

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ LABORATUVAR TANISI

Dr. Etem ÖZKAYA

*Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı*

Dr. Mustafa Aydın ÇEVİK anısına

II. Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu,
ANKARA

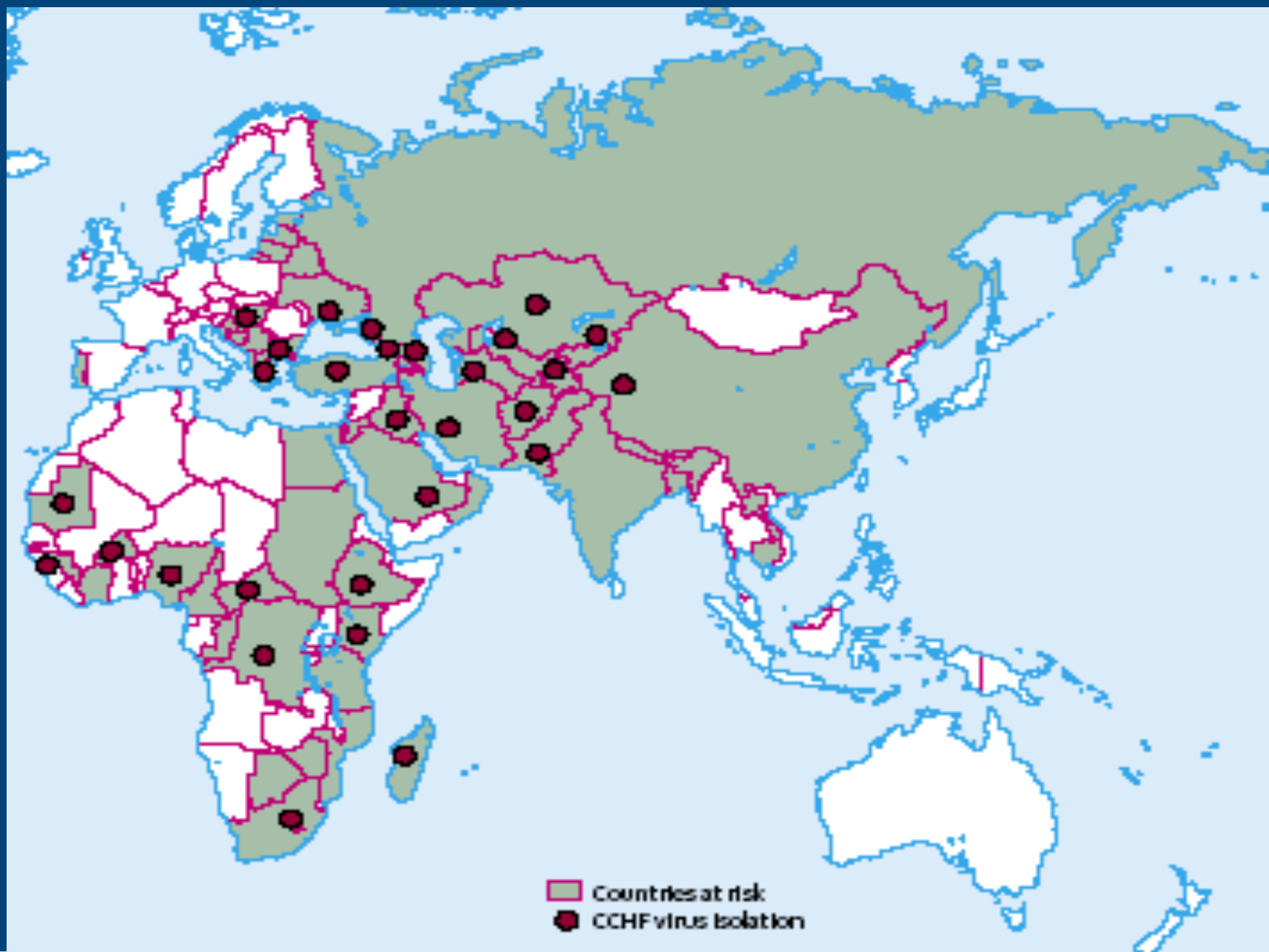


KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ *(KKKA)*

- İlk olarak 1944 yılında Kırım' da görölmüş ve Kırım kanamalı ateşİ adı verilmiőtir.
- Daha sonra aynı belirtilerle 1956 yılında Kongo' da görölen hastalığa Kongo ateşİ adı verilmiőtir.
- 1969 yılında her iki hastalığın da aynı olduğunun anlaşılması üzerine hastalık **Kırım–Kongo Kanamalı Ateşİ** adıyla anılmaya baőtlanmıőtir.

