



## KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİNE GENEL BAKIŞ

Laleh BAHRIKAREHMI<sup>1\*</sup>, Serbülent YİĞİT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 55139, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Genetiği Anabilim Dalı, 55139, Samsun, Türkiye

**Özet:** Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) Bunyaviridae familyasından kene kaynaklı bir virüsün neden olduğu potansiyel olarak ölümcül bir zoonoz hastalıktır. KKKA virüsü, virüs taşıyan kenelerin ısırmasıyla, KKKA hastaların ve enfekte hayvanların kanı veya dokuları ile temas yoluyla insanlara bulaşır. İnsan enfeksiyonları spesifik olmayan ateşli semptomlarla başlar, ancak vaka fatalitesi olan ciddi bir hemorajik sendroma ilerlemesi % 2-50 oranındadır. Hızlı ve kesin tanı yaklaşımı hastaların kontrolü, tedavisi ve tespiti için kritik olduğundan epidemiyolojik çalışmalar için yararlıdır. KKKA'nın laboratuvar tanısı üç yaklaşıma dayanmaktadır: Virüs İzolasyonu, serolojik testler (IFA, RPHA (Ters pasif hemaglutinasyon testi) ve ELISA) ve antijen tespit testleri (ELISA, PCR). Dünyadaki ve Türkiye'deki çalışmaları, tüm veri tabanları üzerinden tarayarak KKKA'de biyogüvenliği, örnekleme ve tanı yöntemlerinin çeşitlerini incelemeyi amaçladık.

**Anahtar kelimeler:** Kırım-kongo kanamalı ateşi, Laboratuvar tanı, Teşhis


### An Overview of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Laboratory Diagnostic Methods


**Abstract:** Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a potentially deadly zoonotic disease caused by a tick-borne virus from the Bunyaviridae family. The CCHF virus is transmitted to humans by the bite of its virus-bearing ticks, through contact with the blood or tissues of CCHF patients and infected animals. Human infections begin with non-specific febrile symptoms, but their progression to a severe hemorrhagic syndrome with case fatality is 2-50%. The rapid and precise diagnostic approach is useful for epidemiological studies, as it is critical for the control, treatment and detection of patients. Laboratory diagnosis of CCHF is based on three approaches: Virus Isolation, serological tests (IIF, RPHA and ELISA) and antigen detection tests (ELISA, RT-PCR, Real Time RT-PCR and Microarray). Studies in the world and Turkey Biosecurity in CCHF by scanning through all databases, we aimed to examine the types of sampling and diagnostic aspects.

**Keywords:** Crimean-congo hemorrhagic fever, Laboratory diagnosis, Diagnosis

\*Sorumlu yazar (Corresponding author): Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 55139, Samsun, Türkiye

E mail: laleh.bahri.lb@gmail.com (L. BAHRIKAREHMI)

Laleh BAHRIKAREHMI  <https://orcid.org/0000-0003-4105-5991>

Serbüilent YİĞİT  <https://orcid.org/0000-0002-1019-3964>

**Gönderi:** 28 Eylül 2020

**Kabul:** 01 Kasım 2020

**Yayınlanma:** 01 Ocak 2021

**Received:** September 28, 2020

**Accepted:** November 01, 2020

**Published:** January 01, 2021

**Cite as:** Bahrikarehmi L, Yiğit S. 2021. An overview of crimean-congo hemorrhagic fever laboratory diagnostic methods. BSJ Health Sci, 4(1): 48-51.

### 1. Giriş

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) (Şekil 1) birçok organ ve sistemleri etkileyen, kanamalar ve karaciğer fonksiyon bozuklukları ile karakterize, mortalite oranı yüksek olan (%5-30) zoonotik enfeksiyondur (Bodur, 2004).

