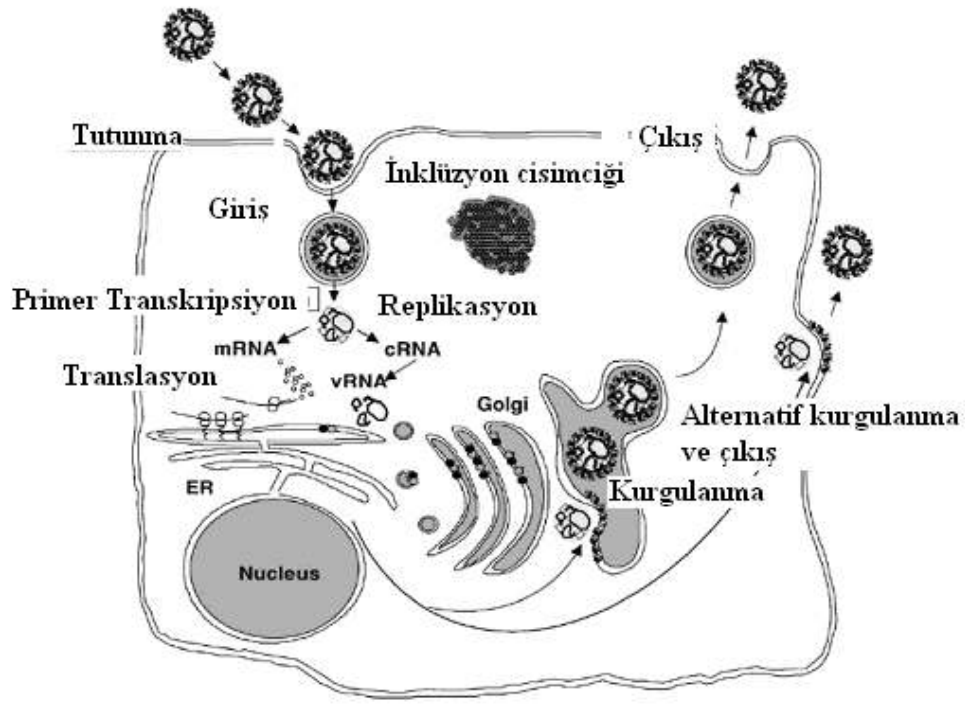
Virüsün transkripsiyonu enflüenza virüslerine benzer şekilde gerçekleşir. Viral endonükleazlar tarafından konak hücre mRNA'larından kesilen oligonükleotitlerin kalıp olarak kullanılmasıyla mRNA sentezi başlatılır. Böylece enfekte bir hücrede negatif anlamı viral RNA (vRNA), pozitif anlamı viral komplementer RNA (cRNA) ve pozitif anlamı mRNA olmak üzere üç tip farklı RNA oluşur. Pozitif polariteli mRNA'ların 5' uçlarında 12-18 bazlık primer sekanslar bulunurken 3' uçları kesilmiş haldedir. Viral genom kapsitten ayrıldıktan sonra negatif anlamı vRNA polimeraz ve transkriptaz aracılığı ile ilk olarak mRNA'ya transkripte edilir. Bu aşama primer transkripsiyon olarak adlandırılır. Primer transkriptlerin viral proteinlere transle edilmesinin ardından genom pozitif anlamı komplementer RNA (cRNA) ve daha sonra sekonder transkripsiyonla mRNA'ya sentez edilir. Bu cRNA'lardan oluşturulan vRNA'lar golgi veziküllerinden tomurcuklanarak serbest kalan projeni virüsler için genom segmentlerini oluştururlar. Yapılan bir çalışmada bu işlemlerin enfeksiyondan sonraki ilk 6 saat içinde gerçekleştiği gösterilmiştir (50). Golgiden tomurcuklanma ve olgunlaşma bunyavirüslerin genel bir özelliğidir. mRNA sentezi orthomyxovirüslerde olduğu gibi şapka çalma (cap snatching) mekanizması ile konakçı mRNA'larından alınan oligonükleotitler ile başlatılır. Birçok mRNA'nın aksine bunyavirüslerde poliadenilasyon yoktur (51).

Enfeksiyondan kısa bir süre sonra viral poliproteinler sentez edilmektedir. S segmenti tarafından kodlanan nükleoprotein yaklaşık 50 kDa büyüklüğe sahiptir ve 482 aminoasit uzunluğundadır. Nükleoprotein virüsle enfekte hücrelerde en

fazla miktarda bulunan viral proteindir. Nükleoprotein viral RNA ile interaksiyon halinde ve birlikte ribon kleokapsiti oluştururlar. Bu interaksiyon henüz tam anlamıyla açıklanamamıştır. Enfeksiyon esnasında öncül viral RNA'ların yokluğunda nükleoprotein aktin bağımlı yolağı kullanarak enfekte hücrelerin perin klear bölgesini hedef almaktadır (53, 54, 55, 56).

Viral glikoproteinlerin sentezi, proteolitik kesim işlemlerinin yapılabilmesi için kullanılan kaskadlar ve olgunlaşmış proteinlerin endoplazmik retikulumdan viral kurgulanmanın gerçekleştiği golgiye taşınması işlemi oldukça kompleks bir mekanizmadır. Gn'nin amino terminal ucunun oluşabilmesi için proteaz SKI-1'in poliproteini RRLL motifinden kesmesi gerekmektedir. Yine Gc'nin amino terminal ucunun oluşması için aynı proteazın RKPL motifinden keştiği düşünülmektedir. Gn oluşmasından sorumlu SKI-1 proteaz golgi ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadır, Lassa ve Arenavir slerde olduğu gibi KKKAH virüsünün glikoproteinlerinin oluşturulmasında da rol oynamaktadır (57, 58). Viral glikoproteinlerin katlanması, taşınması, tropizmi ve enfektivitesinin düzenlenmesinde glikolizasyon oldukça önemlidir. Yapılan bir çalışmada Gn'in ekstrasellüler bölgesinde bir, Gc'nin ekstrasellüler bölgesinde ise iki tane glikolizasyon bölgesinin bulunduğu ortaya konmuştur (59).

L segmenti tarafından kodlanan RdRP enzimi en büyük viral proteindir ve cRNA ve vRNA'ların replikasyon ve transkripsiyonundan sorumludur. Protein 3944 aminoasit uzunluğundadır ve N terminalinde OTU-like bölgesi ve ortasında katalitik bir bölge içermektedir (60).



Şekil 4. Virüsün replikasyon siklusu (51).

3.4. Epidemiyoloji

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı 30'dan fazla ülkede rapor edilmiştir (61). Hastalık kenelerle nakledilen ve insan sağlığını etkileyen virüsler arasında en yaygın görülen enfeksiyon, artropod kaynaklı virüsler arasında ise Dengue hummasından sonra en yaygın ikinci hastalık olarak belirtilmiştir (1). Türkiye'de ilk kez 2002 yılında görülmüş ve günümüze kadar toplam 6000'den fazla vaka bildirilmiştir (62,63) (Şekil 5).



Şekil 5. Türkiye’de KKKAH yönünden belirlenen risk bölgeleri

Hastalık diğer kene kaynaklı virüsler gibi kene-vertebrali-kene siklusunu izlemektedir (Şekil 6). Virüs sığır, koyun, keçi, tavşan, kirpi ve evcil köpeklerden izole edilmiş (64, 65, 66, 67) ve Asya, Avrupa, Afrika kıtalarında yapılan serolojik çalışmalarda at, eşek, koyun, keçi ve domuzlarda hastalığa karşı spesifik antikor tespit edilmiştir (68, 69, 70, 71).

Evcil ve yabani memeliler, herhangi bir klinik belirti göstermeden 7-10 günlük bir viremi dönemi geçirirler. Bu dönem, vektör keneler için enfeksiyon kaynağı oluşturması açısından, hastalığın epidemiyolojisinde çok önemlidir. Birçok evcil ve yabani omurgalıda gerek antikor cevabı ve gerekse viremi şekillenirken, deve kuşu hariç çoğu kuş türünün hastalığa karşı oldukça dirençli olduğu görülmüştür. KKKAH virüsü ile deneysel olarak enfekte edilen deve kuşlarında, inokulasyondan sonra 1-4 gün süren bir viremi şekillenmiş ve iç organlarda virüs tespit edilmiştir. Deneysel inokulasyon yapılan diğer kuşlarda antikor cevabı oluşmamıştır. Hatta bazı kuşlardan toplanan kenelerde virüs izole

edilmesine rağmen, hastalığa karşı antikor cevabı tespit edilememiştir (72). Kuşların virüs taşıyıcısı olarak hastalığın epidemiyolojisinde herhangi bir rolleri yoktur. Ancak yerden beslenen kuşlar, vektör kenelerin immature dönemlerine konaklık yaptıkları için, hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadırlar (73).

Keneler ile nakledilen viral hastalıklar içinde KKKAH en geniş yayılış alanına sahiptir. Vektör keneler, hastalığı nakletmeleri yanında, virüsün doğadaki esas rezervuarı olmaları bakımından da önemlidirler (74). Evcil ve yabani hayvanlar virüsü ancak 7-10 gün kadar barındırabilirler. Oysa virüs, kenelerde ömür boyu (1-1.5 yıl), hatta nesiller boyu kalmakta ve kenenin bütün doku ve organlarında çoğalabilmektedir. Virüs şimdiye kadar *Ixodidae* ve *Argasidae* ailelerine mensup 31 kene türü ile bir sinekten (*Culicoides* spp.) izole edilmiştir (75, 76). Ancak bunlardan bazılarının, özellikle argasid kenelerin (*Ornithodoros savignyi*, *Argas walkerae*) vektörlük kabiliyeti bulunmamakta, diğer bazı türlerin ise bu özellikleri bilinmemektedir. Bir kenenin gerçek manada vektör olabilmesi için, gelişme safhasının herhangi bir döneminde, viremik konaktan kan emerken virüsü alabilmesi ve müteakip safhada kan emdiği konağa virüsü verebilmesi gerekir. KKKAH virüsü vektör keneler tarafından hem transtadial hem de transovarial nakledilir. Keneler arasında veneral bulaşma da görülmektedir (74). Hastalığın insanlara bulaşmasında, özellikle *Hyalomma* türleri önemli bir yer tutmaktadır (74). Bugüne kadar KKKAH virüsü için bazı kene türlerinin vektörlük potansiyeli kanıtlanabilmiştir. Bunlardan *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* ve *Dermacentor marginatus* ülkemizde de yaygın olarak bulunan kene türlerindendir (1). Akdeniz

Hyalomma'sı olarak bilinen *H. m. marginatum* Avrupa'da KKKAH virüsünün esas vektörü olarak bilinmektedir (77).

Hastalığın keneler vasıtası ile insanlara bulaşmasında temel yol, enfekte kenenin konaktan kan emmesi esnasında tükürük salgısı ile birlikte virüsü konağa nakletmesi ile olmaktadır. Bulaşma, enfekte kenelerin çıplak elle toplanması esnasında patlaması veya ezilmesi durumunda da olabilmektedir. Bunun dışında virüs ile enfekte kenelerin el ile ezilmesi, viremik hayvanların kesimi esnasında vücut sıvıları ve dokuları ile temas, hasta insanların vücut sıvıları ile temas sonucu da bulaşma gerçekleşebilmektedir. Ayrıca nozokomiyal hastane enfeksiyonlarına da rastlanmaktadır (78, 79).



Şekil 6. KKKAH virüsünün doğadaki sirkülasyonu (2)

Kenelerle bulaşan hastalıkların yayılışı belli arazi yapıları ve iklim ile sınırlıdır. Bu gibi hastalıkların doğal odakları zaman ve mekan içinde sabit olup,

keneler buralarda hem vektör, hem de hastalık etkenlerinin rezervuarı olarak işlev görürler (80). Bu odakların varlığı ve devamlılığı patojen-kene-omurgalı arasındaki biyolojik ve ekolojik ilişkilere bağlıdır. KKKAH keneler ile nakledilen viral hastalıklar içinde en geniş yayılış alanına sahiptir. Doğu Avrupa, Ortadoğu, Asya ve Afrika'da 30'a yakın ülkede viral izolasyon ve/veya klinik vaka bildirilmiştir. Fransa, Portekiz, Mısır ve Hindistan gibi bazı ülkelerde ise serolojik bildirimler yapılmıştır.

İklim değişiklikleri kene popülasyonunun artmasına yol açmakta ve hastalığın insidensini arttırmaktadır (25). Kuzey yarımkürede *Hyalomma marginatum marginatum* türü keneler Nisan-Mayıs aylarında aktiftirler ve olgunlaşmamış keneler Eylül ayına kadar aktif kalırlar. Bölgesel sıcaklık değişimleri kenelerin aktif olduğu aylarda değişikliğe yol açabilir. Ayrıca tarım yapılan alanlarda meydana gelen coğrafi değişiklikler, göçmen kuşlar ve büyükbaş hayvan ithalatı hastalığın coğrafi dağılımını etkilemektedir (Şekil 7).



Şekil 7. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının coğrafik dağılımı (26).

3.5. Viral Patogenez

Viral kanamalı ateşlerin patogenezleri benzerlik göstermektedir. Viral kanamalı ateş etkenleri arasında her bir etkenin patofizyolojisi farklılıklar göstermektedir fakat mikrovasküler hasar ve hemostazın bozulması gibi temel özellikler görülmektedir. Viral kanamalı ateşlerde ölümlerin kanamaya bağlı olduğu düşünülmektedir ancak ölümden genellikle septik şok ve çoklu organ yetmezliği sorumludur (81).

Virüs vücuda girdikten sonra ilk olarak bölgesel lenf bezlerinde ve lokal dokularda çoğalır. Daha sonra lenf ve monositler yoluyla başta dalak, karaciğer, lenf bezleri, akciğer, adrenal bezler ve endotel olmak üzere vücuda yayılır. Enflamatuvar hücre infiltratları genellikle mononüklear hücreler ve nötrofillerdir. Bağışıklık hücrelerinden özellikle makrofajların ve endotel hücrelerinin doğrudan

ya da dolaylı medyatör etkileşimi sonucunda hücre aktivasyonu başlatılır ve enflamatuar ve vazoaktif süreç tetiklenir (82).

Patogeneizde endotel enfeksiyonu en önemli basamaktır. Endotel hasarı dolaylı olarak virüsün aktive ettiği konak kökenli faktörlerin aracılığıyla veya doğrudan virüsün endotel hücresinde üremesiyle şekillenir. Endotel hasarı trombosit agregasyonu ve degranülizasyonun uyarılmasıyla intrinsek koagülasyon kaskadını aktive ederek hemostatik yetmezliğe yol açar. Dissemine intravasküler koagülasyon hastalığının ilk bulgularından biridir ve ölen hastalarda belirgin olarak gözlenmektedir (83).

Doku hasarı enfekte olan hücrelerin doğrudan nekrozu veya dolaylı olarak hücrelerin apoptozu yoluyla gerçekleşir. Ayrıca yapılan çalışmalarda reaktif hemofagositozun patogeneizde önemli bir oynadığı ve ölen hastalarda IL-1, IL-6 ve TNF- α düzeylerinin hastalığı atlatanlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Proinflammatuar sitokinlerin dissemine intravasküler koagülasyon skoru ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (83).

Akıncı ve ark. ile Kuşçu ve ark. yaptıkları çalışmalarda şiddetli hastalarda lökosit adezyon molekülü (ICAM-1) ve çözünebilir vasküler adezyon molekülü (SVCAM-1) seviyelerinde artış saptamışlardır (84, 85).

KKKAH viral RNA'sının 5' ucunun işlenmesi sırasında retinoik asit inducible gene 1 (RIG-1) stimülasyonunu geciktirdiği ve IFN transkripsiyonunu engellediği belirlenmiştir. Virüsün dendritik hücrelerden antijen sunum mekanizmasını yavaşlattığı ve T hücre yanıtını geciktirdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak adaptif ve innate immün sistem yanıtındaki gecikmeler viral üremenin kontrol altına alınmasını önlemektedir. Viral üremedeki artış neticesinde

karaciğer ve dalak gibi organlarda hücre lizisine bağlı nekrozlar şekillenmektedir. İmmun yanıt disfonksiyonu sonucu şiddetli sitokin uyarımı oluşmakta ve çoklu organ yetmezliğine ve septik şoka bağlı ölümler gerçekleşmektedir (86, 87, 88).

3.6. Klinik Bulgular

Klinik belirtiler başlangıçta spesifik değildir. Genel olarak halsizlik, yaygın kas ağrıları, baş ağrısı, ateş, göğüs ağrısı ve abdominal hassasiyet görülmektedir. Ciddi seyirli vakalarda vasküler bozukluklar ve kanama şekillenir. Vasküler bozukluklar konjunktival kızarıklık, ödem, hipotansiyon, şok ve proteinüri ile seyreder. Kanamalar hematemez, melena, hematokezya, metroraji, purpura, peteşi, epistaksis, hemoptizi ve hematüri şeklinde görülür. Hastalığın ilk 48 saatinde genellikle kanamaya rastlanmaz (89, 90).

Klinik seyir diğer viral kanamalı ateşlerde olduğu gibi oldukça hızlı gelişir ve 7-10 gün içinde ölümlerle sonuçlanabilir. Kötü prognoz indikatörleri şok, kanama, uyku hali, yüksek viral yük ve AST seviyesindeki artış olarak belirlenmiştir (91).

Hastalığın tipik klinik seyri inkübasyon, prehemorajik evre, hemorajik evre ve konvelasan evre olmak üzere 4 bölümden oluşmaktadır.

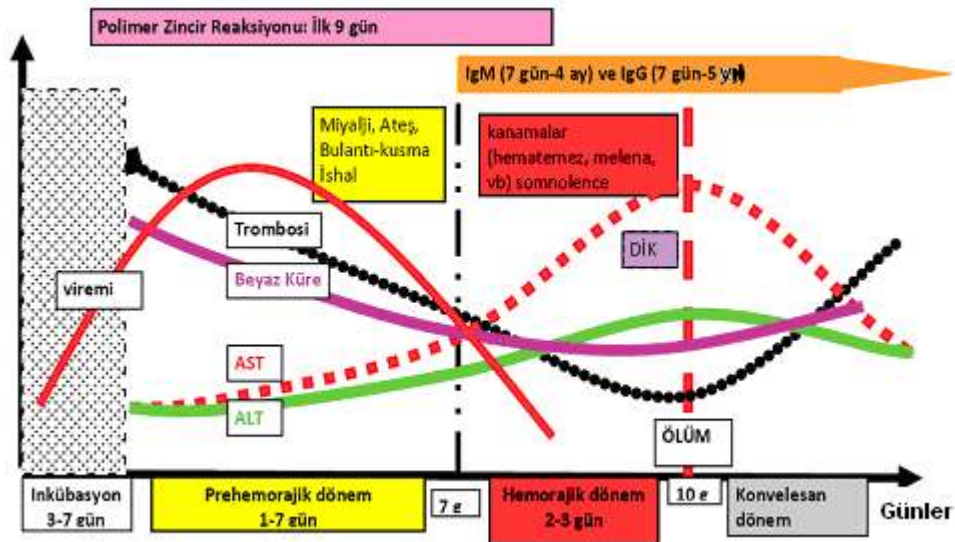
İnkübasyon dönemi ilk 3-7 günlük dönemdir ve enfeksiyona maruz kalma yoluna göre değişiklik göstermektedir. Türkiye’de bu süre ortalama 5.5 gündür.

Prehemorajik dönem ani ateş yükselmesi, miyalji, baş dönmesi ve baş ağrısı ile karakterizedir. Ateş yaklaşık 4-5 gün bifazik olarak devam eder. Bu dönemde yüz, boyun ve göğüste hiperemi görülür. Prehemorajik dönem 1-7 gün devam eder.

Hemorajik dönem hastalığın yaklaşık 3-5. gününde başlar ve kısa süreli devam eder. Kanama bulguları küçük peteşiler ile yaygın hematomlar arasında değişkenlik gösterir.

Konvelesan dönem hastalığın görülmesinden 10-20 gün sonra başlar. Bu dönemde değişken nabız, taşikardi, geçici saç dökülmesi, polinörit, solunum güçlüğü, zayıf görme, geçici işitme ve hafıza kaybı bildirilmiştir ancak bu bulguların hiç birine Türkiye’de rastlanmamıştır. Hastalığın nüksetmesi söz konusu değildir.

Trombositopeni enfeksiyonda kesin olarak bulunmaktadır. Lökopeni, aspartat transferaz (AST), alanin transferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), kreatinin fosfokinaz seviyelerinde artış görülmektedir. Protrombin zamanı ve aktif tromboplastin zamanı uzamıştır. Fibrinojen düzeyinde azalma görülebilir (92, 93, 94, 95) (Şekil 8).



Şekil 8. KKKAH'nın klinik seyri. (83)

3.7. Tedavi

KKKAH'nın spesifik bir tedavisi yoktur (2). KKKAH'da tedaviye yaklaşım genel olarak destekleyici tedavi, hastanın koagülasyonun durumunun monitörize edilmesi, gerekli koagülasyon faktörlerinin takviyesi ve ribavirin kullanımı olarak sayılabilir (96). Ribavirin ilk kez 1972'de Sidwell *ve ark.* tarafından elde edilmiş bir sentetik purin nükleosit analogu ve modifiye bazlı bir D-riboz şekeridir (97). Ribavirin'in pek çok DNA ve RNA virüsü üzerinde replikasyonu önleyici etki yaptığı bilinmektedir. Aynı şekilde KKKA hastalarında ribavirin uygulamasında başarılı sonuçlar alınmıştır. Güney Afrika'da 1985 yılında nozokomiyal bulaşmaya maruz kalmış hastalarda tedavide intravenöz ribavirin kullanımı rapor edilmiştir (98). Fisher-Hoch *ve ark.* 1995'de nozokomiyal bulaşmaya maruz kalmış üç hastada tedavi amaçlı oral ribavirin uygulaması yapmışlardır. Hastalara altı gün boyunca oral yolla ribavirin uygulaması yapılmış ve son doz uygulandıktan 48 saat sonra hastaların klinik skorları normale dönmeye başlamıştır (99).

Ergönül *ve ark.* 2004 yılında 35 KKKAH vakasında oral ribavirin uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Toplam 35 vakanın 30 tanesi Swanepoel kriterine göre şiddetli vaka olarak gruplandırılmıştır (100, 101). Sekiz vakada oral ribavirin uygulaması yapılmış ve bu vakalarda ölüm gözlenmemiştir. Tedavi edilmeyen vakalarda % 4,5 mortalite gözlenmiştir. Bu mortalite oranı Swanepoel kriterine göre öngörülenden daha düşük olduğu için gruplandırma revize edilmiş ve serum AST ve ALT seviyeleri 700 U/L'nin üzerindeki hastalar da şiddetli hasta grubuna dahil edilip toplam 54 vaka üzerinde çalışma tekrarlanmıştır. Fakat yine de tedavi edilmeyen hastalardaki mortalite oranı değişmemiştir.

KKKAH vakalarında ribavirinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İlacın immunmodülatör etkisinin olduğu düşünülmüş fakat bu konu ile ilgili detaylı bir çalışma yapılmamıştır. Ölümle sonuçlanan vakalarda IL-6 ve TNF- α seviyeleri diğer vakalara göre artış göstermiş fakat IL-10 seviyelerinde belirgin bir farklılık görülmemiştir. Hastalığın erken döneminde ribavirinin kortikosteroidlerle birlikte kullanıldığında daha etkili olduğu görülmüş fakat bu konuyla ilgili sadece bir çalışma yapılmıştır (86).