Bulaş ve mortalite

- KKHA virüsü, insanlara kene ısırığı ile veya infekte hayvan ya da insanların; kan, vücut sıvıları veya diğer infekte dokularının direkt teması yoluyla bulaşır.
 - KKHA virüsü belirli bölgede bulunan keneler ile-insanlar-keneler arasında dolaşmaktadır.
 - Literatürde çok sayıda nozokomiyal bulaş tanımlanmıştır
 - Mortalite %3-30 arasında değişmektedir
-
-



- Enfeksiyon hayvanlarda, insanlara nazaran daha yaygındır.
 - Ancak, herhangi bir belirti göstermeden seyretmektedir.
 - İnsanlarda ise sporadik vakalar veya epidemiler şeklinde görülebilmektedir.
-
-

Virüs özellikleri

- Bugün için tanımlanmış olan viral hemorajik ateş etkeni olan virüsler;
 - Bunyaviridae, (KKHA'nin de etkeni)
 - Filoviridae (Marburg virüs ve Ebola virüs),
 - Arenaviridae (Lassa virüs ve Junin, Machupo, Sabia ve Guanarito virüs),
 - Rift Valley fever virüs (RVFV) ve Hantavirüs) ve
 - Flaviviridae (yellow fever virüs ve dengue virüs) gibi RNA virüsleridir.
-
-

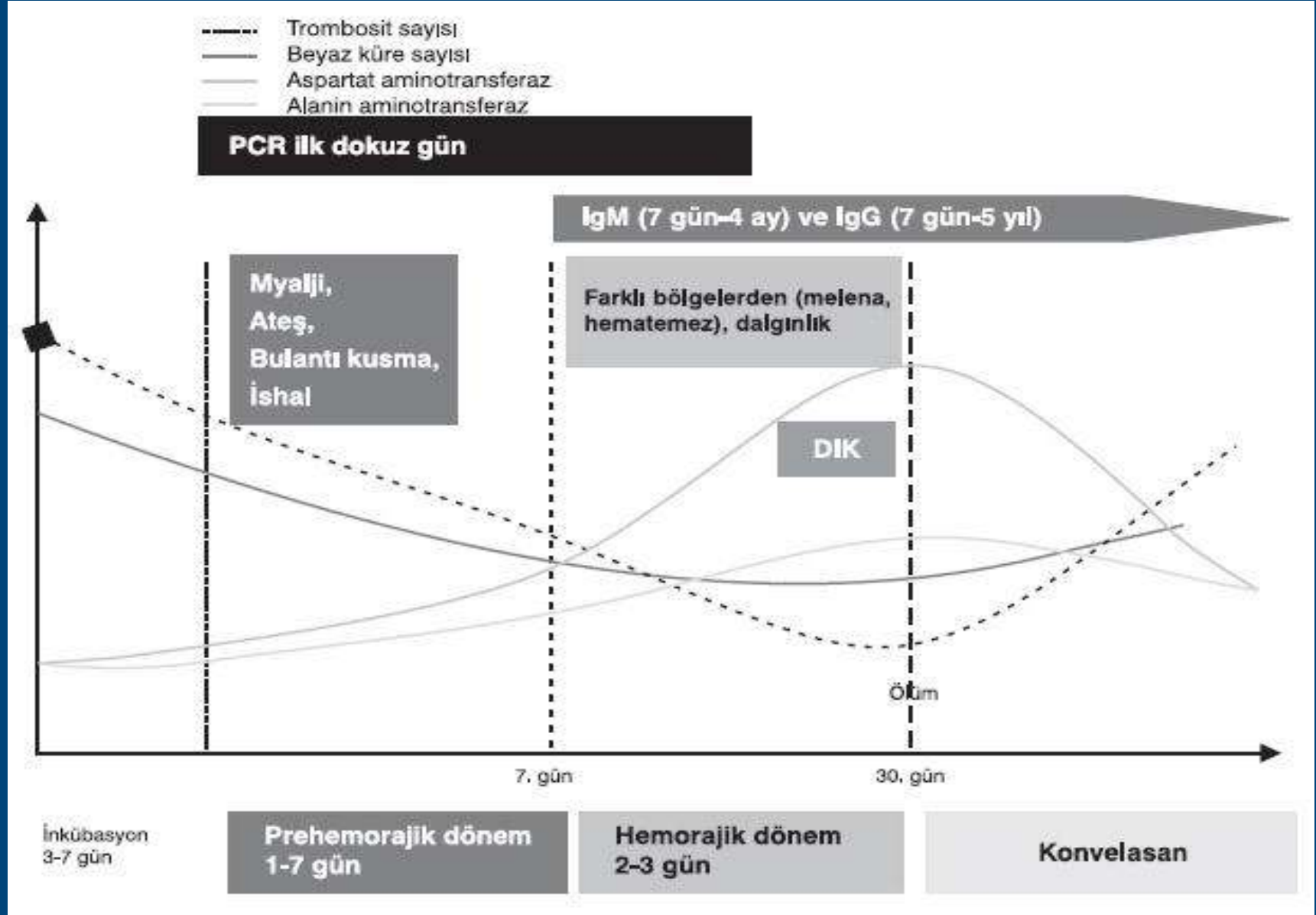
- KKHA virüsü,
 - Bunyaviridae ailesi–Nairovirüs grubunda
 - 100 nm büyüklüğünde, helikal kapsidli, zarflı ve tek iplikli RNA 3 segment içerir (M,S ve L).
 - Dezenfektanlara ve çevre şartlarına nispeten dayanıksız, konakçı dışında yaşayamaz,
 - Kuru havada (56°C'de 30 dakikada),
 - Hipoklorit ve %2 gluteraldehit gibi dezenfektanlarla ve
 - UV ile kolaylıkla *inaktive* olur.
-
-