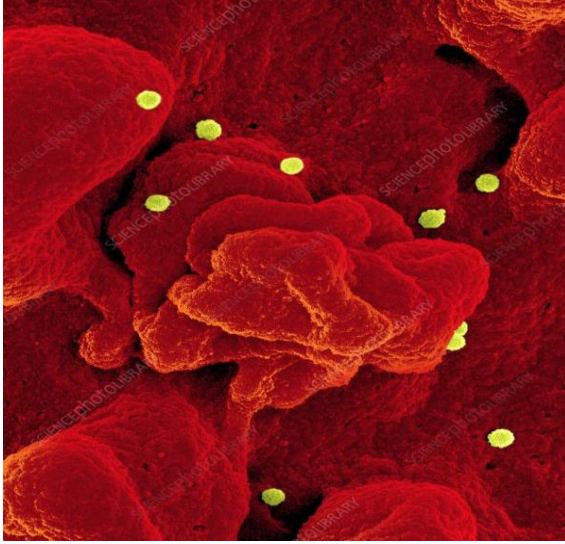
Türkiye'de yapılan çalışmalarda takip edilen olgulardaki mortalite oranı % 2-12 arasındadır. Enfekte olanlarda hastalık gelişme olasılığı yaklaşık %22'dir. Aslında enfekte olan her beş kişiden birinde hastalık gelişmektedir (WHO, 2008). KKKA'ya neden olan virüs insanlara genellikle vektör olan Hyalomma (Şekil 2) ve Amblyomma cinsi kenelerin ısırması ile bulaşır. Virüs, birçok evcil ve yabani hayvanı enfekte etmekte ve hastalık hafif seyretmektedir. Birçok kuş türü, virüse karşı dirençli iken, virüsün yayılmasında önemli rol oynarlar. Hayvanlardaki hastalık enfekte kenelerin ısırması ile başlamaktadır. Daha çok hayvancılıkla uğraşanlarda, mezbaha çalışanlarında, kırsal kesimde

yaşayanlarda enfekte hayvanların kan ve dokuları ile temas sonucu ya da süt içimi ile bulaş olabilmektedir. Nazokomiyal epidemilerin, ağır kliniği olan hastalara ait kan veya kanlı sekresyonlar ile direkt temasla ve hava yolu ile de oluşabileceği belirtilmektedir. Hastalık Afrika, Güney Doğu Avrupa ve Asya'daki birçok ülkede endemik olup Türkiye'den ise ilk defa 2002 yılında Tokat'tan bildirim yapılmış ve 2013 yılı itibarıyla yaklaşık 8000 olgu ve 400 ölüm saptanmıştır.

Türkiye'nin pek çok ilinden bildirimler var olmakla birlikte olguların çoğunun (%95) Mart-Ekim ayları arasında, Karadeniz Bölgesinin iç kısımları, Orta ve Doğu Anadolu'nun kuzey ve orta bölgelerinde görüldüğü tespit edilmiştir (SB, 2004). Bu hastalığın semptomlarının başlaması ani olarak ve yaklaşık 1 ila 7 gün arasında sürer. Hastalığın ilk belirtileri gribe benzemektedir. Hastada şiddetli baş ağrısı, ateş, titreme, eklem ağrısı, kas ağrıları, baş dönmesi, boyun ağrısı ve sertliği, göz ağrısı ve ışık korkusu gibi semptomlar gözlenir. Bulantı ve



kusma, bazen ishal, karın ağrısı ve iştah kaybı ile birlikte, hastalığın erken evrelerinde, boğaz ağrısı ortaya çıkabilir. Ateş sıklıkla 3 ila 16 gün sürer. Yumuşak ve sert damakta ve boğazda leke şeklinde lezyonları, yüz, boyun, göğüste hafif kanamalar ve kızarıklık gözlenmesi yaygındır. İnek, koyun ve keçi gibi ruminantlar virüs ile enfekte olduktan sonra bir hafta boyunca kanlarında virüs saptanabilir ve bu süreçte hiçbir belirti göstermeyebilirler (Ergonul, 2008).