Tedavide hastalara destekleyici terapi uygulanması önemlidir. Kanamanın kontrol altına alınabilmesi için histamin reseptör blokörlerinin kullanılması, sıvı ve elektrolit dengesinin sürekli olarak izlenmesi, trombosit solüsyonlarının verilmesi ve taze donmuş plazma enjeksiyonunun yapılması gerekmektedir.

In vitro ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar tip 1 interferonların pek çok hemorajik hastalıkta olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir, fakat KKKAH ile ilgili böyle bir klinik çalışma henüz yapılmamıştır. Ancak bazı *in vitro* çalışmalarda MxA proteinin pek çok virüs üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. MxA proteininin enfekte hücrelerin perinükleer bölgelerinde birikerek KKKAH virüsünün nükleokapsit proteini ile interaksiyona girdiği ve sonuçta viral replikasyonun engellendiği düşünülmektedir. Ayrıca ISG-20, P56, RNA-spesifik adenoazin deaminaz 1 ve guanilat bağlayıcı protein gibi bazı önemli proteinlerin de antiviral etkili olduğu belirlenmiştir. Mirazimi ve ark. yaptıkları bir çalışmada ISG-20 proteinin KKKAHV üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuşlar fakat bu etkinin mekanizması henüz tam olarak gösterilememiştir (102).

3.8. Teşhis

Hastalığın erken teşhisi hem hastanın yaşama şansının artması hem de nozokomiyal enfeksiyonların engellenebilmesi açısından oldukça önemlidir. Klinik açıdan hastalığın erken teşhisi oldukça zordur. Vücut ısısındaki ani artış, grip benzeri semptomlar, endemik bölgelerde kene ile veya evcil hayvanlarla temas ve hastanede potansiyel hastalarla bir arada bulunmak KKKAH şüphesini akla getirmelidir (103). Fakat hastalığın erken dönemleri benzer semptomlarla seyreden leptospirozis, Omsk kanamalı hastalığı, sarıhumma, kene tifusu ve Ebola gibi hastalıklarla karışabilir. Klinik vakalarda lökopeni ve trombositopeni tablosu klinik teşhiste yararlı olabilmektedir (104).

Hastalığın laboratuvar teşhisinin yapılabilmesi için virüs izolasyonu, viral genomun RT-PCR ile deteksiyonu, antijen ELISA testi ile viral antijenin görüntülenmesi, serokonversiyonun gösterilmesi, spesifik IgM'lerin saptanması ve ELISA testi gibi serolojik testlere ihtiyaç vardır (105, 106).

Virüs izolasyon çalışmaları yüksek güvenlik düzeyine sahip laboratuarlarda yapılmalıdır. Virüs izolasyonu geleneksel olarak, enfekte kenelerden elde edilmiş havuz örnekleri veya akut hasta kanlarının yeni doğmuş farelere intrakraniyal veya intraperitoneal yolla inokülasyonu ile yapılmaktadır. Hücre kültüründe izolasyon daha basit ve hızlıdır fakat diğer metoda göre daha az hassastır (107). Virüs LLC-MK2, BHK-21, Vero ve SW-13 hücre tiplerinden izole edilebilmektedir. Virüs izolasyonu hücre kültüründe 4-7 günlük inkübasyondan sonra yapılmaktadır (108). Fakat hücre kültürünün hassasiyeti düşük olduğundan izolasyon yapılabilmesi için hastalığın ilk 5 günündeki hastalardan alınmış yüksek viremi dönemindeki örneklerle ihtiyaç vardır (109).

Hücre kültüründe KKKAHV ya çok az sitopatik etki göstermekte ya da hiç göstermemektedir. Hücre kültüründe virüs izolasyonu yapıldıktan sonra spesifik monoklonal antikorlar veya poliklonal antikorlar kullanılarak yapılan indirekt immunfloresan testi ile virüs identifikasyonu yapılabilir.

Hastalığın teşhisi için en yaygın kullanılan metotlardan biri tersine transkripsiyon PCR (RT-PCR) testidir. RT-PCR testi ile viral nükleik asit belirlenebildiği için oldukça spesifiktir ve virüs izolasyonu için gerekli olan yüksek güvenli laboratuvar şartlarına ihtiyaç yoktur. RT-PCR testi çok yüksek duyarlılık göstermekte ve hücre kültürü negatif bazı örneklerden RT-PCR ile pozitif sonuç alınabilmektedir. Ayrıca bu metot geriye yönelik olarak dondurulmuş klinik örneklerde de uygulanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada enfektif virüs titresi 7. günden sonra tespit edilemeyen bir hastadan hastalığın 16. gününde alınmış serum örneğinden viral RNA saptanmıştır (110).

RT-PCR testinin hücre kültüründen virüs izolasyonuna önemli bir avantajı da hızlı sonuç vermesidir. Klinik örnekler laboratuara ulaştıktan 8 saat sonra sonuç alınabilmektedir. Ayrıca bu metot sayesinde elde edilen cDNA örnekleri sekanslama çalışmaları için kullanılabilir. Bu da virüsün filogenetik çalışmalarının yapılabilmesi açısından önemlidir.

Konvensiyonel PCR tekniklerinin yanı sıra real-time PCR testi de hastalığın hızlı teşhisi için kullanılmaktadır. Real-time PCR testinin düşük kontaminasyon riski, konvensiyonel PCR testlerine göre daha hızlı sonuç vermesi ve kantitatif olarak virüs miktarının ortaya konulması gibi avantajları vardır.

KKKAHV'nün serolojik tanısının yapılabilmesi için 1980 yılından beri komplement fiksasyon, immundifüzyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testi gibi

testler uygulanmış fakat bu testler hassasiyet ve uygulanabilirlik açısından yeterli görülmemiştir (111, 112). Yine aynı şekilde nötralizan antikor miktarını doğru bir şekilde tespit edebilecek bir test geliştirilmemiştir. Bu problem indirekt immunfloresan testlerinin geliştirilmesiyle çözülmüştür. Spesifik IgM varlığı hastalığın ortaya çıkışından sonraki ilk 3 gün içerisinde belirlenememektedir (113). Hastalığın 4. ve 5. gününde hastaların %10'unda, hastalığın 6. gününde % 65'inde, 7. gününde % 83'ünde, 8. gününde % 94'ünde ve 9. gününde tüm hastalarda saptanabilmektedir (114). IgM yanıtı 2-3 hafta içerisinde maksimum seviyeye ulaşmakta ve 5. ayda belirlenebilir düzeyin altına düşmektedir. IgG yanıtı 4. ayda azalmakta fakat 5 yıl boyunca belirlenebilir seviyede kalmaktadır (115).

IgM ve IgG'lerin belirlenebilmesi için ELISA testleri de kullanılmaktadır. Spesifik IgM yanıtı hastalığın ortaya çıkışından 4 gün sonra kanda belirlenebilmektedir. Saluzzo *ve ark.* 1987 yılında KKKAH'nın hızlı teşhisi amacıyla virüs spesifik IgM'leri belirleyebilen ELISA testini geliştirmişlerdir. Bu teknik 2005 yılında Bouloy *ve ark.* tarafından modifiye edilmiş, spesifik IgM ve IgG'lerin saptanabilmesi için Semliki Forest suicide virüs tabanlı rekombinant KKKAH antijenleri kullanılmıştır. Saijo *ve ark.* spesifik IgM ve IgG tespiti amacıyla Baculovirüs sisteminde ürettikleri KKKAH rekombinant nükleoproteini (rNP) kullanmışlardır.

KKKAH'nın teşhisi amacıyla antijen belirlemeye yönelik ELISA testi ilk kez 1993 yılında tarafından kullanılmıştır. Logan *ve ark.* bu çalışmada yakalayıcı antikor olarak koyun serumu, detektör antikor olarak ise fare anti-KKKAH hiperimmun asites sıvısı kullanmışlardır. Daha sonra 2005 yılında Saijo *ve ark.* bu

tekniği modifiye etmişler ve yakalayıcı antikör olarak monoklonal antikör kullanmışlardır. Geliştirilen testin hassasiyeti nested PCR ile karşılaştırılmış ve daha düşük bulunmasına rağmen testin özellikle akut dönemde alınan hasta serumlarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

3.9. Amaç

Birleşik Devletler Salgın Koruma ve Kontrol Merkezi (USCDC) Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı virüsünü yüksek güvenliikli laboratuvar patojeni olarak sınıflandırmıştır. Avrupa’da 2008 yılı itibariyle 1’i Türkiye’de, 14’ü Avrupa Birliği’ne üye ülkelerde ve 8’i Rusya’nın endemik bölgelerinde olmak üzere 20’den fazla laboratuvar hastalığın teşhisini yapabilmektedir. Ancak bu laboratuvarların sadece sekiz tanesi virüs izolasyonu için gerekli biyogüvenlik şartlarını taşımaktadır. Diğer laboratuvarlarda hastalığın teşhisi için immunflorasan testi (IFA), enzime bağı immun test (ELISA) ve RT-PCR gibi moleküler teşhis yöntemleri kullanılmaktadır. Bazı endemik bölgelerde hastalığın teşhisini yapabilecek kapasitede laboratuvarların bulunmamasının yanısıra bu bölgelerden numunelerin uluslararası transferini zorlaştıran ekonomik ve lojistik sebepler de hastalığın teşhisini sınırlandırmaktadır.

Hastalığın erken teşhis edilmesi, tedaviye erken başlanması ve nozokomiyal enfeksiyonların önüne geçilebilmesi yönünden kritik önem taşımaktadır. Ülkemizde Mart 2004 – Ağustos 2008 tarihleri arasında hastalığa yakalanan 140 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada, hastalığın mortalite oranının teşhisteki gecikmelere bağı olarak arttığı belirlenmiştir (116).

Hastalık, virüs miktarına ve maruz kalma yoluna göre değişmekle birlikte genellikle 3-7 gün gibi kısa bir inkübasyon periyoduna sahiptir. IgG ve IgM antikor titrelerinin ELISA testiyle belirlenebilmesi için hastalık başlangıcından itibaren yaklaşık 7 günlük bir süre geçmesi gerekmektedir. Ancak bu süre içerisinde kan ve serum örneklerinde viral antijen tespit edilebilmektedir. Bu yüzden hastalığın erken teşhisinin yapılabilmesi için antijen belirlemeye yönelik testler önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada insanlarda antikor belirlemeye yönelik testlerin yanı sıra antijen belirlemeye yönelik olan sandviç ELISA testinin geliştirilip standardize edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca virüsün doğadaki döngüsünde ve enfeksiyon zincirinde önemli bir yeri olan sığır, koyun, keçi gibi hayvanlarda ve fare, tavşan gibi laboratuvar hayvanlarında serolojik teşhis yapılabilmesi için antikor saptamaya yönelik ELISA metotlarının geliştirilip standardize edilmesi amaçlanmıştır.

KKKAH'ına karşı hızlı ve spesifik teşhis metotlarının geliştirilmesi, öngörülen tedavi yöntemlerine zaman kaybetmeden başlanabilmesi ve nozokomiyal bulaşmanın önüne geçilebilmesi açısından önemli bir avantaj sağlayacaktır. Böylece endemik bölgelerde tedaviye geç başlanması neticesinde görülen mortalite artışları kısmen de olsa engellenmiş olacaktır. Ayrıca enfeksiyon zincirinde yer alan yabani ve evcil hayvanlarda virüsün serolojik olarak teşhisinin yapılması epidemiyolojik açıdan risk alanlarının belirlenmesinde ve bu risk alanlarında koruyucu önlemlerin alınmasında oldukça önemli bir avantaj sağlayacaktır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. KKKAH Karşı Antijen ELISA Testinin Geliştirilmesi

4.1.1. Virüs Çoğaltılması

Virüs üretimi amacıyla 2006 yılında Türkiye Kelkit vadisinden izole edilen Turkey-Kelkit06 KKKA virüs suşu olarak kullanıldı. Bu amaçla 1-2 günlük Balb-C yavru farelere intrakraniyal yolla verilerek 3 kez pasajı yapıldı. Enfeksiyondan sonra günlük olarak fareler gözlemlendi ve klinik belirti gösterenler ölümler şekillenmeden hemen önce servikal dislokasyonla ötenazi edilerek aseptik şartlarda beyinleri çıkartıldı. Her bir fare beyini 1200 µl %2 FBS (Sigma, F2442) ve %1 antibiyotik (Sigma Cat. A5955) içeren DMEM F-12 HAM (Sigma, D8900) ile homojenize edildi ve -80 °C’de saklandı. Daha sonra fare beyinleri buz kabında çözdürülerek beyin homojenatları +4 °C’de 1200 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatantlar 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine (USA Scientific, 1615-5500) 1’er mililitre olacak şekilde transfer edilerek tekrar -80 °C’de ana stok olarak saklandı.

4.1.2. Hücre Kültüründe Viral Antijenlerin Üretimi

Diagnostik testlerde kullanılmak üzere fare beyininden izole edilen virüs Vero E6 hücresine adapte edildi. Vero E6 hücreleri %10 FBS, %1 antibiyotik içeren 25 ml DMEM F-12 HAM ile 37 °C’de %5 CO₂ etüvlerinde 175 cm² flasklarda (Corning, CLS431079) üretildi. Monolayer olan Vero E6 hücrelerinin vasatları dökülerek bir kez 3 ml Trypsin EDTA ile yıkandıktan sonra 5 ml Trypsin EDTA ilave edilerek 37 °C’de 3 dk hücrelerin flasksın tabanından ve birbirlerinden ayrılmalrı için bekletildi. Hücreler 10 ml hücre üretme vasatı ile

flask içerisinde pipete edilerek 15 ml'lik santrifüj tüplerine transfer edildi ve 1000 rpm'de 5 dk oda ısısında santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 1 ml hücre üretme vasatı ile pipete edilip homojenize edildi. Tekrar hücre üretme vasatı ilave edilerek 10 ml'ye tamamlandı. Hücreler Trypan-blue ile 1:10 oranda dilüe edilerek 10 µl hücre süspansiyonu alınıp hücre sayım çemberinde (Kova Glasstics Urinalysis System, HYCOR, 877155) invert mikroskopta (Olympus, CKX41SF) sayıldı. Hücreler her bir 175 cm²'lik flaska 6x10⁶ sayıda hücre olacak şekilde 25 ml hücre üretme vasatı içerisinde 2 adet 175 cm²'lik flaska dağıtıldı. Pasajdan 16 saat sonra % 80 monolayer olan Vero E6 hücrelerin ürettiği vasat atıldı ve titresi bilinen virüsten her flaska 5 ml DMEM F-12 içerisinde 0.01 MOI oranında virüs dilüe edilip adsorbsiyona bağlı yöntem ile 37 °C'de %5 CO₂ inkübatörde 10 dakika aralıklarla flasklar çalkalanarak 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra inokülüm atılıp 20 ml virüs üretme vasatı (%3 FBS, %1 antibiyotik, DMEM F-12) eklendi. Tekrar 37 °C'de %5 CO₂ inkübatöre bırakılan flasklar günlük olarak mikroskop altında incelenerek hücrelerin %70'i parçalanıncaya kadar bekletildi ve -80 °C'ye kaldırıldı.

4.1.3. Pseudo-plak Titrasyon Testi

Bir gün önceden 24 kuyucuklu pleyte (Costar, 3524) Vero E6 hücreleri hücre üretme vasatı [(%10 FBS (Sigma, F2442), %1 antibiyotik (Sigma, A5955), DMEM F-12 HAM (Sigma Cat.D8900)] içerisinde kuyucuk başına 20x10⁴/ml geçildi. Yedi adet santrifüj tüpü (USA Scientific, 1615-5500) işaretlenerek bütün tüplere sulandırma solüsyonu olarak 0,9 ml DMEM F-12 ilave edildi. Titresi hesaplanacak virüs stoğundan 0,1 ml alınarak ilk tüpe eklendi ve vortekslendi.

Birinci tüpten 0,1 ml alınarak ikinci tüpe ilave edildi, bu şekilde log 10 tabanında 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar virüsün seri sulandırılmaları yapıldı. Hücrelerdeki üretme vasatı alındı ve önce hücre kontrolden başlanarak en yüksek sulandırmadan en düşük sulandırmaya doğru monolayer olan hücrelerin üzerlerine her sulandırma için dörderli olmak üzere kuyucuklara 0,2 ml dilüe edilmiş virüs ekimi yapıldı. İki kuyucuğa virüs kontrol olarak dilüe edilmemiş virüsten, 2 kuyucuğa da hücre kontrol olarak sadece sulandırma solüsyonundan 0,2 ml geçildi. Pleyt 37°C , %5 CO_2 inkübatöre konulup 1 saat süreyle ve 15 dakika aralıklarla çalkalanarak adsorbsiyona bağlı ekim yapıldı. Enfeksiyon sonunda kuyucuklardaki inokulum atıldı ve 37°C 'deki benmaride ısıtılan %1 karboksi metil selüloz (%2 karboksi metil selüloz (Sigma, 9481) dH_2O içerisinde 300°C ısıtıcıda (Fisher Scientific, 11-300-49SHP) 500 rpm hızda karıştırılarak çözdürüldü ve 121°C 'de 15 dakika süreyle otoklav edilerek hazırlandı, 37°C 'ye ısıtılmış 2X yoğunlukta hazırlanan DMEM F-12 ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra (%3 FBS ve %1 antibiyotik ilave edildi) her kuyucuğa 1ml eklendi ve pleyt 37°C %5 CO_2 inkübatöre konuldu.

Enfeksiyondan sonraki 4. günde pleyte %10 nötral buffer formalin solüsyonundan (4 gr sodyum fosfat monobazik (Merck, K91348245 738), 6.5 gr sodyum fosfat dibazik (Sigma, S0876), 100 ml %37'lik formaldehit (Sigma F8775), 900 ml dH_2O , pH 6.8) 0.5 ml konuldu ve hücreler oda ısısında 20 dakika fikse edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki solüsyon uzaklaştırıldı ve hücreler 1ml PBS (Amresco, E404-200 TABS) ile yıkandı. Kuyucuklara permeabilizasyon solüsyonundan (0,1% Triton X-100 (Sigma,T9284) PBS) 0,5 ml ilave edilip 4 kez 5 dakika süreyle oda ısısında 50 rpm hızdaki çalkalayıcıda

(IKA, KS2602980300) hücreler permeabilize edildi. Son permeabilizasyon işleminin ardından hücreler PBS içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozundan her kuyucuğa 0,5 ml ilave edildikten sonra 30 dakika oda ısısında çalkalayıcıda 50 rpm hızda inkübe edilerek bloklandı. Bloklamadan sonra hücreler 1ml PBS ile yıkandı. Poliklonal fare serumu TBST (10mM Tris-HCl pH 8,0 (Sigma, T3253), 150 mM NaCl (Merck, K92033000 546), 0,1% Tween-20 (Merck, S4662084636) içeren dH₂O) içerisinde 1/1500 oranında sulandırıldı ve her kuyucuğa 0,2 ml ilave edilerek oda ısısında çalkalayıcıda 50 rpm hızda 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklar 10 dakika aralıklarla üç kez TBST ile yıkandıktan sonra 1/1500 oranında TBST içerisinde sulandırılan Goat Anti-Mouse β -gal konjugat (Southern Biotech, 1010-06) ile 1 saat süreyle oda ısısında 50 rpm hızda çalkalayıcıda inkübe edildi. Hücreler tekrar TBST ile 10 dakika aralıklarla üç kez yıkandıktan sonra substrat solüsyonundan (5mM MgCl (Merck, S4845833 730), %99 dimetilformamid (Sigma, N6876) ile 50mg/ml olarak hazırlanmış X-Gal'dan (Sigma, B4252) 1/300, 70% dimetilformamid ile 83mg/ml olarak hazırlanmış NBT'den (Sigma, N6876) 1/300 oranında PBS içerisinde sulandırıldı) 0.2 ml her kuyucuğa ilave edildikten sonra 37 °C inkübatörde 15-30 dakika arasında inkübe edildi. Enfekte hücreler belirginleştikten sonra kuyucuklar dH₂O ile yıkandı ve çıplak gözle oluşan odaklar sayıldı. Titrenin hesaplanması için; sayılan odak ortalaması/inokülüm miktarı x dilüsyon oranı =ppfu/ml formülü kullanıldı (114, 117).

4.1.4. Viral Antijenlerin Konsantre Edilmesi

-80°C'ye kaldırılan flasklar çözdürüldükten sonra viral süpernatant 50 ml tüplere (Falcon, 2070) alınarak +4 °C'de 3000 rpm'de (Nüve, NF800R) 30 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre parçaları uzaklaştırıldı. Cam balon şişelere alınan toplam 200 ml vasat hacminin %15'i kadar olan %23 NaCl'den 30 ml, 230 ml olan final hacmin %10'u kadar PEG8000'den (Promega, V3011) 23 ml yavaşça ilave edildikten sonra +4 °C'de 16 saat süreyle 100 rpm'de karıştırıldı. SW28 ultrasantrifüj tüplere (Beckman, Polyallomer 326823) 38 ml olarak paylaştırılan viral süpernatant ve PEG karışımı +4 °C'de 12500 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü ve oluşan peletler her tüp için 500 µl 1X TEN buffer (10 X 0,1 Tris Cl (pH 8.0), 0.001 M EDTA (pH 8.0), 1 M NaCl) ile çözdürülüp tek tüpte birleştirildi. +4 °C'de 5500 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra oluşan ikinci süpernatant alındı. PEG ile çöktürülen virüs SW 41 rotora uyumlu ultrasantrifüj tüplerinde (Beckman, Ultraclear 344059) 12 ml'ye TEN buffer ile tamamlanarak +4°C'de 24000 rpm'de 2 saat süreyle ultrasantrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml TEN buffer ile pelet kırılmadan çözdürüldü.

4.1.5. Virüs İnaktivasyonu

Virüs inaktivasyonu amacıyla %37'lik formaldehit % 0.05 oranında (1:40 oranında PBS içerisinde sulandırıldıktan sonra 1:50 oranında kullanıldı) hücre kültüründen elde edilen virüse ilave edilerek 96 saat süreyle oda ısısında inaktive edilmiştir. Formaldehidin nötralize edilmesi için % 39 sodyum bisülfat (Merck, S6058956 018) %3,9 oranında inaktive edilen antijene ilave edildi. Formaldehit

ve sodyum bisülfat kalıntılarını uzaklaştırmak için 20.000 MWCO diyaliz kaseti (Thermo, 66003) kullanıldı. Beher içerisine virüs hacminin 500 katı kadar PBS konulup diyaliz kaseti 30 sn kadar ısıtıldıktan sonra içerisine 21 numaralı şırınga yardımıyla çöktürülen virüs aktarıldı. Kaset PBS içerisine daldırılıp karıştırıcı üzerine alındı. Oda ısısında 2 saat aralıklarla iki kez PBS değiştirilmesinden sonra kaset bir gece oda ısısında PBS içerisinde bekletilerek virüsün diyalizi gerçekleştirildi. İnaktif virüs kasetlerden alınarak Lowry testi ile protein miktarı ölçülüp -20 °C’de saklandı.