**Şekil 1.** Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) virüsü. Bir hastadan kültürlenmiş epitel hücrelerinin yüzeyinden tomurcuklanan KKKA viral partiküllerinin (sarı) renkli taramalı elektron mikroskobu (SEM) (https://www.sciencephoto.com/media/945621/view/crimean-congo-hemorrhagic-fever-virus-sem).



**Şekil 2.** Hyalomma (https://www.woidmo.org/alerts/crimean-congo-hemorrhagic-fever-russia/).

Hastalığın hızlı teşhisinin önemi nedeniyle bu çalışmada, KKKA hastalığının laboratuvar tanı yöntemlerini inceleyeceğiz. İnsanlarda, laboratuvar testleri genellikle kan, plazma, serum, vücut sıvıları veya biyopsiler üzerinde yapılır. Şüpheli KKKA numunelerinin transferi, yüksek riskli enfeksiyon örneklerinin taşınması ile ilgili uygun spesifik protokoller ile yapılmalıdır. Numune ile

birlikte bir klinik bilgi formu ve hasta epidemiyolojik bilgileri gönderilmelidir. KKKA virüsü izolasyonu amacıyla hücre kültürü yapmak için 4'üncü seviye biyolojik güvenlik özellikleri gösteren uygun laboratuvar şartları gerekir. 4. seviyede uygun biyolojik güvenliğe sahip olmayan laboratuvarlarda çalışma yapılacak ise tanıdan önce örneğin geçerli yöntemlerle inaktif hale getirilmesi gerekir. Numuneyi etkisiz hale getirmek için hemorajik ateşlerin mevcut kılavuzları arasında örnek manipülasyonundan önce ısı kullanımı, gama çözülme ve triton X100'le muamele yer alır (Ergonul ve Whitehouse, 2007). KKKA virüsü diğer Bunyaviride ailesi gibi yağlı çözeltilere ve iyonik olmayan deterjanlara karşı hassastır. Serum örneği 60 °C'de 60 saniye ısıtılarak inaktive edilmelidir. Doku örnekleri, virüsü teşhis etmek için kullanılacak %10 formalin veya diğer doku stabilizatörlerine yerleştirilmelidir. Ayrıca 4. seviye biyolojik güvenliği olan (BSL4) laboratuvarında kullanılan tüm teşhis reaktifleri kullanımdan önce ultraviyole ile steril edilmelidir (Ergonul ve Whitehouse, 2007; Morshed ve ark., 2007).

## 2. Örneklem

İnsanda KKKA hastalığının şüpheli, olası ve kesin olarak üç sınıflandırılmış tanımı bulunmaktadır;

- Şüpheli tanım: hastalığın ani başlaması ateş, kas ağrısı, kene ısırması, hemorajik belirtiler (peteşi döküntüsü, oral mukoza ve burun kanaması, kusma, hematüri, epidemiyolojik semptomlardan biri (kenelerin ısırması, taze kan veya enfekte olmuş hayvanların diğer dokularıyla doğrudan temas, kesin veya şüpheli KKKA hastası ile doğrudan temas, çiftlik hayvanlarıyla temas etme olasılığı bulunan kırsal bir bölgede kalmak veya seyahat etmek).
- Olası tanım: lökopeni veya lökositoz ile ilişkili olabilecek şüpheli trombositopeni vakaları.
- Kesin tanım: olası vakalar ve pozitif serolojik testler veya virüsü şüpheli KKKA olan birinden izole etmek (Majidzadeh ve ark., 2011).