4.1.6. Lowry Testi

Antijen miktarlarının ölçülmesinde Lowry testi kullanıldı. Bu amaçla 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1, 2 ve 3 mg/ml BSA (Promega, DM2411) standartları hazırlandı. 96 kuyucuklu mikropleyte (Falcon, 353077) standartlar ve ölçülecek örneklerden 5 µl bırakıldı. Üzerlerine Reagent A’ dan (Biorad Dc Protein Assay, 500-0113) 20 µl, Reagent B’den (Biorad Dc Protein Assay, 500-0114) 200 µl eklendi ve pipete edilerek oda ısısında 15 dakika bekletildi. Kuyucuklardaki renk değişiklikleri standartlar ile karşılaştırılarak örneklerin protein miktarı kalitatif olarak belirlendi (118).

4.1.7. Tavşan İmmünizasyonları

Tavşanlardan hiperimmün serum elde etmek amacıyla iki adet Yeni Zelanda tavşanına 1’er hafta aralıklarla 13 hafta boyunca 100 µgr miktarında inaktive edilmiş KKKAH antijeni ile intramusküler olarak immünizasyon yapıldı. Her immünizasyondan önce tavşanlardan sedasyon altında kulak venasından

intravenöz yolla kan alındı. Sedasyon işlemi 15 mg/kg Xylazine (%2 enjeksiyonluk çözelti, Rompun, Bayer) kullanılarak gerçekleştirildi.

4.1.8. Tavşan Antikor Titrelerinin Belirlenmesi

Tavşanlardan her immünizasyondan 1 hafta sonra sedasyon altında 23G numara intraket sistemi kullanılarak kulak venasından kan alındı. Alınan kan örnekleri 5000 rpm'de 20 dakika santifüj edilerek serum elde edildi. Serum antikor titrelerini belirlemek amacıyla ELISA testi yapıldı. Vero E6 hücrelerinde üretilip inaktive edilen KKKAH antijeni 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine (Maxi Breakapart İmmunomodule, NUNC, 473768) kuyucuk başına 1 µgr hesabıyla pH 9.6 karbonat tampon solüsyonu (0.01 M Na₂CO₃ (Merck, A8366892) 0.05 M NaHCO₃ (Sigma, S5761)) kullanılarak bağlandı. Bağlanma işlemi 1 gece +4 °C de bırakılarak gerçekleştirildi. Bloklama işlemi için %0.05 PBS (Amresco, E404-200T) – Tween20 (Merck, S4662084) içinde hazırlanmış %5 süt tozu hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve 37 °C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra pleytlerdeki bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak 1 kez yıkama solüsyonu (%0.05 PBS-Tween20) kullanılarak yıkandı. Test edilecek tavşan serumlarının 100 µl bloklama solüsyonu içerisinde 1/50 sulandırmadan başlayarak log 2 tabanında seri sulandırmaları yapıldı. 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tavşan serumları pleytten uzaklaştırılarak 5 kez kuyucukların yıkaması yapıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl 1/5000 sulandırılmış Keçi-Anti tavşan konjugatı (Southern Biotech, 4030-05) eklendi ve 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra konjugat pleytten uzaklaştırıldı ve altı kez kuyucukların yıkaması yapıldı. Görüntüleme

amacıyla 4 ml 0,1 M Sitrik asit (Sigma, C0789) ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ (Sigma, S0876) içerisinde çözdürülmüş 3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine (Sigma, T3405) tablete 100 µl H₂O₂ (Sigma, H1009) ilave edildi ve hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra stop solüsyonu (0.2 N Sülfirik asit (100731, Merck)) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okutuldu.

4.1.9. Tavşan Antikorlarının Pürifikasyonu

Pürifikasyon işlemi MabTrap Kit (GE Healthcare, 17-1128-01) kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne göre önce 10X konsantre bağlama solüsyonu (GE Healthcare, 30-9838-01) distile su kullanılarak 1X çalışma solüsyonu haline getirildi. Yine 10X konsantre elüsyon solüsyonu (GE Healthcare, 30-9839-01) distile su ilave edilerek 1X çalışma solüsyonu elde edildi. Yüksek yoğunlukta antikor belirlenen haftalara ait serum örnekleri birleştirilerek havuz haline getirildi ve 0.45 µm Minisart filtre (Sartorius, 16555) kullanılarak filtre edildi. MabTrap Hi-Bind kolon 3 ml bağlama solüsyonu ile kalibre edildi ve filtre edilmiş toplam 10 ml serum örneği 5 ml'lik steril enjektör yardımıyla kolondan geçirildi. Bu işlemten sonra kolon 7 ml bağlama solüsyonu ile iki kez yıkandı. Sulandırma işlemi 3 ml elüsyon solüsyonu kullanılarak yapıldı. Son aşamada her bir ml elüsyon solüsyonu için 75 µl nötralizasyon solüsyonu (GE Healthcare, 30-9840-01) ilave edilerek elde edilen pürifiye antikor miktarı Lowry deneyi ile saptandı.

4.1.10. Tavşan Serumlarının İşaretlenmesi

Elde edilen pürifiye tavşan serumlarının horseradish peroksidaz (HRP) işaretlenmesi işlemi TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) kurumunda gerçekleştirildi.

4.1.11. İnsan Serumlarında KKKAH Antijeninin Belirlenmesi

Amacıyla ELISA Testi Geliştirilmesi

Pürifiye tavşan antikorları her bir kuyucuğa 200 ng miktarında karbonat tampon solüsyonu içerisinde bağlandı. Pleytler bir gece + 4°C’de inkübasyona bırakıldı. Bloklama işlemi için %0.05 PBS – Tween20 içinde hazırlanmış %5 süt tozu hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µl çok kanallı pipet yardımıyla bırakıldı ve 37 °C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra pleytlerdeki bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak bir kez 100 µl yıkama solüsyonu (%0.05 PBS-Tween20) ile yıkandı. Test edilecek serum örnekleri bloklama solüsyonu içerisinde 1/8 oranında sulandırıldı. Sulandırma işlemi için 12,5 µl serum alınarak bloklama solüsyonu ile 100 µl’ ye tamamlandı ve kuyucuklara geçildi. Serumlar bir saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra serumlar pleytten uzaklaştırılarak 5 kez 100 µl yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyucuğa bloklama solüsyonu içerisinde 1/500 oranında sulandırılan HRP ile işaretli pürifiye anti-KKKAH tavşan antikor konjugatından 100 eklendi ve 1 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra konjugat pleytten uzaklaştırıldı ve altı kez 100 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Görüntüleme amacıyla 3,3’,5,5’-Tetramehtylbenzidine tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözündürüldü ve 100 µl H₂O₂ ilave edildi. Hazırlanan

substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (0,2 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okutuldu.

4.2. İnsan Serum Örneklerinde RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonları QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, 52906) kullanılarak yapıldı. Kit protokolü uyarınca 140 µl serum örneğine 560 µl AVL solüsyonu ilave edildi, 15 saniye boyunca vortekslendi ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 560 µl saf etanol ilave edilip 15 saniye vortekslenerek karışımın homojen hale gelmesi sağlandı. Karışım QIAamp kolonlara alınarak 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kolona 500 µl AW1 solüsyonu eklenip 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı, daha sonra kolona 500 µl AW2 solüsyonu eklenip 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elüsyon amacıyla kolona 60 µl AVE solüsyonu eklenip 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek RNA elde edildi ve RNA’lar -20’de saklandı.

4.3. cDNA Elde Edilmesi

cDNA elde edilmesi amacıyla 10 µl viral RNA’ya 1 µl random primer (Promega, C118A) ilave edilerek 85 °C’deki su banyosunda, suyun ısısı 42 °C’ye düşene kadar inkübe edilerek primer bağlanması gerçekleştirildi. Daha sonra 5 µl MLV-RT buffer (Promega, M531A), 5 µl 5 mM dNTP miks (Promega, U1420), 1 µl RNasin (Promega, N251A) ve 1 µl Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Promega, M170B) dan oluşan miks ilave edilerek 42 °C’ye

ayarlanmış thermal cyclers (Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700) cihazında 1 saat inkübe edilerek cDNA'lar elde edildi ve kullanılıncaya kadar -20'de saklandı.

4.4. Real-time PCR Protokolü

Real-time PCR için tersine transkripsiyon işlemi ile elde edilen cDNA örnekleri kullanıldı. Reaksiyon miksi için 2.5 µl cDNA, 4 µl 5X Roche Sybergreen master miks, 6.3 µl distile su, 4 µl S genine spesifik primer çifti, 0.2 µl taqman probe kullanıldı ve örnekler Roche real-time cihazı kullanılarak test edildi.

4.5. Vectorbest Antijen ELISA Kit Protokolü

Çalışmaya başlamadan önce kit 30 dakika oda ısısında bekletildi. Kit içerisinde bulunan 5X sulandırma solüsyonu kullanılarak steril PBS ile 1X çalışma solüsyonu hazırlandı. Test edilecek serum örnekleri bu solüsyon ile 1/8 oranında sulandırılıp her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Inkubasyondan sonra kuyucuklar çalışma solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra kit HRP işaretli anti-CHF konjugatı çalışma solüsyonu ile 1/10000 oranında sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. 37 °C'de 1 saat inkubasyon işleminden sonra kuyucuklar çalışma solüsyonu ile 5 kez yıkandı ve her kuyucuğa 100 µl görüntüleme solüsyonu bırakıldı. Daha sonra 15 dakika karanlık ortamda beklenip durduma solüsyonu eklendi ve sonuçlar 450 nm'de ELISA okuyucuda okutuldu.

4.6. Kene Örneklerinde KKKAH Antijeninin Belirlenmesine Yönelik ELISA Testi Geliştirilmesi

Bu amaçla pürifiye tavşan antikorları mikro ELISA pleytlerine her bir kuyucuğa 200 ng miktarında karbonat tampon solüsyonu içerisinde bağlandı. Pleyt bir gece + 4 °C’de inkübasyona bırakıldı. Bloklama işlemi için protein içermeyen bloklama solüsyonu (Pierce, 37572) kullanılarak her bir kuyucuğa 200 µl bırakıldı ve 37 °C’de bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra pleytlerdeki bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak bir kez 100 µl yıkama solüsyonu (%0.05 PBS-Tween20) kullanılarak yıkandı. Test edilecek kene örnekleri ayrı ayrı sıvı azotta dondurulduktan sonra 200 µl PBS ile sulandırılıp ezildi. Hazırlanan örnekler +4 °C’de 10000 devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant test edilmek üzere kullanıldı. Elde edilen süpernatantlar 1/4 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılarak her bir kuyucuğa 100 µl geçildi. Pleyt bir saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra örnekler pleytten uzaklaştırılarak 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl 1/400 oranında sulandırılmış HRP ile işaretli pürifiye anti-KKKAH tavşan antikor konjugatı eklendi ve 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra konjugat pleytten uzaklaştırıldı ve 6 kez yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı. Görüntüleme amacıyla 3,3’,5,5’-Tetramehtylbenzidine tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözdürülerek 100 µl H₂O₂ ilave edildi. Hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Daha sonra 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (0,2 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okutuldu.

4.7. Kene Örneklerinde PCR Testi

PCR protokolü için 0,5 ml mikrosantrifüj tüplerine 10 µl 5X GoTaq buffer (Promega, M792A), 5 µl 5 mM MgCl₂ (Promega, A3511), 5 µl 1,25 mM dNTP miks, 4 µl 20 pmol F2-R3 primer miks, 26 µl dH₂O, 2 µl template cDNA ve örnek başına 1 U GoTaq polimeraz enzimi (Promega, M3001) konularak thermal cycler cihazına bırakıldı. PCR siklusları 95 °C’de 5 dakika ön ısıtma, 94 °C’ de 1 dakika denatürasyon, 56 °C’ de 1 dakika bağlanma ve 72 °C’ de 1 dakika uzatma olarak toplam 31 siklus olarak ayarlandı ve son uzatma işlemi için 72 °C’ de 15 dakika beklendi. PCR ürünleri %2 agaroz jelde etidiyum bromid boyama ile görüntülendi.

4.8. İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

İnaktive edilmiş KKKAH antijeni 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine kuyucuk başına 1 µgr miktarında pH 9,6 karbonat tampon solüsyonu içerisinde dilüe edilerek bağlanma işlemi için bir gece +4 °C de inkübasyona bırakıldı. Bloklama işlemi için %0.05 PBS – Tween20 içerisinde %5 süt tozu hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve 37 °C’ de bir saat inkübe edildi. Test edilecek insan serumları 100 µl bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında sulandırıldı. Bir saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra serumlar pleytten uzaklaştırılarak 100 µl yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µl 1/4000 oranında sulandırılmış tavşan anti-insan Fd spesifik konjugat (Southern Biotech, 2046-05) eklendi ve 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra konjugat pleytten uzaklaştırıldı ve altı kez yıkama

solüsyonu kullanılarak yıkandı. Görüntüleme amacıyla 3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine tableti 4 ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözdürüldü ve 100 µl H₂O₂ ilave edildi. Hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Daha sonra 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (0,2 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okutuldu.

4.9. Vector Best İndirekt ELISA Kit Protokolü

Çalışmaya başlamadan önce kit 30 dakika oda ısısında bekletildi. Kit içerisinde bulunan 5X sulandırma solüsyonu kullanılarak steril PBS ile 1X çalışma solüsyonu hazırlandı. Test edilecek serum örnekleri bu solüsyon ile 1/50 oranındada sulandırılıp her kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve 37 °C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyondan sonra kuyucuklar, kite ait çalışma solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra kit HRP işaretli anti-CHF konjugatı çalışma solüsyonu ile 1/5000 oranında sulandırıldı ve her kuyucuğa 100 µl bırakıldı. 37 °C'de 1 saat inkubasyon işleminden sonra kuyucuklar çalışma solüsyonu ile 5 kez yıkandı ve her kuyucuğa 100 µl görüntüleme solüsyonu bırakıldı. Daha 15 dakika karanlık ortamda beklenip durduma solüsyonu eklendi ve sonuçlar 450 nm'de ELISA okuyucuda okutuldu.

4.10. Sığır Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

İndirekt ELISA testi için Vero E6 hücrelerinde üretilip inaktive edilmiş KKKAH antijeni 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine kuyucuk başına 1 µgr oranında

pH 9,6 karbonat tampon solüsyonu kullanılarak dilüe edildi ve bağlanma işleminin gerçekleşmesi için +4 °C’de 1 gece bekletildi. Bloklama işlemi için %0.05 PBS – Tween20 içinde %5 süt tozu hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve 37 °C’ de bir saat inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra kuyucuklar 1 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve test edilecek sığır serumları bloklama solüsyonu içerisinde 1/100 oranında sulandırıldı. Bir saat 37 °C’de inkübasyondan sonra sulandırılmış serumlar pleytlerden uzaklaştırıldı ve pleytler 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra keçi anti-sığır konjugatı (Southern Biotech, 6030-05) bloklama solüsyonu içerisinde 1/2250 oranında sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Bir saat 37 °C’ de inkübasyondan sonra konjugat pleytlerden uzaklaştırıldı ve pleytler 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Görüntüleme işlemi için her bir kuyucuğa 100 µl SureBlue Reserve TMB solüsyonu (KPL, 110466) bırakılıp reaksiyonun gerçekleşmesi için karanlık ortamda 15 dakika beklendi ve durdurma solüsyonu eklenerek sonuçlar ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okutuldu.

4.11. Koyun Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

ELISA pleytine Vero E6 hücrelerinde üretilip inaktive edilen KKKAH antijeni kuyucuk başına 1 µgr miktarında 100 µl pH 9,6 karbonat tampon solüsyonu içerisinde +4 °C’de bir gece bağlandı. Bloklama işlemi için %0.05 PBS – Tween20 içinde %5 süt tozu hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve 37 °C’ de bir saat inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra kuyucuklar 100 µl yıkama solüsyonu ile 1 kez yıkandı ve test edilecek koyun serumları bloklama

solüsyonu içerisinde 1/400 oranında sulandırıldı. Bir saat 37 °C’de inkübasyondan sonra sulandırılmış serumlar pleytlerden uzaklaştırıldı ve pleytler 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra tavşan anti-koyun konjugatı (Southern Biotech, 6150-05) bloklama solüsyonu içerisinde 1/4000 oranında sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Bir saat 37 °C’ de inkübasyondan sonra konjugat pleytlerden uzaklaştırıldı ve pleytler 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Görüntüleme işlemi için her bir kuyucuğa 100 µl SureBlue Reserve TMB solüsyonu (KPL, 110466) ilave edilip reaksiyonun oluşması için karanlık ortamda 15 dakika bekletildi ve durdurma solüsyonu eklenerek sonuçlar ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunca okutuldu.

4.12. Keçi Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

ELISA pleytine Vero E6 hücrelerinde üretilip inaktive edilen KKKAH antijeni kuyucuk başına 1 µgr miktarında 100 µl pH 9,6 karbonat tampon solüsyonu içerisinde +4 °C’de bir gece bağlandı. Bloklama işlemi için %0.05 PBS – Tween20 içinde %5 süt tozu hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve 37 °C’ de bir saat inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra kuyucuklar 100 µl yıkama solüsyonu ile 1 kez yıkandı ve test edilecek keçi serumları bloklama solüsyonu içerisinde 1/400 oranında sulandırıldı. Bir saat 37 °C’de inkübasyondan sonra sulandırılmış serumlar pleytlerden uzaklaştırıldı ve pleytler 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra tavşan anti-keçi konjugatı (Southern Biotech, 6130-05) bloklama solüsyonu içerisinde 1/4000 oranında sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı. Bir saat 37 °C’ de

inkübasyondan sonra konjugat pleytlerden uzaklaştırıldı ve pleytler 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Görüntüleme işlemi için her bir kuyucuğa 100 µl SureBlue Reserve TMB solüsyonu (KPL, 110466) bırakılıp reaksiyonun oluşması için karanlık ortamda 15 dakika bekletildi ve durdurma solüsyonu eklenerek sonuçlar ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunca okundu.

4.13. Fare Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

İmmünize edilen Balb-C fare serumlarında IgG titrelerini belirlemek ve en yüksek titreye sahip hayvanı seçmek amacıyla indirekt ELISA testi yapıldı. Vero E6 hücrelerinde üretilip inaktive edilen KKKAH antijeni kuyucuk başına 1 µgr olacak şekilde pH 9.6 karbonat tampon solüsyonu kullanılarak 1 gece + 4 °C’de 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine bağlandı. Daha sonra bağlanmayan antijenler pleytten uzaklaştırıldı ve bloklama işlemi için %0,05 PBS-Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5’lik süt tozundan oluşan bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37 °C’ de 1 saat inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra pleyt 1 kez yıkama solüsyonu ile (%0,05 PBS-Tween 20) yıkandı. Daha sonra test edilecek fare serumlarının 1/50’den başlanarak log 2 tabanında bloklama solüsyonu içerisinde seri sulandırmaları yapıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl geçildi. Bir saat 37 °C’ de inkübe edildikten sonra pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tavşan anti-fare konjugatı (Southern Biotech, 1010-05) 1/5000 oranında bloklama solüsyonu içerisinde sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl geçildi. Pleyt 1 saat 37 °C’ de inkübe edildi ve 100 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Görüntüleme amacıyla 3,3’,5,5’-Tetramehtylbenzidine tableti 4

ml 0,1 M sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözdürüldü ve 100 µl H₂O₂ ilave edildi. Hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Daha sonra 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu (0,2 N sülfirik asit) ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

4.14. SDS ve Western Blot Analizi

Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad, 165-8000) sistem kurulumu talimata uygun olarak yapıldıktan sonra % 10 luk çözdürme jeli hazırlandı [(1.9ml dH₂O, 1.7ml %30 akrilamid (Merck, 800830) 1 gr bisakrilamid (Promega, V3143)] karıştırılıp çözdürüldükten sonra 0,45 µm filtreden süzülerek hazırlandı), 1.3 ml 1.5 M Tris (pH 8.8) (Merck, K37266187 725), 0.05 ml %10 SDS (Biorad, 161-0302), 0.05 ml %10 amonyum persülfat (Applchem, A2941,0250), 0.002 ml TEMED (Merck, M1107320 100) ve cam pleytler arasından döküldü, jelin üzerine 1 ml dH₂O pipet yardımıyla ilave edildi). 15 dakika jelin kuruması için beklendikten sonra jelin üzerindeki su alındı ve hazırlanan %5'lik yığınlama jeli hazırlandı [(1.4 ml dH₂O, 0.33 ml %30 akrilamid, 0.25 ml 1.0 M Tris (pH 6.8), 0.02 ml %10 SDS, 0.02 ml %10 amonyum persulfat, 0.002 ml TEMED) karıştırılarak hazırlandı)] ve çözdürme jelin üzerine eklendi. Tarak (Biorad, 165-3354) takıldı ve oda ısısında donması için bekletildi. Test edilecek örnekler Laemli Sample Buffer [(Biorad, 161-0737) (kullanmadan önce 950 µl'ye 50 µl BME (2-Mercaptoethanol) (Biorad, 161-0710) ilave edildi)] ile 1:1 oranında sulandırılarak 100°C'deki suda 5 dakika süreyle denatüre edildi. Önceden hazırlanmış jelin bulunduğu cam pleyt jel yürütme tankına yerleştirildi. Tarak

çıkartıldıktan sonra buz kabına alınan örneklerden 30 µl kuyucuklara yüklendi. Güç kaynağı (Biorad, 164-5052) tanka bağlandı ve 1,5 saat süreyle Tris/Glisin yürütme tamponunda [(25 mM Tris (Merck, K37266187 725), 192 mM glisin (Merck, K40427490 940), % 0,1 SDS, pH 8.3)] 150 voltta örnekler yürütüldü. Proteinler nitrosellülöz membrana (Millipore, Immobilon-NY+ INYC00010) transfer edilmek üzere jel büyüklüğünde membran kesilerek methanol içerisinde inkübe edildi. Transfer tampon (3,3 gr Tris, 14,4 gr glisin, 100 ml methanol, 900 ml dH₂O) içerisinde cam playtlerden çıkartılan jel, süngerler (Biorad, 1703933) kurutma kağıtları (Biorad, 1703932) ıslatıldı ve bu tampon içerisinde kasetin üzerine sırasıyla sünger, kurutma kağıdı, membran, jel, kurutma kağıdı ve sünger yerleştirildikten sonra kasetin kapağı kapatıldı. Kaset transfer sistem aparatına yerleştirildikten sonra sistem transfer tamponu ile dolduruldu ve içerisine buz aküsü ile manyetik karıştırıcı yerleştirildi. Sistem karıştırıcı üzerine yerleştirildikten sonra 100 rpm’de karıştırılmaya başlandı. Güç kaynağı transfer sistemine bağlandıktan sonra 100 voltta 60 dakika süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer işlemi bittikten sonra membran kasetten alındı ve PBST-20 [(PBS, % 0,1 Tween-20 (Merck, S4662084)] içerisinde %5 yağsız süt tozunda 30 dakika bloklandı. Bloklama işleminden sonra 1/100 oranında 10ml %5 yağsız süt tozunda hazırlanan poliklonal sığır serumunda 1 saat oda ısısında 90 rpm’de çalkalayıcıda inkübe edildi. Primer serum döküldü ve membran 10 dakika arayla 3 kez PBST-20 ile yıkandı. Konjugat olarak test edilen sığır, koyun ve keçi serumlarına spesifik farklı hayvanlardan elde edilmiş konjugatlar 10ml %5 yağsız süt tozu içerisinde sulandırılıp membran üzerine döküldü ve oda ısısında 1 saat süreyle 90 rpm’de çalkalayıcıda inkübe edildi. Konjugat döküldü ve membran 10

dakika arayla 3 kez PBST-20 ile yıkandı. Membran üzerine görüntüleme substratı (Thermo Pierce, 32106) 1:1 oranında karıştırılarak yayıldı ve 5 dakika süreyle bütün membranın üzerine yayılması sağlandı. Membran bu solüsyonlardan çıkartılıp üzerine bir streç film örtüldü. Görüntüleme kasetine (Fisher, FBCS 810) yerleştirildikten sonra karanlık bir odada üzerine film (Sigma, F5763) kapatıldı ve 5 dakika bekletildi. Film kasetten çıkartılıp önce 3 dakika süreyle developer solüsyonuna (Sigma, P7042) alındı dH₂O kabında yıkandıktan sonra 2 dakika fixer solüsyonunda (Sigma, P7067) bekletildi. Tekrar su kabında yıkandıktan sonra film görüntülendi.

4.15. Monoklonal Antikor Üretimi

4.15.1. Myelomma Hücrelerinin Üretilmesi

Füzyon işleminde kullanılan SP2O-Ag14 (ATCC, Rockville, Maryland) hücreleri 75 cm² lik hücre kültürü flasklarında DMEM F-12 HAM hücre kültür vasatı, %10 FBS ve %1 antibiyotik solüsyonu kullanılarak üretildi. Hücreler 7 kez pasajı yapıp log fazındayken füzyona hazırlık amacıyla 8-azaguanine (Sigma, A5284) ile muamele edildi. Bir haftalık adaptasyon süresinden sonra hücreler pasajlanırken azaguanine içermeyen vasat kullanıldı. Füzyondan 1 gün önce hücreler ertesi güne monolayer olması için her bir flaskta 1x10⁶/ml olacak şekilde pasajlandı.

4.15.2. Fare İmmünizasyonları

İmmünizasyonlar için 6 haftalık dişi Balb-C fareler kullanıldı. Vero E6 hücrelerinde üretilip inaktive edilen pürifiye KKKAH antijeni her fare için 10 µg miktarında 1:1 oranında Freund's Complete Adjuvant (Sigma, F5881) ile

emülsifiye edildi. Daha sonraki immünizasyonlar 3'er hafta aralıklarla Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma, F5506) kullanılarak ve virüs miktarı 5 µg kullanılarak yapıldı.

4.15.3. Füzyon

Füzyonda kullanılmak üzere seçilen dişi Balb/c fare 10 mg/kg Xylazine + 30 mg/kg Ketamine kullanılarak anestezi edildi. Servikal dislokasyon yoluyla ötenazi edilmeden önce retro-orbital yolla fareden 500 µl kan alındı. Fare %70 etanol solüsyonunda 1 dakika bekletildikten sonra steril cerrahi seti kullanılarak orta abdominal bölgeden ensizyon yoluyla dalağı çıkarıldı. Dalak steril bir cam petri içerisinde bulunan 10 ml M-10 vasatı [(%1 D-Glukoz (G5146, Sigma) içeren RPMI-1640 vasatı (R8005, Sigma)] ile yıkandı. Daha sonra dalak içinde 3 ml M-10 vasatı bulunan başka bir steril petriye alındı. 10 ml M-10 vasatı ile dolu steril bir şırınga ile dalağa 30-50 adet delik açıldı ve aynı zamanda vasat dalağa perfüze edildi. Steril bir forseps yardımıyla dalak Tissue Grinder'a (Sigma, CD1-1KT) alındı ve grinderdan geçirilerek dalak hücreleri 15 ml M-10 vasatının içerisinde toplandı. Hücreler bir pipet yardımıyla 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındıktan sonra 1000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 5 ml hemoliz solüsyonu (0,2 gr Tris, 0,83 gr NH₄Cl, 100 ml dH₂O, pH 7,2) ile resüspanse edildi. Oda ısısında 10 dakika inkübasyondan sonra 5 ml M-10 vasatı eklendi ve 1000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Dalak hücreleri ve SP2-O hücreleri Kova Glasstic Urinalysis System ile sayılarak füzyonda 75×10^6 dalak hücresi ile 25×10^6 SP2-O hücresi kullanıldı. Hücreler 50 ml'lik bir santrifüj tüpünde bir araya getirildi ve 1000 devirde 9 dakika santrifüj edildi. 37 °C'ye

ayarlanmış bir benmaride steril koşullarda hücre peleti hafifçe vurularak ve sallanarak dağıtıldı. Hücrelerin bulunduğu tüp benmarinin içinde tutularak hücrelerin üzerine 0.5 ml %50 PEG solüsyonu (Sigma, P7181) damla damla 45 saniye ilave edildi. Bu işlem sırasında hücreler devamlı olarak yavaşça çalkalandı. Yine aynı şekilde ikinci kez 0.5 ml %50 PEG solüsyonu eklendi. Daha sonra hücrelere 1 ml M-0 vasatı (%10 FCS içeren M-10 vasatı) 1 dakika boyunca damla damla ilave edildi. Daha sonra aynı şekilde 3 ml M-0 vasatı 3 dakika boyunca yavaş yavaş eklendi. Son olarak 10 ml M-0 vasatı 1-2 dakika içerisinde ilave edildi ve hücreler 10 dakika su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler 1000 devirde 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 10 ml HAT vasatı (%60 RPMI 1640, %10 NCTC-135 (Sigma, N3262), %20 FCS (Sigma, N4637), %1 D-glikoz, %0.01 L-glutamine (Sigma, G2150), %0.01 Na₂SeO₃, %0.01 Gentamycine, %1.5 LPS, %0.05 Dextran Sülfat, %2 HAT (Sigma, H10262) eklendi ve hücreler pipete edilmeden 10 dakika su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 35 ml HAT vasatı eklendi ve hücreler 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine çok kanallı pipet yardımıyla geçildi.

4.15.4. Hibridoma Hücrelerinin Üretilmesi

96 kuyucuklu pleytlerdeki hibridoma hücreleri %5 CO₂ içeren etüvde 37 °C ısıda üremeye bırakıldı. Üreyen hücre odakları 4. günden sonra saptanmaya başlandı ve her bir kuyucuğa 50 µl HT vasatı (%60 RPMI 1640, %10 NCTC-135, %20 FCS, %1 D-glikoz, %0.01 L-glutamine, %0.01 Na₂SeO₃, %0.01

Gentamycine, %1,5 LPS, %0.05 Dextran Sülfat, %2 HT (Sigma, H10262) ilave edildi.

4.15.5. Pozitif Klonların Belirlenmesi

Üreyen klonlardan IgG pozitif olanların belirlenmesi amacıyla ELISA yapıldı. Vero E-6 hücrelerinde üretilip inaktive edilen KKKAH antijeni kuyucuk başına 1 µgr olacak şekilde pH 9.6 karbonat tampon solüsyonu kullanılarak 1 gece + 4 °C’de 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine bağlandı. Daha sonra bağlanmayan antijenler pleytten uzaklaştırıldı ve bloklama işlemi için %0,05 PBS-Tween 20 içerisinde hazırlanmış %5’lik süt tozundan oluşan bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 100 µl bırakıldı ve pleyt 37 °C’ de 1 saat inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra pleyt 1 kez yıkama solüsyonu ile (%0,05 PBS-Tween 20) yıkandı. Daha sonra üreyen klonların bulunduğu işaretlenmiş kuyucuklardan 100 µl süpernatant eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tavşan anti-fare konjugatı (Southern Biotech, 1010-05) 1/5000 oranında sulandırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl geçildi. Bir saat 37 °C’ de inkübe edildi ve pleyt 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Görüntüleme amacıyla 4 ml 0,1 M Sitrik asit ve 6 ml 0,2 M Na₂HPO₄ içerisinde çözdürülmüş 3,3’,5,5’-Tetramehtylbenzidine tablete 100 µl H₂O₂ ilave edildi ve hazırlanan substrat solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. On beş dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra stop solüsyonu (0.2 N Sülfirik asit) ilave edilerek ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

4.15.6. Limiting Dilüsyon

Pozitif çıkan kuyucuklarda bulunan poliklonal hücrelerden hangi klonların antikor salgıladığının saptanabilmesi için klonların artan oranda seri sulandırmaları yapılarak monoklonal hücre kolonileri oluşturulması limiting dilüsyon testi ile saptandı. Bu amaçla 96 kuyucuklu pleytlerdeki hücreler sayılarak μ l'de 80 adet hücre olacak şekilde sulandırıldı ve 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinde log 2 tabanında seri dilüsyonları yapıldı. Daha sonra tek hücre düşen kuyucuklar işaretlendi ve 4 gün boyunca hücrelerin üremesi gözlemlendi. İşaretli kuyucuklardan alınan süpernatantlar ELISA ile test edildi. Bu işlem pozitif çıkan kuyucuklara 3 kez tekrarlandı. Son aşamada ELISA sonuçlarına göre pozitif çıkan klonlar 24 kuyucuklu hücre pleytlerinde üretildi. Hücreler daha sonra 12,5 cm² hücre flasklarında pasajlanarak üretilen klonlar 800 rpm'de 7 dk santrifüj edilerek hücre peleti %90 FBS ve %10 dymethyl sulphoxide (DMSO) ile 1 mililitrede 1×10^6 sayıda olacak şekilde hücre dondurma viyallerine transfer edilip -80 °C'de donduruldu, 24 saat sonra azot tankında stok olarak saklandı.

4.16. İstatistiksel Analiz

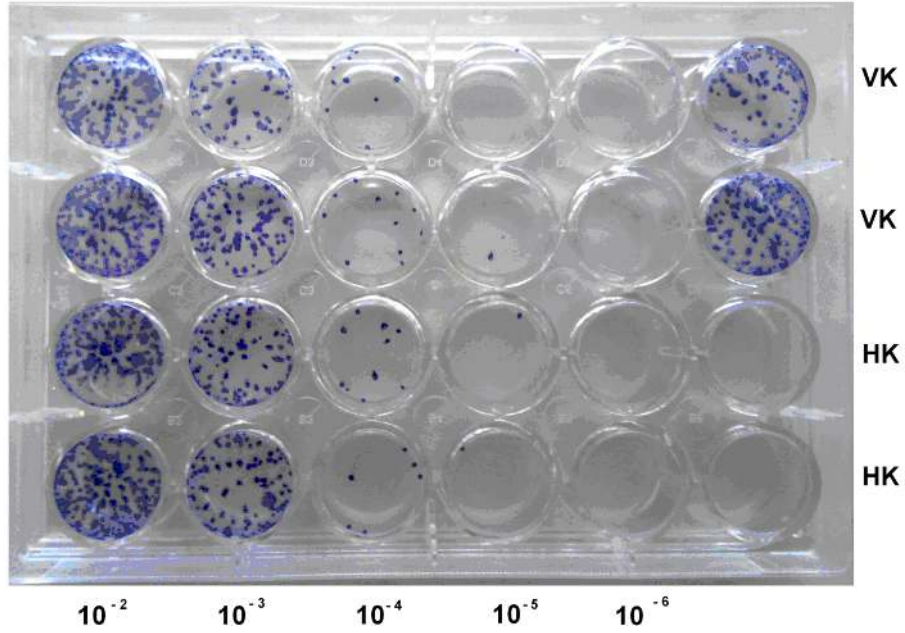
Hassasiyet, duyarlılık saptamaları, intra ve inter-assay hesaplamaları ve grafikler GraphPad Prism 5.01 ve SPSS 17.0 programı kullanılarak yapıldı.

5. BULGULAR

5.1. Viral Üremenin Tespiti

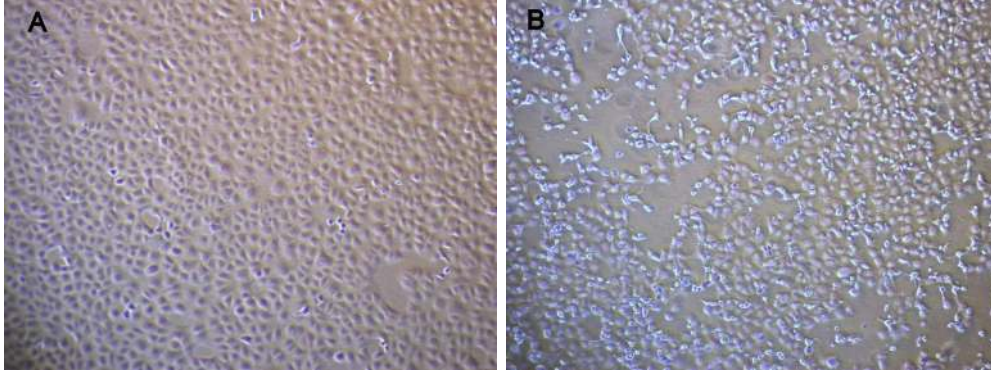
Diagnostik testlerde ve immunizasyonlarda kullanılan viral antijen KKKAH Turkey-Kelkit06 virüs suşunun 3. pasajı kullanılarak elde edildi. Virüsün titresi Vero E6 hücrelerinde pseudo-plak titrasyon testi ile 4.8×10^5 olarak saptandı (Resim 1). Titre belirlenirken kuyucukların ortalama plak sayıları alındı ve aşağıdaki gibi formülize edildi.

PPFU = (Sayılan pseudo-plak ortalaması / inokülüm miktarı) x dilüsyon oranı



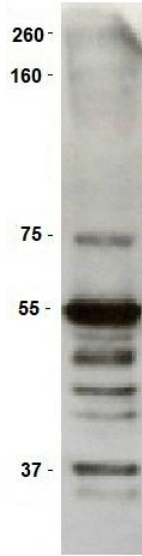
Resim 1. Vero E6 hücrelerinde fare beyininde izole edilen virüsün pseudo-plak testi ile görüntülenmesi (VK. Virüs kontrol, HK. Hücre kontrol).

MOI 0.01 ile enfekte edilen Vero E6 hücrelerinde 5. günden sonra hücre lizisi görülmeye başlandı (Resim 2) ve flasklar -80°C 'ye kaldırıldı.



Resim 2. Kontrol Vero E6 hücreleri (A) ve KKKAH Kelkit06 suşu ile enfeksiyonun 5.gününde Vero E6 hücrelerinin (B) görünümü.

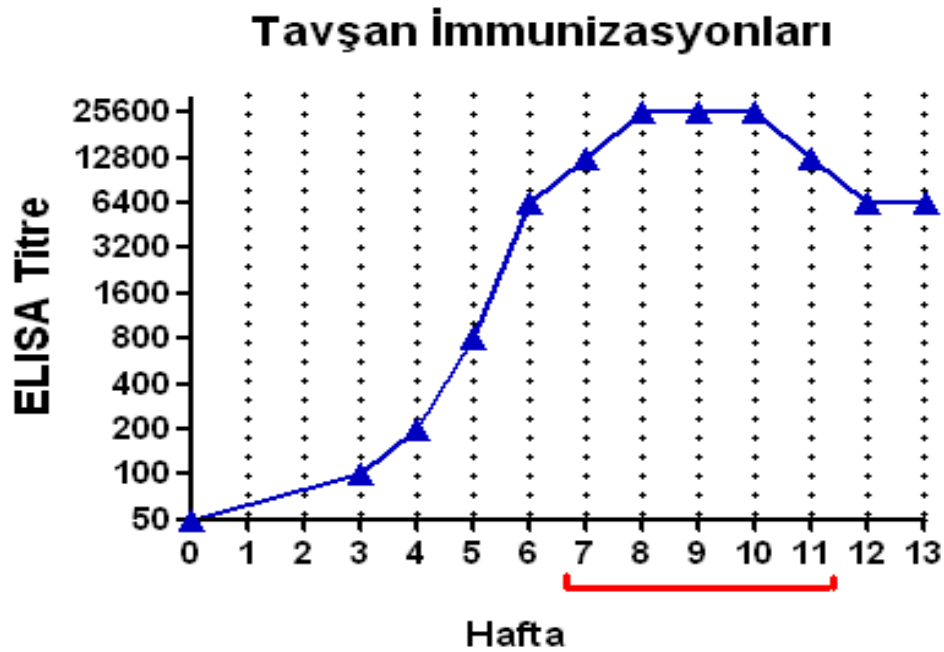
KKKAHV'ne karşı spesifik viral proteinlerin gösterilmesi amacıyla virüsün inaktivasyon işleminden sonra western blot testi uygulandı (Resim 3).



Resim 3. KKKAH virüsüne spesifik viral proteinlerin ve büyüklüklerinin western blot testi ile görüntülenmesi (Gn (37 kDa), NP (55 kDa), Gc (75 kDa), prekürsör Gn (160 kDa), prekürsör Gc (260 kDa)).

5.2. Tavşan Hiperimmün Serum Elde Edilmesi

KKKAH karşı antijen ELISA geliştirilmesinde kullanılacak olan yakalayıcı ve detektör antikorları elde etmek amacıyla tavşan hiperimmün serum elde edildi. Bu amaçla on üç hafta boyunca immunize edilen tavşanlardan toplanan serum örnekleri indirekt ELISA ile test edildi. ELISA sonuçlarına göre tavşanlardaki serum antikor seviyesinin 8. haftada en yüksek seviye olan 1/25600 titreye ulaşmış 10. haftaya kadar devam ettiği görüldü. Onuncu haftadan sonra yapılan immunizasyonların antikor seviyesini arttırmadığı hatta antikor titresinin azaldığı ve 1/6400'de sabitlendiği belirlendi (Grafik 1).



Grafik 1. İki adet Yeni Zelanda tavşanına ait hiperimmün serumların haftalara ait antikor titrelerinin geometrik ortalamalarının indirekt ELISA testi ile gösterilmesi. Grafikte en yüksek antikor titrelerine ulaşılan haftalar kırmızı çizgiyle işaretlendi ve bu haftalardaki serum örnekleri birleştirildi.

5.3. Tavşan Hiperimmün Serumlarının Pürifikasyonu ve İşaretlenmesi

Antikor titresinin en yoğun olduğu haftalar olan 7-11. haftalara ait tavşan hiperimmün serumları bir araya getirilerek havuz oluşturuldu ve ticari pürifikasyon kiti kullanılarak pürifiye tavşan serumu elde edildi. Pürifikasyon işlemi neticesinde yapılan Lowry deneyi sonucuna göre 5 mg/ml pürifiye tavşan serumu elde edildi. Elde edilen hiperimmün serumun spesifik olduğu indirekt ELISA testi ile belirlendikten sonra tavşan hiperimmün serumunun HRP ile işaretleme işlemi TUBİTAK-MAM tarafından gerçekleştirildi.

5.4. İnsan Serumlarında KKKAH Antijenlerinin Belirlenmesi Amacıyla Antijen ELISA Testinin Geliştirilmesi

Akut KKKAH teşhisinde yaygın olarak real-time PCR kullanılmaktadır. Alternatif diğer yöntem antijen ELISA testi olup, dünyadaki tek ticari kit Vectorbest® antijen ELISA kitidir. Bu çalışmada geliştirilen antijen ELISA testinin değerlendirilmesinde Vectorbest® ticari ELISA kiti altın standart olarak kullanıldı. Ayrıca elde edilen sonuçlar real-time PCR ile karşılaştırıldı.

İnsanlardaki akut KKKAH'nın teşhisinde kullanılmak üzere geliştirilen antijen belirlemeye yönelik ELISA testi geliştirilmesi için Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na farklı tarihlerde ve farklı merkezlerden gönderilen klinik KKKAH şüpheli toplam 30 adet insan serumu deney standardizasyonunda kullanıldı. Bu serumlar aynı zamanda real-time PCR ve Vectorbest® ticari ELISA kiti ile test edildi (Tablo 1).

Geliştirilen antijen ELISA testinin cut-off değeri negatif serum örneklerinin ortalama ELISA O.D. değerlerinin iki katının hesaplanmasıyla belirlendi. İnsan antijen ELISA için cut-off değeri 0.1 O.D. (450 nm) olarak hesaplandı. Bu değer altındaki serum örnekleri negatif, üzerindeki serum örnekleri ise pozitif olarak değerlendirildi.

Test sonuçlarına göre 18 adet serum üç testte pozitif (%54,54), 5 adet serum negatif (%15) bulunurken, 1 adet serum antijen ELISA negatif diğer iki testte pozitif, 1 adet serum antijen ELISA pozitif diğer iki testte negatif, 1 adet serum ise antijen ELISA ve real-time PCR negatif, Vectorbest antijen ELISA pozitif olarak bulundu.

Tablo 1. Geliştirilen antijen ELISA ve Vectorbest ile Real-time PCR serum sonuçlarının karşılaştırılması.

1A.

Serum Örnekleri	Antijen ELISA	Vectorbest Antijen ELISA	Real-time PCR
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	+	+
28	+	+	+
117	+	+	+
138	+	+	+
139	+	+	+
140	+	+	+

1B.

Serum Örnekleri	Antijen ELISA	Vectorbest Antijen ELISA	Real-time PCR
198	+	+	+
204	+	+	+
208	+	+	+
210	+	+	+
221	+	+	+
57	+	+	+
58	+	+	+
207	+	+	+
121	+	+	+
211**	-	+	+
141***	+	-	-
119****	-	+	-
59	-	-	-
60	-	-	-
61	-	-	-
62	-	-	-
122	-	-	-
123	-	-	-
124	-	-	-
142	-	-	-
199	-	-	-

(+) Test sonuçlarına göre pozitif belirlenen serum örnekleri,

(-) Test sonuçlarına göre negatif belirlenen serum örnekleri,

(**) Antijen ELISA negatif, Vectorbest antijen ELISA ve Real-time pozitif serum örnekleri,

(***) Antijen ELISA pozitif, Vectorbest antijen ELISA ve Real-time negatif serum örnekleri,

(****) Antijen ELISA ve Real-time PCR negatif, Vectorbest Antijen ELISA pozitif serum örnekleri.

Bu çalışmada geliştirilen antijen ELISA'nın altın standart olarak bilinen testlerle karşılaştırma yapıldıktan sonra duyarlılık ($\text{Gerçek Negatifler} / (\text{Gerçek Negatifler} + \text{Yalancı Pozitifler})$) ve özgüllük ($\text{Gerçek Pozitifler} / (\text{Gerçek Pozitifler} + \text{Yalancı Negatifler})$) hesaplamaları yapıldı. Bu sonuçlara göre geliştirilen antijen ELISA testinin Vectorbest antijen ELISA testi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %94, özgüllüğü %95 olarak hesaplandı (Tablo 2). Real-time PCR testi ile karşılaştırıldığında ise duyarlılığı %94, özgüllüğü %95 olarak belirlendi (Tablo 3).