## 3. Virüs İzolasyonu

Virüs izolasyonu, viremi yüksek olduğunda hastalığın ilk 5 günü boyunca başarılıdır. SW-13, Vero, CER, LLC-MK2 veya BHK-21 gibi çeşitli hücre kültürleri kullanılabilir. Sitopatik etki (CPE) genellikle görülmez; bu nedenle virüs izolasyonu, kantitatif RT-PCR'de titrelerin artırılması veya kontroller olarak bilinen antikor pozitif serum örnekleri kullanılarak dolaylı immüno floresan analizi (IFA) ile doğrulanabilir. Hücre kültüründe KKKA virüsü izolasyonu hastalığa karşı bağışıklık tepkisini bir antijenik madde ile tetikledikten 1-6 gün sonra yapılır. Virüs ayrıca yeni doğan farelerin beyin dokusu içine inokülasyonu ve ardından izolasyonu ile elde edilebilir. Bu prosedür hücre kültüründen daha duyarlıdır ve 5-10 gün sürer (Shepherd ve ark., 1986; Papa, 2019). Plak azaltma nötralizasyon testleri, KKKA nötralizasyon

antikorlarının seviyesini tahmin etmek için uygulanabilir. 4. seviye biyolojik güvenliği olmayan laboratuvarlarda, virüse karşı serum nötralizasyon aktivitesi psödötipi bir virüs kullanılarak ölçülebilir (Berber ve ark., 2013). Anti-KKKA virüsü ile problemlen enfekte olmuş hücrelerin enzim katalizli renk gelişimine dayanan sahte plak indirgeme nötralizasyon testi antikorlar da uygulanabilir (Ackermann-Gaumann ve ark., 2019).

#### 4. Moleküler Yöntemler

Enfeksiyondan sonraki ilk günlerde, laboratuvar teşhisi esas olarak klinik örneklerde viral RNA'nın ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile saptanmasıyla sağlanır. PCR için kullanılacak örnek tipleri arasında tam kan, plazma, serum, beyin-omurilik sıvısı, idrar, tükürük, biyopsi ve nekropsi örnekleri bulunur. Viremi, hastalığın onsekizinci gününe kadar tespit edilebilir; bununla birlikte, PCR testi antikorların üretiminden önce en başarılıdır (semptomların başlamasından sonraki ilk 5 gün boyunca). İlk RT-PCR protokolü 1996 yılında tarif edilmiştir, KKKAV (kırım-kongo kanamalı ateşi virüsü) RNA tespiti için yaygın olarak kullanılmıştır ve halen kullanılmaktadır. Ayrıca, ticari RT-PCR platformlarının sayısı artmaktadır. RT-PCR protokolleri, lokal KKKAV suşlarını veya virüsün birden fazla genetik soyunu tespit etmek için tasarlanmıştır. Farklı virüs suşları göçmen kuşlar veya hayvan ticareti yoluyla taşınabileceğinden geniş spektrumlu bir PCR testi kullanılması tercih edilir. viral yükün hastalığın şiddeti ve sonucu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu düşünüldüğünde, nicel gerçek zamanlı RT-PCR, hastalığın seyri için yararlı bir gösterge sağlayabilir. Uzun süreli viremi raporları olmasına rağmen, virüs genellikle hastalığın ilk haftasında tespit edilebilir. Pozitif sonucu olan hastalarda, ölümcül sonuçları olan vakaların aksine virüs temizlenir (Hasanoğlu ve ark., 2018). Virüsün tüm genom dizisini elde etmek amacıyla KKKA kültür süpernatantları ve KKKA pozitif keneler üzerinde de novo next generation sequencing (NGS) kullanımı hakkında raporlar vardır. WGS'lerin analizi, virüs gelişimi, rekombinasyon ve yeniden sıralama olayları üzerine yapılan çalışmaların temelini oluşturur ve etkili teşhis araçlarının tasarlanmasını sağlar. De novo NGS'nin doğrudan klinik örneklerde tanısal kullanımı, yüksek viremili vakalarda başarılıdır. Amplifikasyon hedeflendiğinde, virüs düşük konsantrasyonlarda bile tespit edilebilir (Dinçer ve ark., 2017).