Tablo 2. Vectorbest antijen ELISA ve geliştirilen antijen ELISA testinin karşılaştırılması

Vectorbest	Antijen ELISA	
	Pozitif	Negatif
Pozitif	19	1
Negatif	1	9
Toplam	20	10

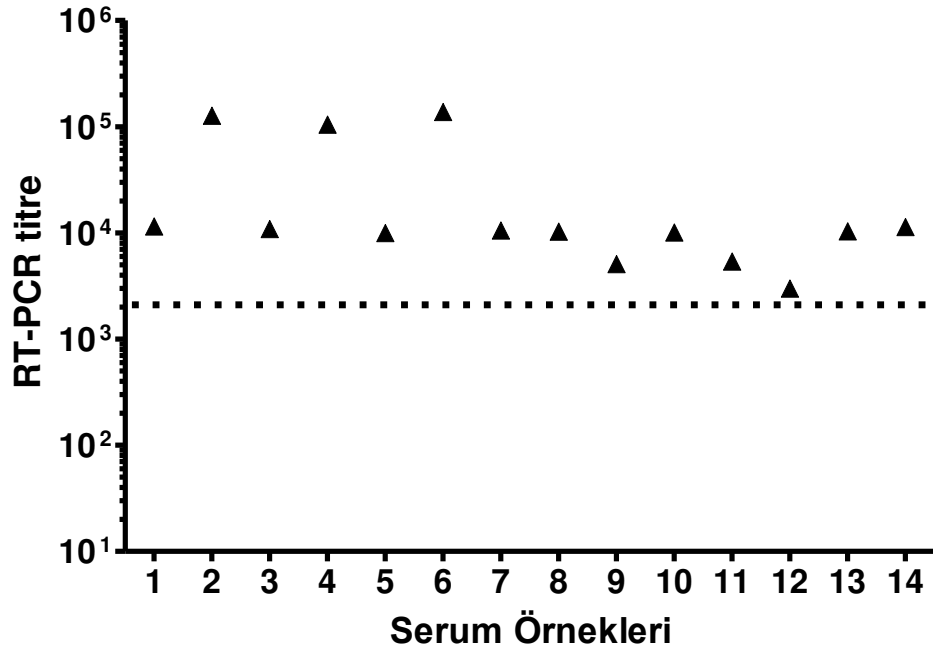
Tablo 3. Real-time PCR ve geliştirilen antijen ELISA testinin karşılaştırılması.

Real-time PCR	Antijen ELISA	
	Pozitif	Negatif
Pozitif	19	1
Negatif	1	9
Toplam	20	10

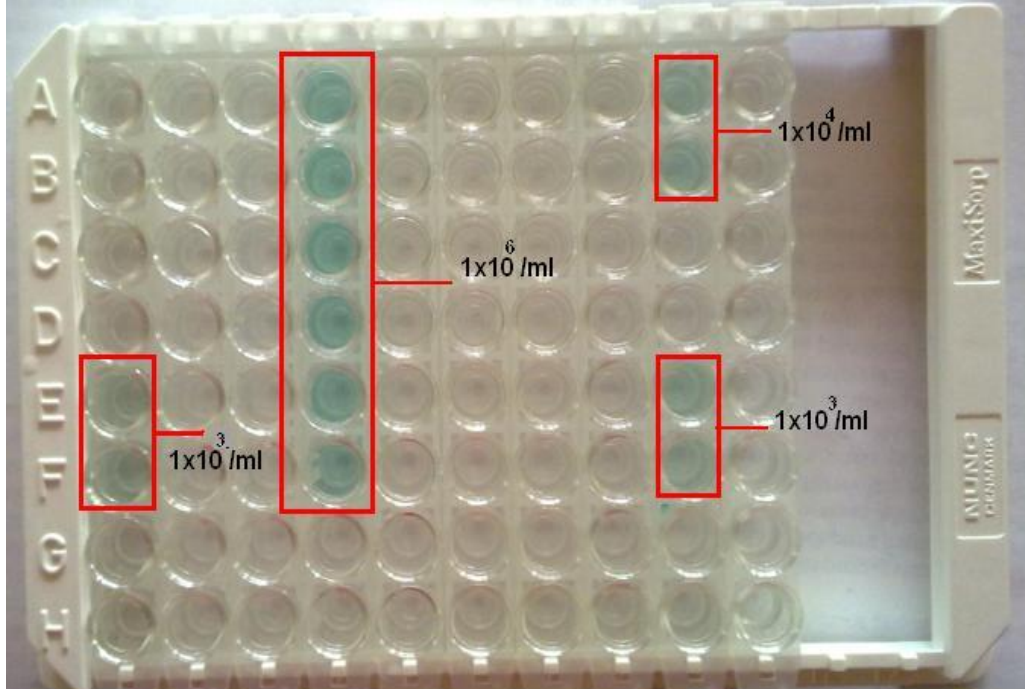
Geliştirilen antijen ELISA testinin real-time PCR sonuçlarına göre deteksiyon limitinin belirlenmesi amacıyla her 3 testte de pozitif belirlenen serum örneklerine RNA ekstraksiyonu ve tersine transkripsiyon işlemleri yapılarak cDNA elde edildi Roche SyberGreen Master® Software kullanılarak eşik değeri siklusu (Ct) ve mililitredeki kopya sayıları hesaplandı. Bu sonuçlara göre testin eşik değeri siklusu 27, mililitredeki kopya sayısı ise 3×10^3 kopya/ml olarak belirlendi (Tablo 4, Grafik 2, Resim 4).

Tablo 4. Pozitif serum örneklerinin real-time PCR kopya sayıları

Serum Örnekleri	Kopya sayısı/ml
24	1.15×10^4
198	1.27×10^5
117	1.09×10^4
25	1.05×10^5
26	1.00×10^4
27	1.38×10^5
28	1.06×10^4
138	1.03×10^4
140	5.10×10^3
204	1.01×10^4
208	5.38×10^3
210	3.07×10^3
139	1.04×10^4
199	1.15×10^4



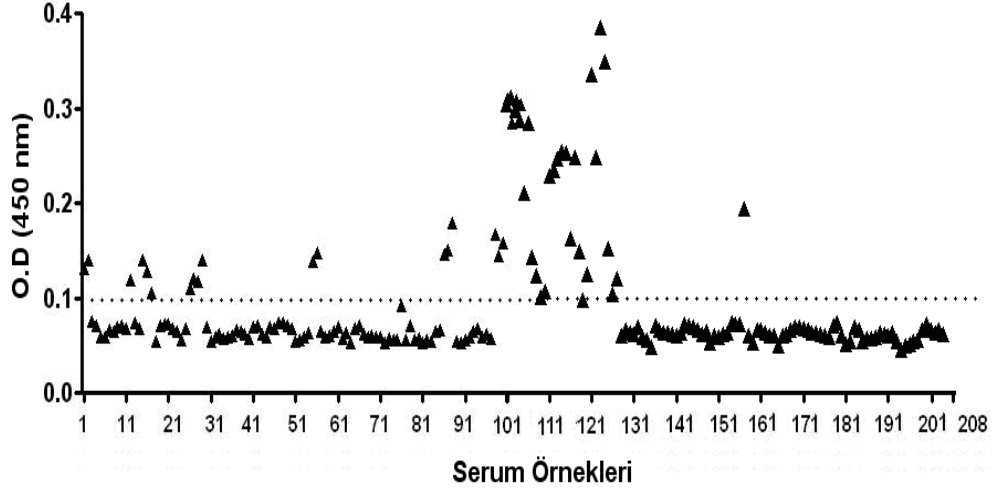
Grafik 2. Real-time PCR sonuçları ve deteksiyon limiti. Kesikli çizgi deteksiyon limiti olan 3×10^3 kopya/ml'yi göstermektedir.



Resim 4. Antijen ELISA yöntemi ile test edilen serumların ELISA pleytindeki görünümü.

ELISA testinde pozitif bulunan serumlar Real-time PCR’ da test edildi. E1, F1, E9 ve F9 no’lu kuyucuklardaki serumlar 1×10^3 kopya/ml, A9 ve B9 no’lu kuyucuklardaki serumlar 1×10^4 kopya/ml ve A4-F4 arasındaki serumlar ise 1×10^6 kopya/ml viral yük taşıdığı real-time PCR ile belirlenmiştir. H9 nolu kuyucuk negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Resim 4).

Deney standart hale getirildikten sonra Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı’ndan 2006-2009 yılları arasında toplanan KKKAH şüpheli 208 adet insan serum örnekleri geliştirilen antijen ELISA testi ile incelendi. Laboratuvarımızda test edilen serum örneklerinin antijen ELISA testi sonuçlarına göre toplam 208 adet insan serumunun 47 tanesi (% 22.59) pozitif olarak belirlendi (Grafik 3).

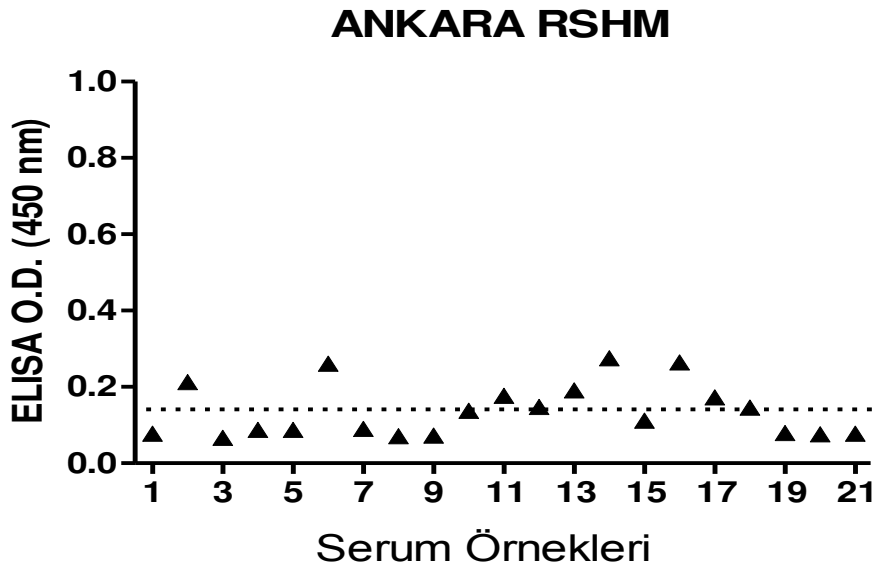


Grafik 3. Ankara RSHM Başkanlığı’ndan gönderilen 208 adet insan serumlarının ELISA değerlerinin gösterilmesi.

Grafik 3’de görüldüğü üzere kesikli çizgi O.D. 0,1 olarak belirlenen cut-off değerini göstermektedir. Bu değerin üzerinde bulunan 47 adet serum pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Geliştirilip standart hale getirilen antijen ELISA testi ile Ankara RSHM, Samsun RHSM ve Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde 2011 yılına ait serum örnekleri bu merkezlerde test edildi.

Ankara RSHM Başkanlığı’nda test edilen ve pozitif olduğu Ankara RSHM real-time PCR protokolüne göre bilinen 15 adet serum ve 6 adet negatif kontrol olmak üzere toplam 21 adet serumun 7 tanesi (% 33.33) KKKAH yönünden pozitif olarak teşhis edildi (Tablo 5). Negatif serumların tamamı antijen ELISA testi ile de negatif olarak bulundu. Bu sonuçlara göre testin özgüllüğü %100, hassasiyeti ise %54 olarak hesaplandı. İki adet serum cut-off değeri ile aynı O.D.’ye sahip olduğu için şüpheli pozitif olarak değerlendirildi (Grafik 4).



Grafik 4. Ankara RSHM Başkanlığı’nda test edilen 21 adet serumun 450 nm dalga boyunda okunan ELISA değerleri.

Kesikli çizgi 0.1 olarak belirlenen cut-off değerini göstermektedir. Bu değer üzerinde bulunan 7 adet serum pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 5. Ankara RSHM Başkanlığı'nda antijen ELISA ve real-time PCR ile test edilen serumların karşılaştırılması. Real-time Ct değeri pozitif serumlara ait floresan eğrisinin ölçülebilir değere çıktığı ilk siklusu göstermektedir. Tablodaki sonuçlara göre real-time Ct 24,11 siklusun altında ışıma veren serumlar antijen ELISA pozitif, bu siklusun üzerindeki serumlar negatif olarak saptanmıştır.

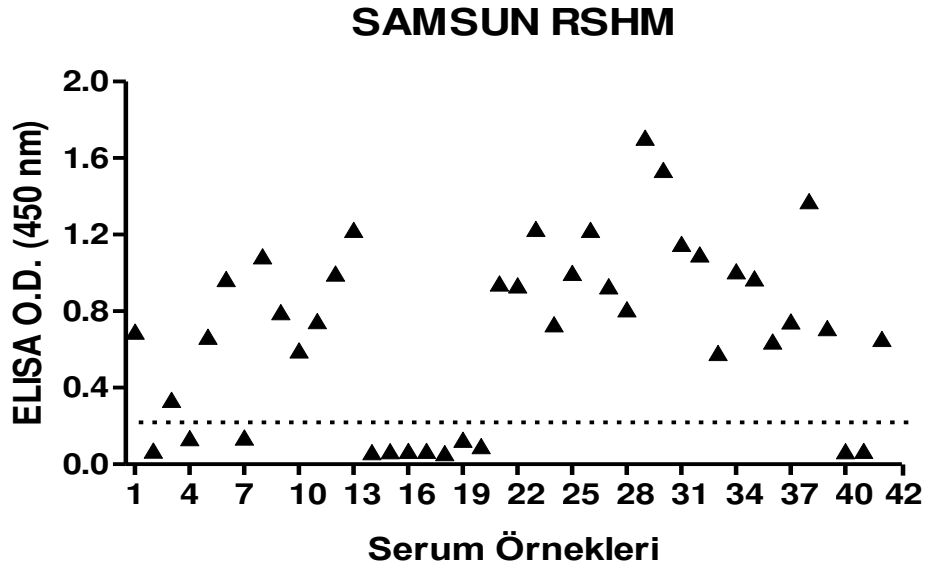
Serum No	Real-Time Ct	Antijen ELISA
6	20,00	+
13	27,44	-
15	30,03	-
22	21,95	+
27	27,40	-
30	22,19	+
41	25,40	-
45	22,46	+
12	26,99	-
24	24,11	+
16	-	-
11	-	-
10	-	-
7	-	-
5	-	-
33	31,30	-
19	38,10	-
44	23,55	+
42	34,05	-
29	23,40	+
20	-	-

ELISA O.D. değerleri kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

(+) Test sonuçlarına göre pozitif belirlenen serum örnekleri

(-) Test sonuçlarına göre negatif belirlenen serum örnekleri

Samsun RSHM Başkanlığı'nda test edilen ve pozitif olduğu Ankara RSHM real-time PCR protokolüne göre belirlenen 35 adet serum ve 6 adet negatif olmak üzere toplam 41 adet serumun 30 tanesi (%73.17) KKKAH yönünden pozitif olarak teşhis edildi (Tablo 6, Grafik 5). Bu sonuçlara göre testin özgüllüğü %100, hassasiyeti %84 olarak hesaplandı.



Grafik 5. Samsun RSHM Başkanlığı'nda test edilen 41 adet serumun ELISA değerleri.

Kesikli çizgi 0.1 olarak belirlenen cut-off değerini göstermektedir. Bu değer üzerinde bulunan 30 adet serum pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 6. Samsun RSHM’de antijen ELISA ve real-time PCR ile test edilen serumların karşılaştırılması. Real-time Ct değeri pozitif serumlara ait floresan eğrisinin ölçülebilir değere çıktığı ilk siklusu göstermektedir. Antijen ELISA cut-off O.D. değeri 0.100 olarak belirlenmiş ve bu değerin altındaki serumlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Tablodaki sonuçlara göre real-time Ct 25,72 siklusun altında ışıma veren serumlar antijen ELISA pozitif, bu siklusun üzerindeki serumlar negatif olarak saptanmıştır.

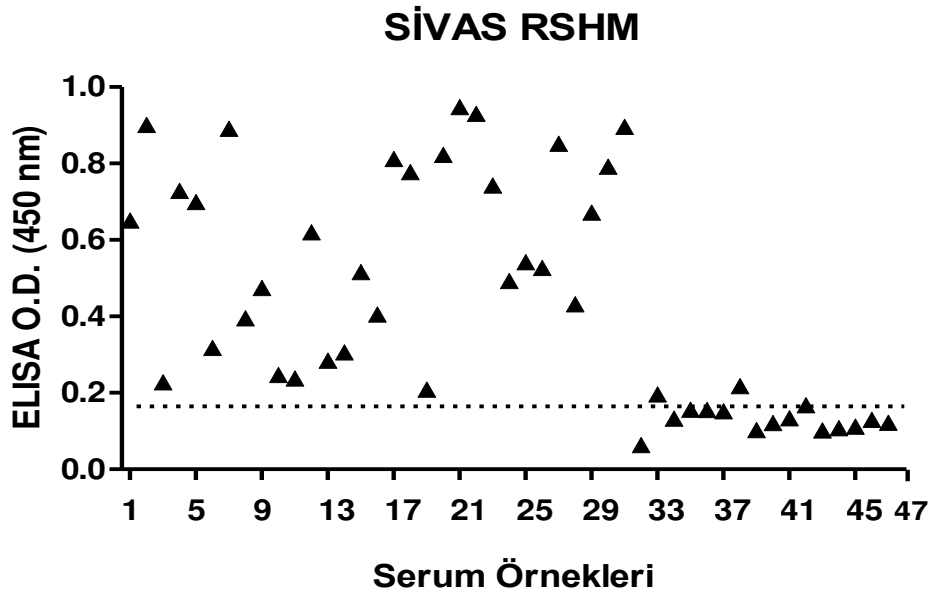
6A.

Serum No	Real-time Ct	Antijen ELISA O.D
1	22,45	0,695
2	29,17	0,072
3	23,76	0,338
4	25,42	0,137
5	22,73	0,667
6	17,93	0,969
7	25,72	0,140
8	17,86	1,087
9	22,33	0,795
10	24,16	0,596
11	21,03	0,749
12	18,31	0,997
13	19,32	1,226
14	35,11	0,065
15	-	0,069
16	-	0,070
17	-	0,070

6B.

Serum No	Real-time Ct	Antijen ELISA O.D
18	-	0,060
19	27,05	0,130
20	32,45	0,096
21	19,92	0,946
22	17,42	0,936
23	19,31	1,230
24	20,62	0,732
25	19,58	1,001
26	17,91	1,226
27	19,72	0,931
28	20,02	0,810
29	18,47	1,708
30	17,49	1,539
31	19,08	1,152
32	19,45	1,097
33	22,42	0,582
34	18,74	1,009
35	19,96	0,973
36	21,98	0,642
37	20,68	0,747
38	17,13	1,375
39	22,37	0,712
40	-	0,069
41	-	0,070
42	22,74	0,656

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıklar Anabilim Dalı'nda bulunan 2010 yılına ait 30 adet şüpheli hasta serumunun 14 tanesi (% 49.66) pozitif bulunurken, 2011 yılında KKKAH tanısıyla hospitalize edilen hastalara ait 17 adet serumun 16'sı (% 94.55) pozitif bulundu (Tablo 7, Grafik 6).



Grafik 6. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesinde antijen ELISA ile test edilen 47 adet serum örneklerinin O.D. değerleri.

Kesikli çizgi 0.1 olarak belirlenen cut-off değerini göstermektedir. Bu değerin üzerinde bulunan serumlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 7. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde antijen ELISA ve real-time PCR ile test edilen serumların karşılaştırılması. Real-time Ct değeri pozitif serumlara ait floresan eğrisinin ölçülebilir değere çıktığı ilk siklusu göstermektedir. Klinik olarak belirtilen serumlara ait Ct değeri ölçülmemiş hastalar klinik belirtilere dayanarak teşhis edilmiştir. Antijen ELISA cut-off O.D. değeri 0.100 olarak belirlenmiş ve bu değer altındaki serumlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Tablodaki sonuçlara göre real-time Ct 26,59 siklusun altında ışıma veren serumlar antijen ELISA pozitif, bu siklusun üzerindeki serumlar negatif olarak saptanmıştır.

7A.

Serum No	Real Time Ct	Antijen ELISA O.D
1	Klinik	0,651
2	Klinik	0,901
3	Klinik	0,228
4	Klinik	0,729
5	Klinik	0,700
6	Klinik	0,318
7	Klinik	0,891
8	Klinik	0,395
9	Klinik	0,475
10	Klinik	0,247
11	Klinik	0,238
12	Klinik	0,620
13	Klinik	0,285
14	Klinik	0,306
15	Klinik	0,516
16	Klinik	0,405
17	20.18	0,812
18	19.20	0,778
19	26.59	0,209
20	20.58	0,823
21	20.11	0,948

7B.

Serum No	Real Time Ct	Antijen ELISA O.D
22	20.54	0,930
23	22.04	0,743
24	24.05	0,493
25	23.36	0,542
26	21.12	0,527
27	20.19	0,852
28	21.13	0,432
29	20.26	0,672
30	24.45	0,792
31	Klinik	0,096
32	33.27	0,064
33	35.29	0,196
34	30.12	0,133
35	29.36	0,156
36	33.29	0,155
37	32.15	0,152
38	36.26	0,218
39	38.28	0,103
40	29.08	0,121
41	24.23	0,134
42	24.95	0,168
43	27.59	0,102
44	28.32	0,108
45	28.53	0,112
46	27.66	0,130
47	28.63	0,122

Tablo 8. Geliştirilen antijen testinin intra ve inter-assay varyasyon sonuçları

ELISA O.D	Intra-assay varyasyon				Inter-assay varyasyon		
	Serum tekrarlarının ELISA O.D yüzde farkları				ELISA O.D si bilinen 9 serum ve tekrar O.D'leri		
	<10 n (%)	10-50 n (%)	50-100 n (%)	Toplam n	0.159 GMT(CV)	0.225 GMT(CV)	0.402 GMT(CV)
450 nm	20 (72.72)	11 (23.62)	2 (3.62)	33	0.130 (0.08) 0.192 (5.94) 0.157 (2.27)	0.235 (2.21) 0.208 (5.63) 0.233 (2.23)	0.442 (4.32) 0.437 (3.35) 0.366 (8.92)

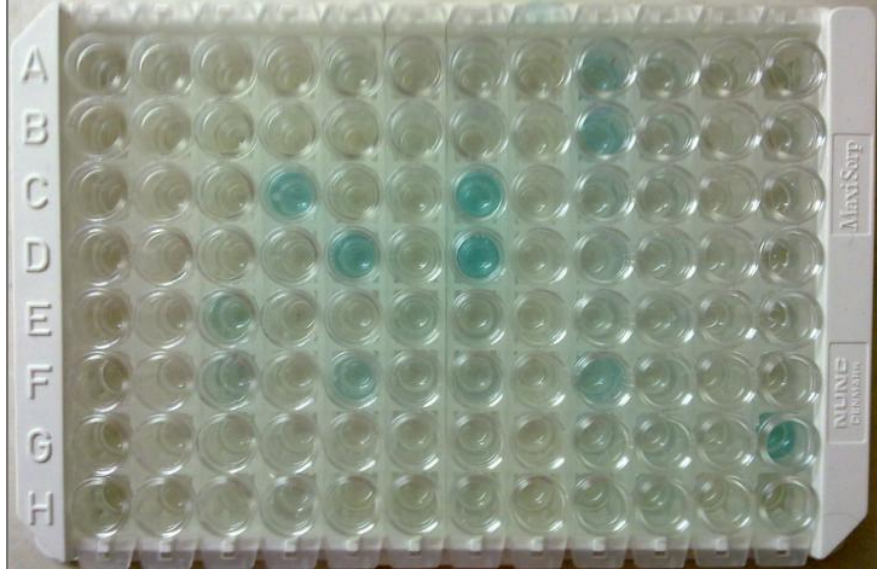
GMT ;Geometric mean titer, CV; Coefficient of variance. (CV% ortalama 3,883)

Geliştirilen antijen ELISA testinin intra ve inter-assay varyasyonlarının belirlenmesi amacıyla 33 adet serum örneği kullanıldı. serum örnekleri ikili kuyucuklar halinde 5 farklı ELISA pleytinde farklı zamanlarda test edildi ve O.D değerleri arasındaki farklılık hesaplandı. Aynı zamanda zayıf, orta derecede ve yüksek pozitif olarak belirlenen toplam 9 serum örneğinin O.D. değeri hesaplanarak ortalama O.D.'ye göre %CV değeri belirlendi. İntra ve inter-assay varyasyonları testin tekrar edilebilir olduğunu gösterdi (Tablo 8).

KKKAH endemik bölgelerdeki durumunun değerlendirilmesi ve virüsün kenelerdeki yaygınlığının belirlenmesi amacıyla Çorum, Tokat ve Yozgat'tan toplanan 320 adet kenede KKAH antijeninin varlığı test edildi (Resim 5). Test edilen kenelerin 11 tanesinde (%3.43) ELISA pozitiflik saptandı. Kene örneklerinin toplandığı odaklar ve pozitiflik dağılımları tablo halinde gösterildi (Tablo 9).

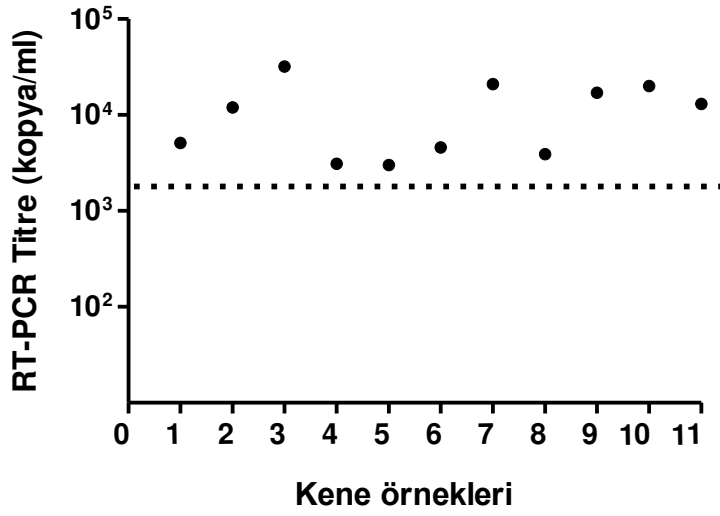
Tablo 9. Antijen ELISA ile test edilen kene örneklerinin toplandığı odaklar ve pozitiflik yüzdeleri.

Pozitif kene sayısı/Test edilen kene sayısı									
Kene türü	Tokat/Artova			Çorum/Merkez			Yozgat/Çekerek		
	Aktaş	Çakır	Bayındırhoyuk	Yukarı Karakaya	Yukarı Karahacılı	Kayalar	Kuruçay	Kamışçık	Toplam
<i>Hyalomma marginatum</i>									
Erkek	1/35 (2,85%)	0/5	0/4	0/3	1/18 (5,55%)	0/5	1/44 (2,27%)	0/6	3/120 (2,5%)
Dişi	3/58 (5,17%)	0/9	1/13 (7,69%)	0/7	1/28 (3,57%)	0/8	2/59 (3,38%)	0/12	7/194 (3,60%)
Toplam	4/97 (4,12%)	0/14	1/17 (5,88%)	0/10	2/46 (4,34%)	0/13	3/105 (2,85%)	0/18	10/314 (3,18%)
<i>Hyalomma aegyptium</i>									
Erkek					1/2 (50%)				
Dişi					0/2				
Toplam					1/4 (%25)				1/4 (%25)
<i>Rhipicephalus turanicus</i>									
Erkek		0/2							
Dişi		-							
Toplam		0/2							0/2



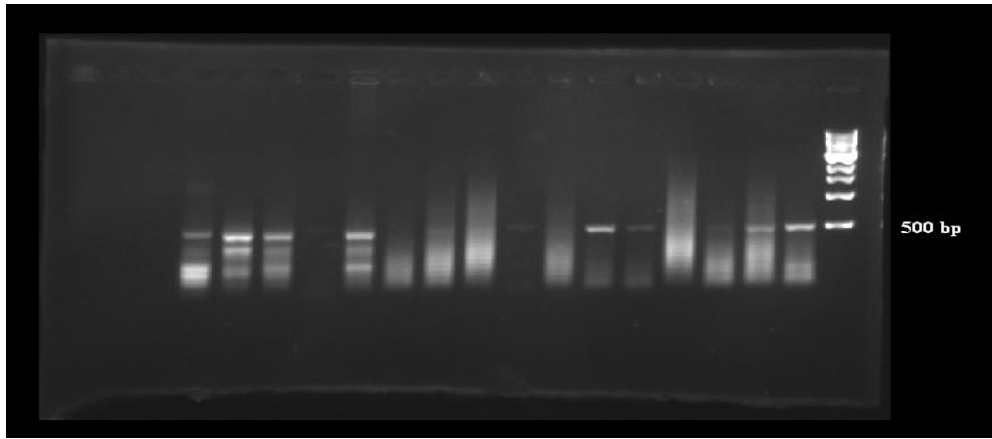
Resim 5. Antijen ELISA testi ile test edilen kene örneklerinin ELISA pleytindeki görüntüsü. G12 testin pozitif kontrolü, H12 ise testin negatif kontrolü olarak kullanıldı.

KKKAHV pozitif belirlenen kene örneklerinin real-time PCR deteksiyon limitinin belirlenmesi amacıyla RNA ekstraksiyonu ve tersine transkripsiyon işlemi yapıp örnekler real-time PCR ile test edildi. Bu sonuca göre testin deteksiyon limiti 5×10^3 kopya/ml olarak belirlendi (Grafik 7).



Grafik 7. Antijen ELISA ile pozitif belirlenen kene örneklerinin real-time PCR sonuçlarının gösterilmesi. Kesikli çizgi deteksiyon limiti olan 5×10^3 kopya/ml'i göstermektedir.

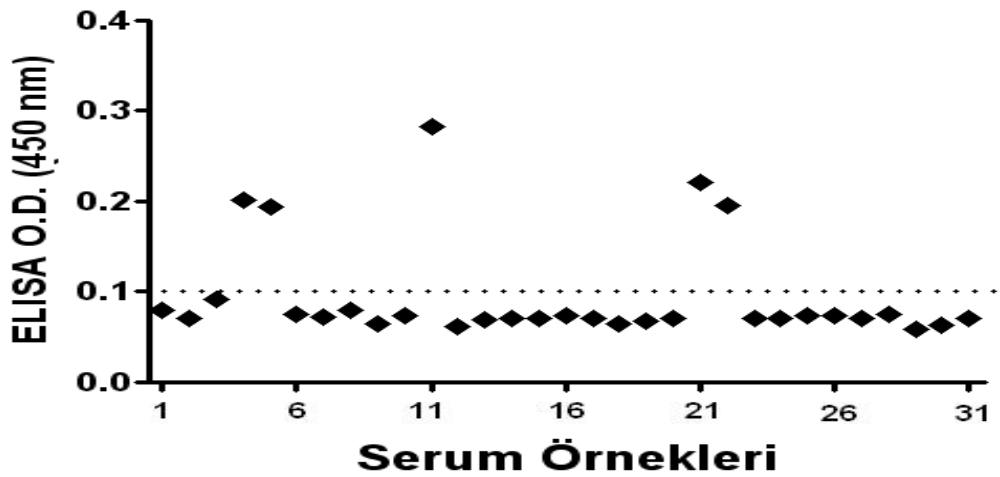
Pozitif olarak belirlenen kene örneklerine KKKAHV S segmentine spesifik F2-R3 primerleri kullanarak PCR testi yapıldı ve spesifik 505 baz uzunluğundaki bantlar agar-jel elektroforezde görüntülendi (Resim 6).



Resim 6. Kene örneklerine ait PCR sonuçlarının agaroz jelde gösterilmesi. 505 bp büyüklüğündeki bantlar F2-R3 primerleriyle çoğaltılan S segmentine spesifik bölgeyi göstermektedir.

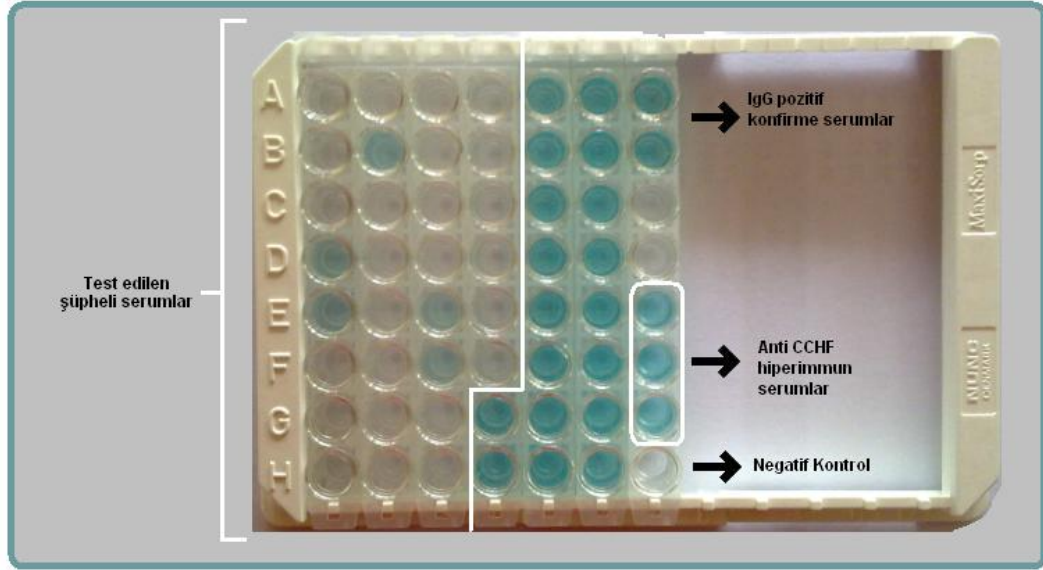
5.5. İnsan Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

KKKAH'nın teşhisinde IgM ile birlikte kullanıldığında teşhis metodlarından biri olan serokonversiyonun gösterilmesi amacıyla insanlarda IgG saptamaya yönelik ELISA testi geliştirildi. Deney standardizasyonu esnasında Ankara RSHM Başkanlığı'ndan kurumumuza gönderilen IgG pozitif olduğu bilinen 20 adet insan serumu ve farklı tarihlerde farklı merkezlerden gönderilen 31 adet anti-KKKAHV antikor şüpheli hasta serumu ve Ankara RSHM Başkanlığı'nda elde edilen anti-KKKAHV hiperimmün serumları kullanıldı. Deney sonucunda testin cut-off değeri O.D. 0.1 olarak belirlendi ve bu değerin üzerinde kalan serumlar pozitif olarak değerlendirildi. Bu sonuçlara göre 5 adet şüpheli insan serumunun (%16.13) pozitif olduğu belirlendi (Grafik 8, Resim 7). Ayrıca pozitif olarak gönderilen 20 adet insan serumu ve yine kontrol olarak kullanılan 3 adet anti-KKKAH hiperimmün serumu geliştirilen insan indirekt ELISA testinde de pozitif olduğu saptandı (%100).



Grafik 8. İndirekt ELISA ile test edilen serum örneklerine ait sonuçların gösterilmesi

Kesikli çizgi cut-off değeri olan O.D. 0.1'i göstermektedir ve bu değerin üzerindeki serumlar pozitif olarak belirlenmiştir (Grafik 8).



Resim 7. İndirekt ELISA testi ile test edilen insan serumlarının ELISA pleytindeki görünümü.

Geliştirilen testin duyarlılık ve özgüllüğü teşhis amaçlı dünyada geliştirilen tek ticari kit olan Vectocrimean-CHF-IgG ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak geliştirilen indirekt IgG ELISA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %100 olarak belirlendi.

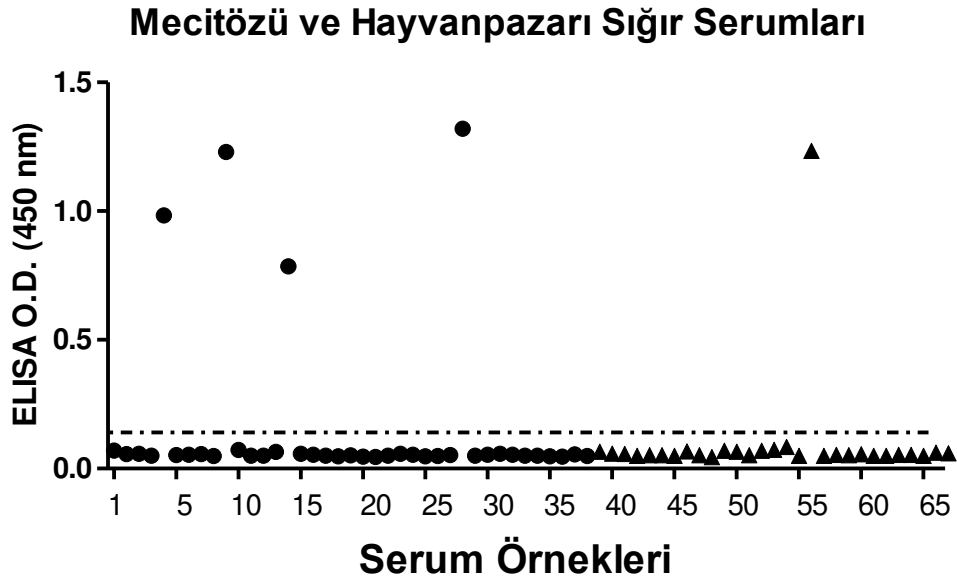
5.6. Sığır Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

KKKAHV'nin sığırlardaki seroprevalansının belirlenebilmesi için anti-KKKAHV antikorlarının saptanmasına yönelik indirekt ELISA geliştirilip Çorum, Tokat, Erzurum, Yozgat, Edirne ve Bingöl illerinden 2011 yılında toplanan toplam 253 adet sığır serumu test edildi (Tablo 10).

Tablo 10. Çorum, Tokat, Erzurum, Yozgat, Edirne ve Bingöl illerinden toplanan sığır serumları ve pozitiflik yüzdeleri.

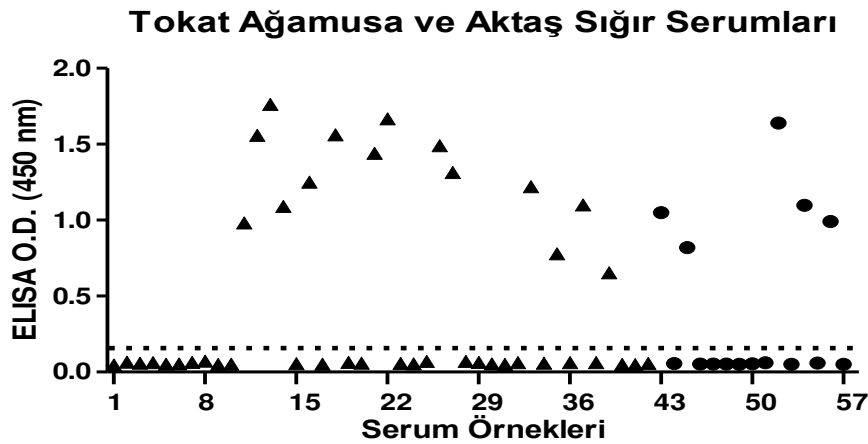
Odak	Serum Sayısı	Pozitif Sayısı	Pozitif Yüzdesi
Mecitözü	28	1	3,57
Hayvan pazarı	38	4	10,52
Aktaş	36	7	19,44
Bağbaşı	50	6	12,00
Fakıdağı	13	1	7,69
Kamışçık	45	5	11,11
Karaağaç	33	3	9,09
Bingöl	10	0	0,00
Toplam	253	27	10,67

Çorum Mecitözü ilçesinden toplanan 28 adet sığır serumunun 1 tanesi (%3,57), hayvan pazarından toplanan 38 adet serumdan 4 tanesi (%10,52) antikor varlığı yönünden pozitif olarak belirlendi (Grafik 9).



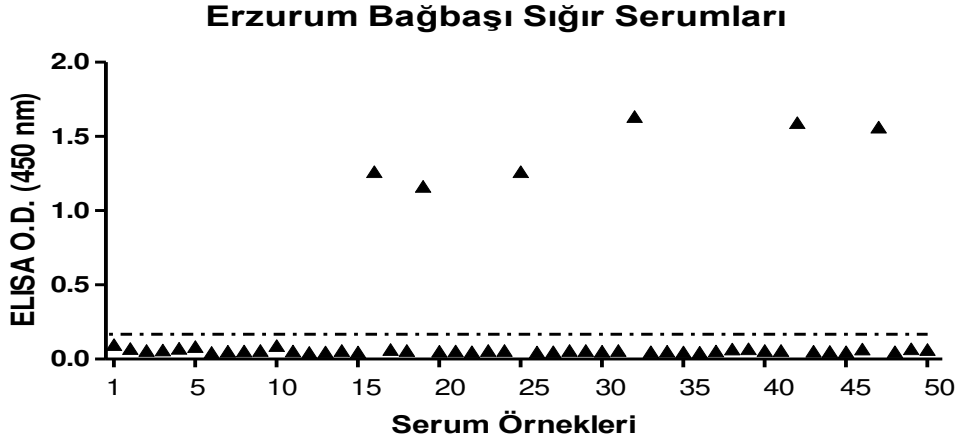
Grafik 9. Çorum iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir (● İşareti ile gösterilenler Mecitözü bölgesinden toplanan sığır serumlarını, ▲ işareti ile gösterilenler hayvan pazarından toplanan serum örneklerini göstermektedir).

Tokat Aktaş ve Ağamusa köylerinden toplanan 57 adet sığır serumundan 19 tanesi (%33.33) antikor yönünden pozitif belirlendi (Grafik 10).



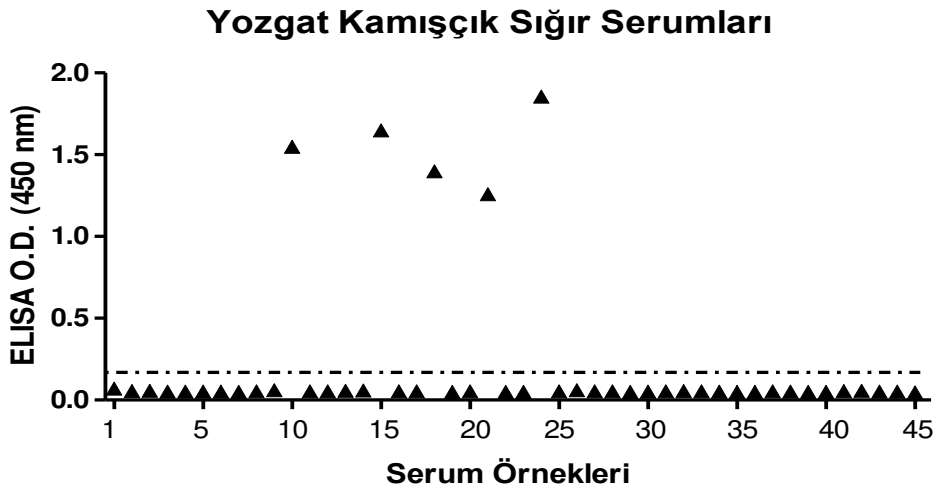
Grafik 10. Tokat iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir(● İşareti ile gösterilenler Ağamusa köyünden toplanan sığır serumlarını, ▲ işareti ile gösterilenler Aktaş köyünden toplanan serum örneklerini göstermektedir).

Erzurum Bağbaşı'ndan toplanan 50 adet sığır serumundan 6 tanesi (%12) antikor yönünden pozitif olarak belirlendi (Grafik 11).



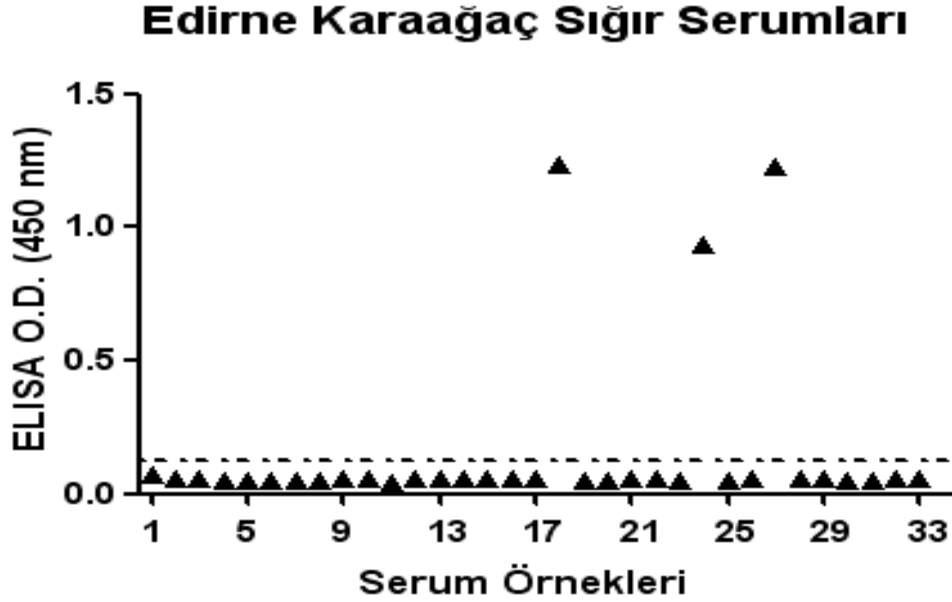
Grafik 11. Erzurum iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir.

Yozgat Kamışçık köyünden toplanan 45 adet sığır serumunun 5 tanesi (%11,11) antikor yönünden pozitif olarak belirlendi (Grafik 12).



Grafik 12. Yozgat iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir.

Edirne Karaağaç'dan toplanan 33 adet sığır serumunun 3 tanesi (%9,09) antikor yönünden pozitif olarak belirlendi (Grafik 13).



Grafik 13. Edirne iline ait sığır serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir.

Bingöl'den toplanan 10 adet sığır serumlarında antikor yönünden pozitiflik belirlenemedi.

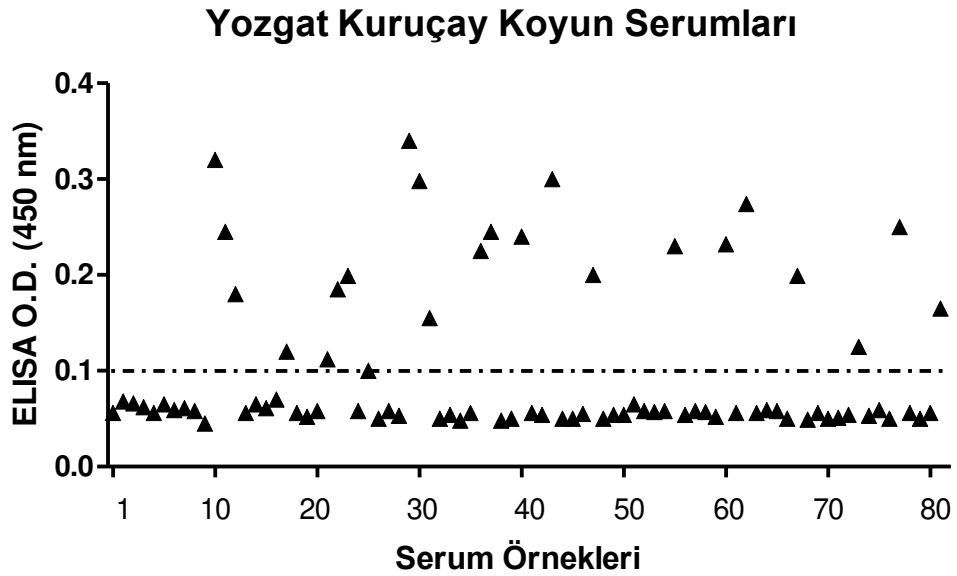
5.7. Koyun Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

Hastalığın görüldüğü endemik bölgelerden alınan koyun serumlarında enfeksiyonun yaygınlığının belirlenmesi amacıyla anti-KKKAHV antikorlarının saptanmasına yönelik indirekt ELISA geliştirilip Yozgat ve Tokat illerinden 2010-2011 yılları arasında toplanan toplam 130 adet koyun serumu test edildi (Tablo 11).