#### 5. Serolojik Yöntemler

Serolojik testler antijenik varyasyona duyarlıdır, ancak genellikle genetik varyasyondan daha az etkilenir. Çoğu test, insanlarda erken, güçlü ve uzun süreli bir bağışıklık tepkisine neden olan KKKAV N proteinini hedefler. Aktif KKKAV enfeksiyonu, semptom başlangıcından 4-9 gün sonra, enfeksiyonun akut fazını takiben IgM veya IgG titresinde belirgin bir artış ile tespit edilebilir; bununla birlikte, ciddi ve ölümcül vakalar sıklıkla saptanabilir bir

antikor yanıtı oluşturmaz. Anti-KKKA IgG'nin saptanması, mevcut veya çözülmüş enfeksiyonu gösterebilir (enfeksiyondan yıllar sonra) ve sürveyans epidemiyolojik çalışmalarında yararlı olabilir. KKKA için ELISA testi IFA veya nötralizasyon testinden daha iyidir. Virüs nötralizasyon analizleri teşhis için daha az yararlıdır, çünkü KKKA, nispeten düşük seviyelerde nötralizasyon edici antikorlar ortaya çıkarır, ancak epidemiyoloji ve aşı araştırmaları için yararlı olabilir. KKKAV nötralizasyonu genellikle plak indirgeme nötralizasyonu kullanılarak gerçekleştirilir ve 5-7 gün için de sonuçlar elde edilir (Mazzola ve Kelly-Cirino, 2019).

#### 6. Moleküler Epidemiyoloji

KKKA virüsü, GenBank'taki izolatlar arasında S, M ve L segmentleri için %20, %31 ve %22 sapma ile yüksek derecede dizi çeşitliliği gösterir. Viral S segmentinin bir analizine dayanarak, virüsün Afrika'dan Avrupa'ya, Orta Doğu'ya ve ardından Asya'ya uzun bir coğrafi yayılma geçmişi olduğunu gösteren altı veya yedi viral soy tanımlanmıştır. Genom çeşitliliği, kene içinde memeli konakçıdan daha fazla olabilir. KKKAV'nin geniş dizi çeşitliliği muhtemelen suşların dolaşım ve yeni coğrafi bölgelere adaptasyonu ile artırılan genetik yeniden düzenlenmelerden kaynaklanmaktadır (Mazzola ve Kelly-Cirino, 2019).

#### 7. Tartışma

KKKA'nın laboratuvar tanısı üç yaklaşıma dayanmaktadır: virüs izolasyonu, serolojik testler (IIF, RPHA ve ELISA) ve antijen tespit testleri (ELISA, RT-PCR, Gerçek Zamanlı RT-PCR ve Mikroarray). Bu hastalığın erken teşhisi, hasta tedavisi, potansiyel nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesi için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, tekrar olan bir enfeksiyonu ve tekrar olmayan bir enfeksiyonu ayırt etme yeteneği prognostik değere sahip olabilir. ELISA ve IFA testleri gibi yaygın olarak kullanılan serolojik testler ile hastaların serumunda virüse karşı oluşan IgM veya IgG tipi antikorlar belirlenerek tanı konulabilmektedir. IgM ve IgG antikorları hastalığın 6-7. gününden itibaren serumda belirlenebilmektedir. Özgül IgM antikorlar 4 ay kadar, IgG antikorlar ise en az 5 yıl hasta serumlarında saptanabilmektedir. Ölümcül seyreden olgularda ve genellikle hastalığın ilk birkaç gününde saptanabilecek seviyelerde antikor yanıtı gelişemeyebildiğinden bu dönemde tanı koymak için kan veya diğer doku örneklerinden RT-PCR virüs izolasyonu ve antijen tespiti ile tanı konulabilmektedir. Son yıllarda RT-PCR ve real-time RT-PCR gibi spesifliği ve duyarlılığı yüksek moleküler tanı yöntemleri ile virüs RNA'sı daha hızlı tespit edilebilmektedir. KKKA hastalarında viremi 10-12 gün kadar sürdüğünden, bu dönemde hasta serumunda PCR ile viral RNA gösterilebilmektedir. Viral kültür en etkilidir ve yüksek viremi düzeylerinin en yaygın olduğu semptomların başlamasından sonra erken uygulandığında pozitifliğe daha hızlı ulaşma olasılığı yüksektir. KKKA teşhisi için