Tablo 11. Tokat ve Yozgat illerinden toplanan koyun serumları ve pozitiflik yüzdeleri.

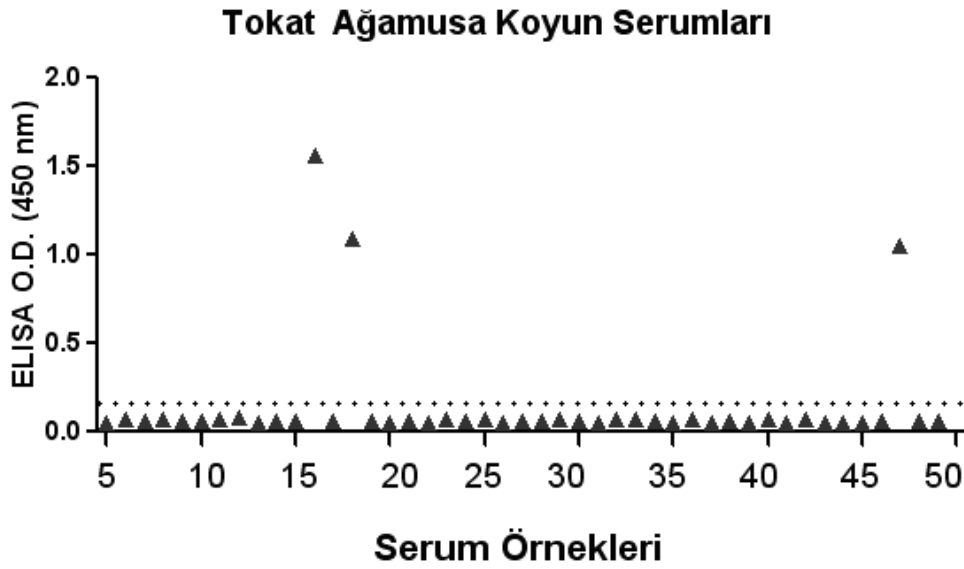
Odak	Serum Sayısı	Pozitif Sayısı	Pozitif Yüzdesi (%)
Yozgat Kuruçay	83	22	26,22
Tokat Ağamusa	47	3	6,38
Toplam	130	25	19,23

Yozgat Kuruçay köyünden toplanan 83 adet koyun serum örneklerinin 22 tanesi (% 26.22) pozitif olarak belirlendi (Grafik 14).



Grafik 14. Yozgat Kuruçay köyünden toplanan koyun serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir.

Tokat Ağamusa köyünden toplanan 47 adet koyun serumunun 3 tanesi (%6,38) pozitif olarak belirlendi (Grafik 15).



Grafik 15. Tokat Ağamusa köyünden toplanan koyun serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir.

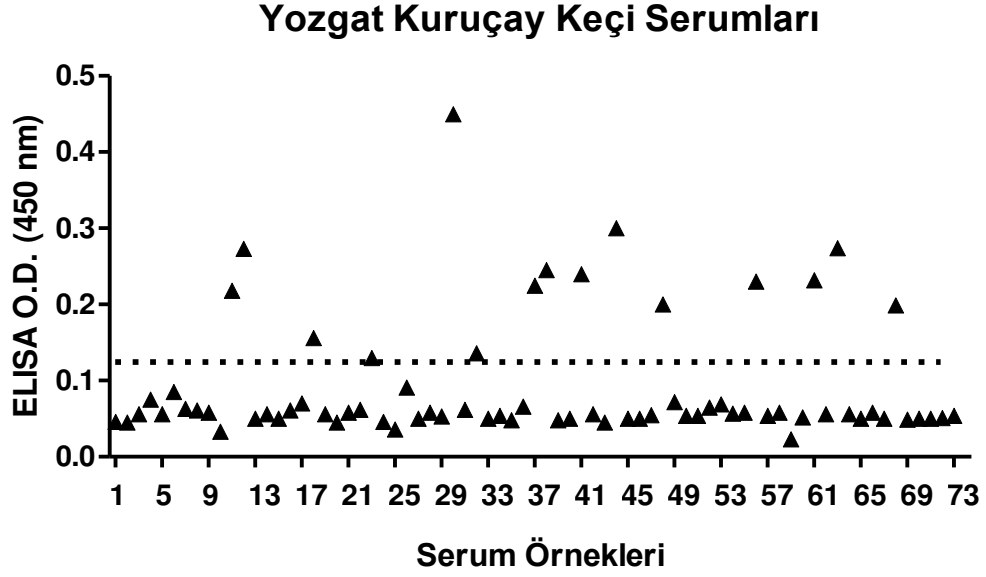
5.8. Keçi Serumlarında Anti-KKKAH IgG Belirlenmesi Amacıyla İndirekt ELISA Testi Geliştirilmesi

Keçilerde anti-KKKAHV antikorlarının saptanmasına yönelik indirekt ELISA geliştirilip Yozgat ve Tokat illerinden 2010-2011 yılları arasında toplanan toplam 132 adet keçi serumu test edildi (Tablo 12).

Tablo 12. Tokat ve Yozgat illerinden toplanan keçi serumları ve pozitiflik yüzdeleri.

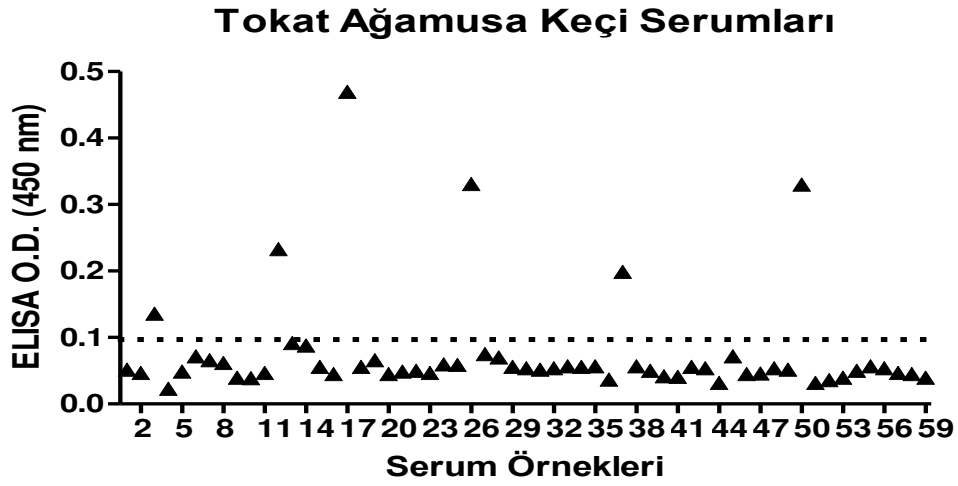
Odak	Serum Sayısı	Pozitif Sayısı	Pozitif Yüzdesi (%)
Yozgat Kuruçay	73	14	19.17
Tokat Ağamusa	59	6	10.17
Toplam	132	20	15,15

Yozgat Kuruçay köyünden toplanan 73 adet keçi serum örneklerinin 14 tanesi (% 19.17) pozitif olarak belirlendi (Grafik 16).



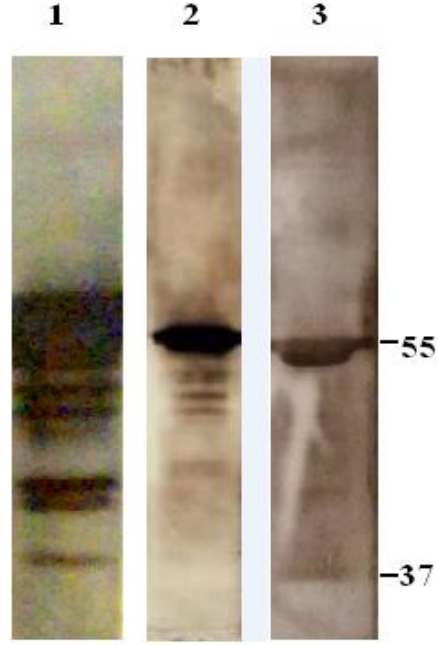
Grafik 16. Yozgat Kuruçay köyünden toplanan keçi serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir.

Tokat Ağamusa köyünden toplanan 59 adet keçi serumundan 6 tanesi (%10.17) pozitif olarak belirlendi (Grafik 17).



Grafik 17. Tokat Ağamusa köyünden toplanan keçi serum örneklerinin indirekt ELISA O.D. değerlerinin gösterilmesi. Kesikli çizgi testin cut-off değerini göstermektedir.

Sığır, koyun ve keçilerde anti-KKKAHV antikorlarının belirlenebilmesine yönelik geliştirilen indirekt ELISA testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünün karşılaştırılabilmesi için ticari bir ELISA kiti mevcut olmadığından dolayı testlerin doğrulanması amacıyla western blot analizi kullanıldı. Anti-KKKAHV antikorları yönünden pozitif belirlenen serum örneklerinin spesifik antikor içerdiği western blot ile doğrulandı (Resim 8).



Resim 8. Sığır (1), koyun (2) ve keçi (3) serumlarının western blot ile görüntülenmesi. 55 kDa’luk bölgedeki bant NP’yi, 37 kDa’luk bölgedeki bant ise Gn proteinini göstermektedir.

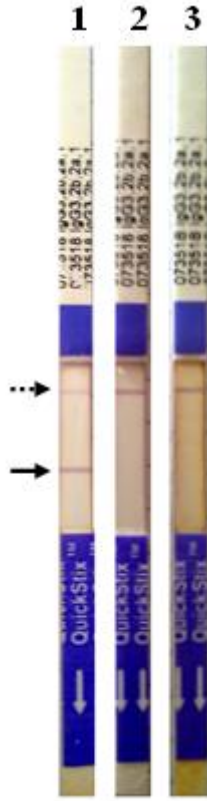
5.9. Monoklonal Antikor Üretimi

Geliştirilen antijen ELISA testinde spesifitenin arttırılması amacıyla viral proteinlere spesifik monoklonal antikor üretimi hedeflendi. Bu amaçla 6 adet Balb/c fareleri inaktif KKKAHV Turkey-Kelkit06 suşu ile 5 kez immunize edildi. Oluşan antikor yanıtın belirlenmesi için serum örnekleri indirekt ELISA ile test edildi (Tablo 13).

Tablo 13. Monoklonal antikor üretiminde kullanılan fareler ve serum antikor seviyeleri

Fare No	İmmünizasyon Sayısı	SerumAntikor Seviyesi
1	5	1/12800
2	5	1/12800
3	5	1/25600
4	5	1/6400
5	5	1/12800
6	5	1/6400

İmmünize edilen farelerden elde edilen dalak hücreleri ile SP2OAg-14 myelomma hücrelerinin füzyonu sonucu ELISA ile test edilerek seçilen toplam 11 adet hybridoma klonu üretildi. Bunlardan sadece B5, B10, C8, E8 ve G6 olarak adlandırılan 5 adet hibridoma klonu ELISA stabilitelelerini sürdürdü. Tek klon elde etmek amacıyla en az üç kez limiting dilüsyon yapıldı ve 56 adet pozitif klon ELISA testinde pozitif olarak belirlendi. Elde edilen bütün hibridomalar stok amacıyla dondurulup azot tankında saklandı. Elde edilen monoklonal antikor hücre vasatlarından antikor izotiplendirmesi yapıldı. Antikor varlığının teyit edilmesi amacıyla ELISA sonuçlarına göre en yüksek pozitiflik oranına sahip G6-H7 klonunun süpernatantı kullanılarak antikor izotiplendirmesi yapıldı. Bu klonun IgG2b izotipine sahip olduğu belirlendi. Aynı zamanda antikorların reaksiyon gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla hibridoma vasatı ve FBS de Quickstrip ile test edildi (Resim 9).



Resim 9. Antikor izotiplendirmesinde kullanılan striplerin görünümü. G6-H7 süpernatantı (1), hibridoma hücre vasatı (2), FBS (3) ile gösterilmiştir. Kesikli ok ile gösterilen şeritler testin kontrolü, diğer ok ise IgG2b'nin varlığını göstermektedir.

İzotiplendirme işleminden sonra ELISA pozitif olarak belirlenen klonlar doğrulama amacıyla western blot ile test edildi ancak viral proteinlere spesifik bantlar elde edilemedi. Sonuç olarak elde edilen klonların KKKAHV'ne spesifik olmadığı, ELISA testinde yalancı pozitiflik verdiği ortaya kondu ve diagnostik amaçlı kullanıma uygun klonlar olmadığı belirlendi.

7. TARTIŞMA

KKKAH bugüne kadar Türkiye'nin de içinde bulunduğu 30'dan fazla ülkede geniş bir coğrafya üzerinde yaygınlık göstermektedir (1). Hastalık ilk kez 1944 yılında Rusya'da rapor edilmiş, önceki yıllarda serolojik bulgulara rastlanmasına rağmen Türkiye'de ilk kez 2002 yılında tanımlanmıştır (1, 21). Vaka sayısı bu tarihten itibaren günümüze kadar her yıl artarak devam etmiştir. Hastalık ülkemizde %5 mortaliteyle seyretmektedir (1). Hastalığın epidemiyolojisinde ve nakledilmesinde keneler rol oynamaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda virüs 31 kene türünden ve *Culicoides spp.* cinsi bir sinekten izole edilmiştir. Ancak bu türlerin tamamının vektörlük kabiliyeti bulunmamaktadır. Bir türün gerçek manada vektör olabilmesi için, gelişme safhasının herhangi bir döneminde, viremik konaktan kan emerken virüsü alabilmesi ve müteakip safhada kan emdiği konağa virüsü verebilmesi gerekir. KKKAH virüsü vektör keneler tarafından hem transtadial hem de transovarial olarak nakledilir. Ixodid kene türlerinden özellikle *Hyalomma m. marginatum* adlı kene türünün hastalığın vektörü olduğu bilinmektedir. Ülkemizde endemik bölgelerdeki yapılan araştırmalarda sığır, koyun ve keçilerden toplanan kenelerin %50-80'inin *Hyalomma m. marginatum* olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde endemik bölgelerde *Hyalomma m. marginatum* popülasyonunun yaygınlığı KKKAH'nın yayılmasında ve dolayısıyla önemli halk sağlığı problemlerinden biri haline gelmesinde rol oynamaktadır. Virüs doğada sığır, koyun, keçi gibi hayvanlarda subklinik seyretmektedir. Ayrıca yaban tavşanı ve domuzların da virüsün doğadaki döngüsünde rol oynadıkları bildirilmiştir. Viremi dönemindeki bu hayvanlar kan emen keneler için enfeksiyon kaynağını

oluşturmaktadır. Ayrıca viremi dönemindeki sığır, koyun ve keçilerin kesimlerinin yapıldığı mezbaha personeli bu hayvanların kanıyla direkt temas halindedir. Bu durum özellikle tarım ve hayvancılıkla uğraşan meslek gruplarını ve mezbaha çalışanlarını risk altına sokmaktadır. Bunun yanında kesin teşhis yapılamamış veya hatalı teşhis yapılmış hastalarla temas halindeki sağlık çalışanları nozokomiyal bulaşmaya maruz kalabilmektedir. Ayrıca hastalığın spesifik bir tedavisinin bulunmaması ve henüz etkili bir aşılanmanın olmaması erken teşhisin önemini arttırmaktadır (119).

KKKAH'nın teşhisinde hücre kültürü, antijen ve antikor saptamaya yönelik serolojik testler (EIA, IFA, ELISA), real-time PCR, spesifik IgM tanısı yapılması ve klinik bulgular kullanılmaktadır. Hücre kültüründe izolasyon daha basit ve hızlıdır fakat diğer metoda göre daha az hassastır. Virüs LLC-MK2, BHK-21, Vero ve SW-13 hücre tiplerinden izole edilebilmektedir. Virüs izolasyonu hücre kültüründe 4-7 günlük inkübasyondan sonra yapılmaktadır. Fakat hücre kültürünün hassasiyeti düşük olduğundan izolasyon yapılabilmesi için hastalığın ilk 5 günündeki hastalardan alınmış yüksek viremi dönemindeki örneklerle ihtiyaç vardır. Virüs izolasyonu hassas bir metod olmasına karşın Birleşik Devletler Salgın Koruma ve Kontrol Merkezi (USCDC) KKKA hastalığı virüsünü yüksek güvenli laboratuvar patojeni olarak sınıflandırmıştır (120) ve 2008 yılı itibariyle 1'i Türkiye'de, 14'ü Avrupa Birliği'ne üye ülkelerde ve 8'i Rusya'nın endemik bölgelerinde olmak ancak 20 kadar laboratuvar hastalığın teşhisini yapabilmektedir. Ancak bu laboratuvarların sadece 8 tanesi virüs izolasyonu için gerekli biyogüvenlik şartlarını taşımaktadır. Ayrıca KKKAHV Turkey-Kelkit06 suşunun duyarlı hücre kültürlerinde spesifik sitopatik etki

oluşturmaması hücre kültürü ile yapılan teşhisi zorlaştırmaktadır (117). Bazı endemik bölgelerde hastalığın teşhisini yapabilecek kapasitede laboratuvarların bulunmamasının yanı sıra bu bölgelerden numunelerin uluslararası transferini zorlaştıran ekonomik ve lojistik sebepler de hastalığın teşhisini sınırlandırmaktadır.

Akut fazda en önemli teşhis metodları viral antijenlerin gösterilmesine yönelik antijen ELISA testi ve viral genomun gösterilmesi amacıyla real-time PCR testidir. Real-time PCR testi oldukça duyarlı ve hassas bir test olması ve erken teşhis imkanı vermesine karşın özel ekipman ve personel gerektirmektedir. Bu durum hastalığın kırsal kesimde bulunan imkanları kısıtlı merkezlerde teşhisini güçleştirmektedir. Bu sebepten hastalığın yerinde teşhisinin yapılabilmesi için daha basit ve kolay uygulanabilir bir test olan antijen belirlemeye yönelik ELISA testi önem kazanmaktadır.

Klinik bulgulara dayanılarak yapılan biyokimyasal teşhis metodları arasında trombositopeni, lökopeni varlığı, AST, ALT, LDH ve CPK enzim seviyelerindeki artışlar, protrombin zamanının uzaması ve fibrinojen seviyesinin azalması kullanılmaktadır. Ancak bu veriler kesin teşhis için yeterli değildir (121). Virüse spesifik IgM ve IgG yanıtı en erken hastalığın başlangıcından 7 gün sonra belirlenebilmektedir. Diğer yandan KKKAH'nda viremi prehemorajik dönem olarak sınıflandırılan hastalığın 1-7. günleri arasında pik seviyeye ulaşmaktadır. Bu dönemde viral antijenlerin tespiti önem kazanmaktadır. Bu aşamada real-time PCR metodu hassas bir test olarak kullanılmaktadır. Ancak real-time PCR testinin yapılabilmesi için alt yapı ve uzman personel gereksinimi bu testin yaygın olarak kullanımını

sınırlandırmaktadır. Vanhomwegen *ve ark.* yaptıkları bir çalışmada Balkan bölgesinde ve Türkiye’deki hasta serumlarında real-time PCR testinin spesifitesini serolojik metodlarla karşılaştırıldığında diğer ülkelerden elde edilen serumlara göre daha düşük bulmuşlardır (% 37,5). Bunun nedeni olarak referans laboratuvarlar tarafından geliştirilen in-house metodların bölgede yaygın olan virüs suşlarına göre optimize edildiği için geniş spektrumu kapsayan testlere göre daha düşük deteksiyon limitine sahip olması gösterilmektedir (122). Bu yüzden in-house metodların bölgelerde yaygın olan virüs suşlarına spesifik olarak geliştirilip standardize edilmesi gerekmektedir. Bunun yanında örneklerin dondurulup çözündürülmesinden kaynaklanan RNA degradasyonu ve örneklerde bulunan inhibitör bileşiklerin PCR reaksiyonunu degrade etmesi serolojik metodlarla karşılaştırıldığında sensitivitenin düşmesine neden olabilmektedir (122). ELISA gibi serolojik metodların diğer yandan real-time PCR gibi moleküler testlere göre özel ekipman ve uzman personele ihtiyaç duymaması, kısa sürede sonuç vermesi, pratik olması gibi avantajları vardır. KKKAH enfeksiyonunun serolojik olarak teşhis edilmesinde kullanılan ticari ELISA kiti sadece Rusya’da üretilmiştir ve bu ticari kit aynı zamanda sadece o bölgede yaygın virüs suşuna spesifiktir. Sığır, koyun, keçi, domuz ve tavşan gibi enfeksiyon zincirinde yer alan hayvanlar için geliştirilmiş ticari kitler henüz söz konusu değildir.

Bu çalışmada KKKA enfeksiyonunun teşhisi amacıyla antijen belirlemeye yönelik ELISA testi ve insan, sığır, koyun, keçi, fare ve tavşan serumlarında antikor belirlemeye yönelik indirekt ELISA testlerinin geliştirilip standardize edilmesi hedeflenmiştir.

Antijen ELISA testinde detektör antikor olarak kullanılmak üzere üretilen tavşan serumlarının işaretlenmesi amacıyla kullanılan kitin tam bir pürifikasyon işlemi yapılamadığı için çalışmadığı düşünülmektedir. Pürifikasyon işleminde tam bir başarı elde edilmesi için yüksek duyarlılığa sahip kromatografik metodların kullanılmasına ihtiyaç vardır. Elde edilen pürifiye tavşan antikorları ELISA pleytlerinin tabanına bağlanarak yakalayıcı antikor olarak kullanıldı. Daha sonra test edilmek istenen insan serumları sulandırılarak, serum örneklerinde KKKAHV antijeninin varlığı arandı. Detektör antikor olarak HRP ile işaretli pürifiye anti-KKKAHV tavşan antikoru kullanıldı ve spesifik substrat kullanılarak sonuçlar görüntülendi.