viral kültür kullanmanın bir avantajı, çok çeşitli KKKAV suşlarını tespit etme kabiliyetidir (Raabe, 2020). Moleküler tanı testleri: Hızlı sonuç alınması hem hastanın tedavisinin planlanması hem de hasta izolasyonu açısından avantaj sağlar. Antijen testleri: Rekombinant antijen temelli antikor ve antijen tespit testleri geliştirilmiştir. Bu testlerin avantajı biyogüvenlik düzeyi-4 olmayan laboratuvarlarda da kullanılabilmesidir (Eren Gök, 2016).

### Katkı Oranı Beyanı

Tüm yazarlar aynı oranda katkıya sahip olup, tüm yazarlar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

### Çatışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

### Kaynaklar

- Ackermann-Gaumann R, Siegrist D, Zust R, et al. 2019. Standardized focus assay protocol for biosafety level four viruses. *J Virol Methods*, 264: 51-54.
- Berber E, Canakoglu N, Yoruk MD. 2013. Application of the pseudo-plaque assay for detection and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol Methods*, 187: 26-31.
- Bodur H. 2004, T.C. Sağlık Bakanlığı, basın bilgi notu. Ankara, Turkey.
- Dinçer E, Brinkmann A, Hekimoğlu O. 2017. Genel amplifikasyon ve yeni nesil diziliş Kırım-Kongo kanamasını ortaya koyuyor ateş virüsü AP92 benzeri suş ve farklı kene flebovirüsleri Anadolu, Türkiye. *Parazit Vekt.* 10: 335.

- Eren Gök Ş. 2016. Kırım-Kongo kanamalı ateşi. *Okmeydanı Tıp Derg*, 32(1): 13-19.
- Ergonul O, Whitehouse CA. 2007. Crimean-congo hemorrhagic fever: a global perspective. Springer, Berlin, Germany.
- Ergonul O. 2008. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res Apr*, 78 (1): 125-131.
- Hasanoğlu I, Güner R, Çarhan A. 2018. Viral yük dinamiği Kırım Kongo kanamalı ateşi. *J Med Virol*, 90: 639-643.
- Mazzola LT, Kelly-Cirino C. 2019. Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: a widespread tickborne disease. *BMJ Glob Health*, 4: e001114. DOI: 10.1136/bmjgh-2018-001114.
- Majidzadeh AK, Soleimani M, Gheilanchi LA. 2011. Review on the laboratory diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Annals Mil and Health Sci Res*, 9(4): 275-284.
- Morshed MG, Lee MK, Jorgensen D. 2007. Molecular methods used in clinical laboratory: prospects and pitfalls. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49(2): 184-191.
- Papa A. 2019. Diagnostic approaches for Crimean-Congo hemorrhagic fever virüs. *Exp Rev Molec Diag*, 19(6): 531-536, DOI: 10.1080/14737159.2019.1615450.
- SB. 2004. Bulaşıcı hastalıkların ihbarı ve bildirim sistemi, standart tanı, sürveyans ve laboratuvar rehberi. Sağlık Bakanlığı, Ankara, Turkey.
- Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. 1986. Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol*, 24: 654-656.
- Raabe VN. 2020. Diagnostic testing for Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Microbiol*, 58: e01580-19. DOI: 10.1128/JCM.01580-19.
- WHO. 2008. Crimean-Congo haemorrhagic fever. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/en/> (erişim tarihi: 20.11.2008).