Antijen ELISA standardizasyonunda kullanılan 33 adet insan serumu Vectorbest® ve real-time PCR ile karşılaştırıldı. Geliştirilen antijen ELISA'nın Vectorbest® ticari kitine göre duyarlılığı %94, özgüllüğü %95 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre her iki test arasında yüksek oranda bir korelasyon saptandı.. Aynı zamanda geliştirilen antijen ELISA kitinin real-time PCR testi ile karşılaştırıldığında ise duyarlılığı %94, özgüllüğü ise %95 olarak belirlendi. Testin deteksiyon limiti ise 3×10^3 olarak hesaplandı. Diğer yandan Ankara ve Samsun RSHM'de test edilen serum örneklerinin antijen ELISA ve real-time PCR sonuçları karşılaştırıldığında özgüllük % 100, hassasiyet ise sırasıyla % 54 ve % 84 olarak hesaplandı. Testin hassasiyet oranındaki bu değişkenliğin sebebinin kullanılan real-time PCR protokolündeki farklılıklardan ileri geldiği düşünülmektedir. Çünkü Ankara RSHM real-time protokolüne göre 30. siklus ve üzerindeki serumlar real-time pozitif olarak değerlendirilirken laboratuvarımızdaki protokole göre 27. siklus ve üzerindeki serum örnekleri negatif olarak

değerlendirilmektedir. Real-time PCR protokolleri arasındaki bu farklılık testin hassasiyet oranlarına yansımıştır. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2011 yılında KKKAH tanısıyla hastanede yatmakta olan 17 adet hasta serumunda antijen ELISA ile % 94.55, 2010 yılına ait ve diğer testlerle konfirme edilen 30 hastada % 49.66 oranının bulunması serum örneklerinin dondurulup çözündürülmesinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Ayrıca geliştirilen antijen ELISA testinin tekrar edilebilirliğinin gösterilmesi amacıyla intra ve inter-assay varyasyonları istatistiksel olarak hesaplanmış ve sonuçlar testin tekrar edilebilir olduğunu göstermiştir.

Virüsün doğadaki yayılımında kenelerin rol oynadığı bilinmektedir. Bu yüzden virüsün kenelerdeki yaygınlığının saptanması amacıyla geliştirilen antijen ELISA testi kenelerde kullanılmak üzere standardize edildi. Bu amaçla Çorum, Tokat ve Yozgat'tan toplanan 320 adet kene antijen ELISA ile test edildi. Sonuç olarak kenelerin 11 tanesinde (% 3,43) KKKAH antijeninin varlığı antijen ELISA testi ile gösterildi ve pozitif örnekler aynı zamanda real-time PCR ile doğrulandı. Böylece geliştirilen antijen ELISA testinin kenelerden virüs tespiti için de kullanılabileceği gösterildi.

Seroepidemiyolojik olarak anti-KKKAHV antikorlarının insanlarda ve sığır, koyun, keçi gibi hayvanlarda saptanabilmesi amacıyla indirekt ELISA testleri geliştirildi. İnsan indirekt ELISA testinde testin standardizasyon aşamasında kullanılan normal insan konjugatlarında negatif serum örneklerinde yüksek background alındı. Problemin çözümü için farelerde üretilmiş antikoru Fd bölgesine spesifik insan konjugatı kullanıldı. İki konjugat arasındaki spesifikite farkının antikorların Fd kısımlarının ağır zincirin diğer bileşenlerinde bulunmayan

bölgeleri içermesinden ileri geldiği düşünülmektedir. İnsan serumlarında anti-KKKAHV antikorlarının saptanmasına yönelik ELISA testi geliştirildikten sonra testin duyarlılık ve özgüllüğü teşhis amaçlı dünyada geliştirilen tek ticari kit olan Vectocrimean-CHF-IgG ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak geliştirilen indirekt IgG ELISA testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %100 olarak belirlendi.

Ayrıca hastalığın doğadaki yaygınlığının serolojik olarak belirlenebilmesi için sığır, koyun ve keçilerde kullanılmak üzere geliştirilen ELISA testinin güvenilir ve tekrar edilebilir olduğu yapılan western blot testi ve endemik bölge serumlarının çalışılmasıyla gösterildi. Elde edilen ELISA sonuçları koyun ve keçilerin de en az sığırlar kadar enfeksiyonun doğadaki döngüsüne katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Monoklonal antikor elde etmek için yürütülen çalışmalar neticesinde füzyon işlemi sonucunda 92 adet hibridoma klonu elde edilmiş, yapılan ELISA testleri neticesinde bu klonlardan 11 tanesinin spesifik klon olduğu görülmüş ve bu 11 klonun 5 tanesi stabilitesini devam ettirmiştir. Ancak klonlar ELISA pozitif çıkmalarına rağmen western blot analizi ile doğrulanamamıştır. Sonuç olarak klonların az miktarda antikor salgıladıkları düşünülerek yoğunlaştırma çalışmaları yapılmış ancak yine western blot ile pozitif sonuç alınamamıştır.

Sonuç olarak geliştirilen ELISA testlerinin, insanlarda hızlı ve güvenilir teşhisine imkan sağlamasının yanı sıra virüsün doğal hayattaki döngüsünde yer alan doğal hayattaki canlılarda hastalığın teşhisine yönelik serolojik çalışmalara katkı sağlaması düşünülmektedir. Yüksek güvenlikli laboratuvar gerektiren virüs izolasyonu yoluyla teşhise gerek kalmadan hemen hemen bütün teşhis laboratuvarlarında KKKAH'nın hızlı teşhisi yapılabilecektir. Böylece hasta

örneklerinin teşhis laboratuvarlarına nakledilmesi ile ilgili zorluklar ortadan kalkmış olacaktır. Bu şekilde hastalığın hızlı ve doğru teşhis edilmesi, öngörülen tedavi yöntemlerine zaman kaybetmeden başlanabilmesi ve nozokomiyal bulaşmanın önüne geçilebilmesi açısından son derece önemli bir avantaj sağlayacaktır. Böylece endemik bölgelerde tedaviye geç başlanması neticesinde oluşan mortalite artışları kısmen de olsa engellenmiş olacaktır. Ayrıca enfeksiyon zincirinde yer alan yabani ve evcil hayvanlarda virüsün serolojik olarak teşhisinin yapılması epidemiyolojik açıdan risk alanlarının belirlenmesinde ve bu risk alanlarında koruyucu önlemlerin alınmasında oldukça önemli bir avantaj sağlayacaktır. Böylece endemik bölgelerdeki kenelerde hastalığın yaygınlığının bilinmesine katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda hastalığın risk alanlarının belirlenip gerekli tedbirlerin alınmasına yardımcı olabilir.

8. KAYNAKLAR

1. Ergonul Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Rev. Lancet Infect Dis* 2006; 6: 203-214.
2. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Rev. Antiviral Research* 2004; 64: 145-160.
3. Eliot RM, Bouloy M, Calisher CH. Virus taxonomy. Seventh report international committee for the taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press, 2000.
4. Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Rev. Curr Mol Med* 2005; 5(8): 753 - 760.
5. Woodall JP, Williams MC, Simpson DIH, et al. The Congo group of agents. *Rep East Afr Virus Res Ins* 1965; 14: 34-36.
6. Causey OR, Kemp GE, Madbouilly MH. Congo virus from domestic livestock, African hedgehogs and arthropods in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19: 846-850.
7. Yu-Chen Y, Ling-Xiong K, Yu-Qin Z, et al. Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in china. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 1179-1182.
8. Chumakov MP. On 30 years of investigation of Crimean hemorrhagic fever. *Tr Inst Polio Virusn Entsefalitov Akad Med Nauk* 1974; 22: 5-18.
9. Hoogstral H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. *J Med Entomol* 1979; 15: 307-417.
10. Chumakov MP. A new virus disease- Crimean hemorrhagic fever. *Nov Med* 1947; 4: 9-11.
11. Chumakov MP, Butenko AM, Shalunova NV, et al. New data on the virus causing Crimean hemorrhagic fever (CHF). *Vopr Virusol* 1968; 13: 377.
12. Butenko AM, Chumakov MP, Bashkirtsev VN, et al. Isolation and investigation of Astrakhan strain of Crimean hemorrhagic fever virus and data on serodiagnosis of this infection. *Mater 15 Nauchn Sess Inst Poliovirus Ensefalitov* 1968; 3: 88-90.
13. Casals J, Henderson BF, Hoogstral H. A review of Soviet viral hemorrhagic fevers. *J Infect Dis* 1969; 122: 437-453.

14. Chumakov MP, Smirnova SE, Tkachenko EA. Antigenic relationships between Soviet strains of Crimean hemorrhagic fever virus and the Afro-Asian Congo virus strains. *Mater 16 Nauchn Sess Inst Poliovirus Ensefalitov* 1969; 2: 152-154.
15. Simpson DI, Knight EM, Courtious G. A hitherto undescribed virus occurring in Africa I. Human isolations-clinical notes. *East Afr Med J* 1967; 44: 86-92.
16. Gear JH, Thomson PD, Hopp M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in South Africa. Report of fatal case in the Transvaal. *S Afr Med J* 1982; 62: 576-580.
17. Fenner R. The classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 1975; 6: 1-12.
18. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and the other Nairoviruses. *Rev. Elsevier* 2006; 10: 596-603.
19. Hewson R, Clegg C. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Review of the virus, its natural history, associated human disease and potential for malevolent use. Office for counterproliferation and Technologies Defense Intelligence Agency 2003; 1: 1-88.
20. Regenmortel V, Fauquet CM, Bishop DHL. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. *Virus Taxonomy* 2000.
21. Tonbak S, Aktas M, Özdarendeli A, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: genetic analysis and tick survey in Turkey. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11): 4120-4.
22. Özdarendeli A, Canakoglu N, Berber E, et al. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. Short communication. *Virus Research* 2010; 147(2): 288-93.
23. Deyde VM, Krishtova ML, Nichol ST, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol* 2006; 80: 8834-8842.
24. Elliott RM, Schmaljohn CS, Collett MS. Bunyaviridae genome, structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 169: 91-141.
25. Schmaljohn CS, Hooper JW. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. (Editors). *Fields Virology* vol 1. fourth edition, Philadelphia: Lippincott 2001: 1581-1602.

26. Swanepoel R. Nairovirus infections. In: Porterfield JS. (Editor). Exotic viral infections. London: Chapman-Hall 1995: 285-293.
27. Marriott AC, Nutfall PA. Molecular biology of Nairoviruses. In: Elliott RM. (Editor). The Bunyaviridae. New York: Plenum Press 1996: 91-104.
28. Donets MA, Chumakov MP, Korolev MB. Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions causative agent of Crimean hemorrhagic fever. Intervirology 1977; 8: 294-308.
29. Nabeth P, Cheikh D. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Mauritania. Emerg Infect Dis 2004; 10: 2143-49.
30. Nichol ST. The Bunyaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. (Editors). Fields Virology vol 1. fourth edition, Philadelphia: Lippincott 2001: 1603-1633.
31. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/251.html.
32. Altamura LA, Bertolotti-Ciarlet A, Schmaljohn CS, et al. Identification of a novel C-terminal cleavage of Crimean-Congo hemorrhagic virus PreGn that leads to generation of NSm protein. J Virol 2007; 81: 6632-6642.
33. Duh D, Nichol ST, Khristova ML, et al. The complete genome sequence of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated from endemic region in Kosovo. Virol J 2008; 15: 5-7.
34. Yashina L, Petrova I, Seregin SV, et al. Genetic variability of Crimean-Congo hemorrhagic virus in Russia and Central Asia. J Gen Virol 2003; 84: 1199-1206.
35. Papa A, Bozovi B, Pavlidou V, et al. Genetic detection and isolation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus Kosovo, Yugoslavia. Emerg Infect Dis 2002; 8: 852-854.
36. Papa A, Papadimitriou E, Bozovi E, et al. Genetic characterization of the M RNA segment of a Balkan Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strain. J Med Virol 2005; 75: 466-469.
37. Midilli K, Gargili A, Ergonül Ö, et al. Imported Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in İstanbul. BMC Infect Dis 2007; 6(7): 54.
38. Kinsella E, Martin SG, Grolla A, et al. Sequence determination of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment. Virology 2004; 321: 23-28.

39. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L RNA segment and encoded protein. *Virology* 2004; 321: 29-35.
40. Terrence J. A structural examination of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Otu protease domain in the presence of the Ubiquitin and ISG15 substrates. *Manitoba Microbiol* 2010; 1(8): 1146-1201.
41. Bergeron E, Cesar GA, Krishtova ML. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Ovarian Tumor Protease Activity Is Dispensable for Virus RNA Polymerase Function. *J Virol* 2010; 84(1): 26-226.
42. Bertolotti-Ciarlet A, Smith J, Strecker K, et al. Cellular localization and antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *J Virol* 2005; 79(10): 652-61.
43. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, et al. Intracellular localization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *Virol J* 2005; 2: 42-46.
44. Simon M, Johansson C, Mirazimi A. Crimean-congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin, pH and cholesterol dependent. *J Gen Virol* 2009; 90: 210-215.
45. Dmitrov DS, Xiao X, Feng Y. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic virus entry factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 411(2): 213-18.
46. Mirazimi A, Magnusson KE, Connolly-Andersen AM. Basolateral Entry and Release of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in polazired MDCK-1 cells. *J Virol* 2007; 81(5): 2158-2164.
47. Jin M, Lee S, Park J, et al. Hantaan virus enters cells by clathrin dependent receptor mediated endocytosis. *Virology* 2002; 294(1): 60-69.
48. Mirazimi A, Simon M, Johansson C. Microtubule dependent and microtubule independent steps in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus replication cycle. *Virology* 2009; 385(2): 313-22.
49. Schmaljohn CS. Bunyaviridae family: viruses and their replication. In: H. J. Hawk (Editor). *Bunyaviridae* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott 1991; 303-329.
50. Mirazimi A, Moll G, Andersson M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic virus activates endothelial cells. *J Virol* 2011; 85(15): 7766-7784.

51. Rodriguez LL, Maupin GO, Ksiazek TG, et al. Molecular investigation of multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Trop Med Hyg* 1997; 57:512-518.
52. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Characterization of the glycoproteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol* 2002; 76: 7263-75.
53. Bertolotti-Ciarlet A, Smith J, Strecker K, et al. Cellular localization and antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *J Virol* 2005; 79(10): 652-61.
54. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, et al. Intracellular localization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins. *Virol J* 2005; 2: 42-46.
55. Bray M. Comparative pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and Ebola virus. In: Ergönül Ö, Whitehouse CA (Editors). *Crimean-Congo hemorrhagic fever*. Dordrecht:Springer 2007; 45-55.
56. Simon M. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Interaction with host cell structures in viral replication. Doc Thesis, Sweden, Karolinska Institutet 2008.
57. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Crimean-Congo hemorrhagic virus glycoprotein precursor cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases. *J Virol* 2006; 80: 514-525.
58. Vincent MJ. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol* 2003; 76: 8640-9.
59. Bishop DH. Biology and molecular biology of Bunyaviruses. In: Elliott RM (Editor) *In: The Bunyaviridae*. New York: Plenum Press 1996; 19-65.
60. Anagnostou V, Papa A. Evolution of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 948-953.
61. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1379-1384.
62. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu, Ankara: TTB yayınları 2008
63. Hoogstral H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe and Africa. *J Med Entomol* 1979; 15: 307-317.

64. Yilmaz GR, Buzgan T, Irmak H, et al. The epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Turkey. *Int J Infect Dis* 2009; 13(3); 380-6.
65. Maltezou HC, Papa A, Tsiodras S, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Greece. *Int J Infect Dis* 2009; 13(6); 713-6.
66. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Report for OIE, collaborated with The Center for Food Security and Public health, 2009.
67. Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Curr Mol Med* 2005; 5; 763-80.
68. Lwande WO, Irura Z, Tigoi C, et al. Seroprevalance of Crimean-Congo hemorrhagic virus in Ijara District, Kenya. *Vec-borne and Zoo Dis* 2012; 12(9); 727-732.
69. Watts DM, Ksizaek TG, Hoogstral H. Crimean-Congo hemorrhagic fever In: Monath TP (Editor) In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* vol II. Boca Raton: CRC Pres 1989; 177-222.
70. Shimshony A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: A re-emerging, potential deadly illness. *Infect Dis News* 2010; 15(10);19504.
71. Berezin VV, Chumakov MP, Reshetnikov IA, et al. Study of the role of birds in the ecology of Crimean hemorrhagic fever virus. *Virus Ekol* 1971; 6; 94-95.
72. Shepherd AJ, Swanepoel R, Cornel AJ. Experimental studies on the replication and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in some African tick species. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40; 326-31.
73. Gonzalez JP, Camicas JL, Faye O. Sexual and transovarian transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in *Hyalomma Marginatum*. *Res Virol* 92:143; 23-28.
74. Durden LA, Logan TM, Wilson ML. Experimental vector incompetence of a soft tick for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Med Entomol* 1993; 30; 493-496.
75. Gordon SW, Linthicum KJ, Moulton JR. Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two tick species. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48; 576-580.

76. Shepherd AJ, Swanepoel R, Shepherd SP. Viraemic transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus to ticks. *Epidemiol Infect* 1991; 106; 373-382.
77. van de Wal BW, Joubert JR, van Eden PJ. A nosocomial outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever at Tygerberg hospital. *S Afr Med J* 1985; 68; 729-732.
78. Papa A, Bino S, Llagami A, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Albania. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 2; 603-606.
79. Balashov IuS. Ecological niches of ectoparasites. 2005; 39(6); 441-56.
80. Bray M, Mahanty S. Viral hemorrhagic fevers and septic shock. *J Infect Dis* 2003; 188; 1613-1617.
81. Nichol ST, Devendra TM, Pragya D. Detection, Isolation and Confirmation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human. *Neglected Trop Dis* 2010; 2; 193-201.
82. Ergönül Ö, Tuncbilek S, Baykam N, et al. Evaluation of serum levels of IL-6 and IL-10 and TNF-alpha in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2006; 193; 941-4.
83. Duru F, Fisgin T. Hematological aspects of Crimean-Congo hemorrhagic fever (Rev.). *Turk J Hematol* 2009; 26; 161-6.
84. Akıncı E, Bodur H, Çolpan A, et al. Kırım-Kongo hemorajik ateşi: iki olgu sunumu. *Klimik Derg* 2004; 17(3); 214-5.
85. Kuscu F, Baris O, Tutuncu E, et al. Evaluation of the association of serum levels of hyaluronic acid, sICAM-1, sVCAM-1 and VEGF-A with mortality and prognosis in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol* 2010; 47(2); 115-9.
86. Peters CJ, Anderson GW, Jahrling PB. Pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *Rev Infect Dis* 1989; 2(4); 743-9.
87. Bray M. Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(4); 399-403.
88. Marty AM, Jahrling PB, Geisbert TW. Viral hemorrhagic fevers. *Clin Lab Med* 2006; 26(2); 345-86.
89. Günaydın N, Aydın K, Yılmaz G, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever cases in the Eastern Black Sea region of Turkey: demographic, geographic climatic and clinical characteristics. *Turk J Med Sci* 2010; 19; 839-846.

90. Mood Sharifi B, Mardani M, Metanat M. Clinical manifestations, laboratory findings and clinical outcome in 6 pregnant women with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Iranian J Clin Inf Dis* 2007;2(4) 193-196.
91. Kandis H, Katirci Y, Baltaci D, et al. Investigation of clinical and laboratory findings of 26 cases Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Biomed Res India* 2012; 23(4); 589-93.
92. Gonen İ. Clinical and laboratory findings of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Mic* 2011;26(2);113-9.
93. Midilli K, Gargili A, Ergonul O, et al. The first clinical case due to AP92 like strain of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and a field survey. *BMC Infect Dis* 2009; 9;90-9
94. James H, Gear S. Crimean Congo Hemorrhagic Fever. *Soc Am J* 1982; 62; 576-89.
95. Gürbüz Y, Sencan I, Tütüncü E. Case of nosocomial transmission of Crimean–Congo hemorrhagic fever from patient to patient. *J Infect Dis* 2009; 13(3); 103-107.
96. WHO: The ribavirin recommended treatment for Crimean-Congo Haemorrhagic Fever patients. WHO /GAR document.
97. Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, et al. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 1972; 177(4050); 705-6.
98. Swanepoel R, Shepherd AJ, Leman PA, et al. A common-source outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever on a dairy farm. *S Afr Med J* 1985; 68; 635-7.
99. Fisher-Hoch SP, Khan JA, Rehman S, et al. Crimean- Congo haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet* 1995; 346;472-5.
100. Ergönül Ö. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antivir Res* 2008; 78; 125-131.
101. Swanepoel R, Mynhardt H. Criteria for clinical diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. 1987.
102. Mirazimi A, Lindgren G, Karlberg H. Comparison of antiviral activity of recombinant and natural interferons against Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Open Virol J* 2010; 4;38-41.

103. Diagnostic assays for Crimean-Congo hemorrhagic fever. (Res). 2007. CDC Home.
104. Zeller H. Laboratory diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. Springer 2007: 233-243.
105. Hasan S. Using of ELISA in diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Bioscience methods 2012: 3(6); 123-129.
106. Diagnostic tests for Crimean-Congo hemorrhagic fever. European Commission Report for the Scientific Committee on Animal Health, 2009.
107. Mourya DT, Yadav PG, Shete AM, et al. Detection, isolation and confirmation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human, ticks and animals. Plos Neg An Trop Dis 2012: 6(5); 1653.
108. Cagatay A, Kapmaz M, Karadeniz A, et al. Haemophagocytosis in a patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Med Virol 2007: 56;1126-1128.
109. Shimshony A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: A re-emerging, potential deadly illness. Infect Dis News 2010: 15(10);19504.
110. Berezin VV, Chumakov MP, Reshetnikov IA, et al. Study of the role of birds in the ecology of Crimean hemorrhagic fever virus. Virus Ekol 1971: 6; 94-95.
111. Shepherd AJ, Swanepoel R, Cornel AJ. Experimental studies on the replication and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in some African tick species. Am J Trop Med Hyg 1989: 40; 326-31.
112. Gonzalez JP, Camicas JL, Faye O. Sexual and transovarian transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Hyalomma Marginatum. Res Virol 92:143; 23-28.
113. Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Rev. Curr Mol Med 2005; 5(8): 753 – 760.
114. Berber E, Canakoglu N, Ozdarendeli A, et al. Application of pseudo-plaque assay for detection and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Vir Met 2012: 187(1); 26-31

115. Uyar Y, Christova I, Papa A. Current situation of Crimean-congo hemorrhagic fever in Anatolia and Balkan Peninsula. *Turk Hij Den Biy Der* 2011; 68; 139-51
116. Tülek N, Doganci N, Tasdelen-Fisgin N. Initial high rate of misdiagnosis in Crimean-congo hemorrhagic fever patients in an endemic region of Turkey. *Epidemiol Infect* 2010; 138; 139-144
117. Reed, LJ, Muench M. A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27; 493-97.
118. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193; 265-75.
119. Schmaljohn C, Spik K, Hooper JW, et al. Immunogenicity of combination of DNA vaccines for Rift Valley virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus and Crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine* 2005; 26; 4657-66.
120. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/cchf.htm>
121. Tang Q, Saijo M, Morikawa S, et al. A patient with Crimean-congo hemorrhagic fever serologically diagnosed by recombinant nucleoprotein based antibody detection systems. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; 10; 489-91.
122. Vanhomwegen J, Alves JM, Asvic T, et al. Diagnostic assays for Crimean-congo hemorrhagic fever. *Emerg Infect Dis* 2012; ISSN 1080-6059.

9. ÖZGEÇMİŞ

22.07.1983 Kütahya’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kütahya Gazi Kemal İÖÖ (1994), Eskişehir Şeker Ortaokulu (1997) tamamladıktan sonra 2001 yılında Kütahya Yabancı dil ağırlıklı Lise’den mezun oldu. Lisans eğitimini Elazığ Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde 2007 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. Halen doktora eğitimine bu kürsüde devam etmektedir. Evlidir.