Virolojik tanı

- Klasik yöntemler olarak virüs kültürü, elektron mikroskopisi (EM), antijen ve antikor saptama yöntemleri kullanılmaktadır.
 - Her yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır.
 - Hastalığın klinik seyrine göre uygulanması gereken laboratuvar yöntemleri hastalığın evrelerine göre seçilir;
-
-

- KKHA enfeksiyonunun dört evresi vardır;
 - *1-İnkübasyon Dönemi*: Kene tarafından ısırılma ve virüsün alınmasını izleyen genellikle *1-3 gün*; en fazla *9 gün* olabilmektedir. Enfekte kan, vücut sıvısı veya diğer dokulara doğrudan temas sonucu bulaşmalarda *5-6 gün*, en fazla ise *13 gün* olabilmektedir.
 - *2-Prehemorajik Dönem*: Ateşin ($39-41^{\circ}\text{C}$), kas ağrısının, baş ağrısı ve baş dönmesinin aniden ortaya çıkması ile karakterizedir. Bu evre ortalama *3 gün* sürer (*1-7 gün*).
 - *3-Hemorajik Dönem*: Kısa, gnl *2-3 gün* sürer.
 - *4-Konvelesan Dönem*: Hemorajik dönemi atlatan hastalarda hastalığın başlangıcından *10-20 gün sonra* başlar.
-
-

KKK Ateşinin klinik ve laboratuvar seyri



a) Virüs kültürü:

- duyarlı bir yöntem, biyogüvenlik-4 düzeyindeki laboratuvar koşulları altında yapılması gerekli
 - Hastalığın ilk günlerinde (ilk beş gün) kan ve dokulardan alınan örneklerden virüs izolasyonu yapılabilir
 - Vero E6, BHK-21, SW 13, LLC-MK2, CER gibi hücre kültürleri kullanılabilmekte ve sonrasında immünfloresans yöntemi ile antijen varlığı gösterilmektedir.
 - Ayrıca yeni doğan fareler virüs konsantrasyonunun düşük olduğu örneklerde virüs izolasyonu amacı ile kullanılabilir.
-
-

b) Elektron Mikroskopi:

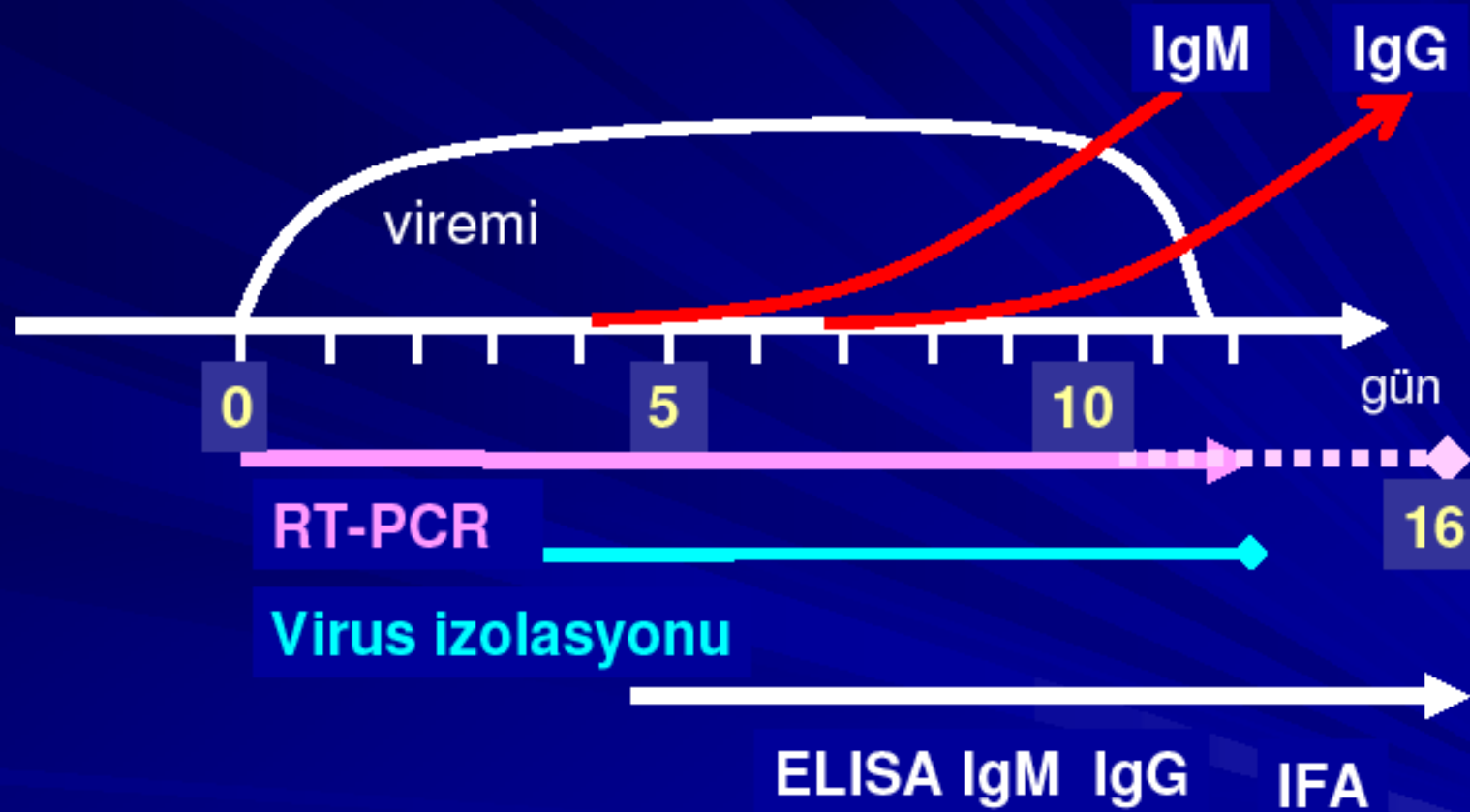
- Hızlı bir yöntem olmasına rağmen iyi donanımlı araştırma laboratuvarı koşullarını gerektirir.



c) Serolojik Tanı:

- EIA (enzim immün assay) yada indirek immünfloresans gibi antikor saptama yöntemleri güvenilir olmasına rağmen hastalığın *erken dönemlerinde uygun değildir.*
- Antikor saptamada EIA testinin indirek immünfloresans testinden daha duyarlı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur.

- KKKAV IgG ve IgM antikorları en hızlı olarak hastalığın 5–7. gününden itibaren ELISA ile saptanabilmektedir. IgM'ler 4 ay, IgG'ler titrede azalma olur ve 5 yıla kadar saptanabilir
 - Özgül antikolar kanda belirlenmeden önce ölen hastalarda bu yöntemle tanı konulamayabilir. Bu durumda tanı, özellikle hastalığın ilk 5 gününde alınan kan ve doku örneklerinden virüs izolasyonu, spesifik antijenin tespiti ve RT–PCR ile konur.
-
-



Zeller H.

- Hastalığı tekrar geçiren (reenfeksiyon) olmaması nedeni ile antikorların ömür boyu koruyucu olduğu söylenebilir.



d) Moleküler Yöntemler-1:

- KKKA virüsü RNA'sının saptanmasında RT-PCR (reverse transkriptaz- polimeraz chain reaction) yöntemi enfeksiyonun *erken dönemlerinde* kan ve doku örneklerinden *en hızlı ve en duyarlı* yöntem olarak kullanılmaktadır.
 - Fakat ayrı bir cDNA sentez aşaması olması ve takiben PCR ürünlerinin agar jel analizi gerekliliği ve bazı vakalarda ikinci tur amplifikasyon gerektirmesi gibi durumlar nedeniyle *zaman alıcı* olarak değerlendirilmektedir.
-
-

d) Moleküler Yöntemler-2:

- RT-PCR yönteminde çoğaltılan *viral hedefin miktarının saptanamaması* ve testler sırasında çok sayıdaki örnek nedeniyle artmış bir *kontaminasyon riski* vardır.
 - Real-time PCR yöntemi ise nispeten *daha kolay*, daha fazla örnek çalışılmasına uygun olması nedeniyle son zamanlarda daha yaygın olarak kullanılmaktadır.
 - Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Viroloji Ref. Ve Araş. Laboratuvarında, Real-Time PCR yöntemi kullanılmaktadır.
-
-

e) Gen dizilim analizi (sequencing) :

- Epidemiyolojik olarak dolaşımdaki KKKA virüslerinin genetik benzerliklerinin ortaya konulması yanı sıra;
 - *Tanıda* kullanılan moleküler yöntemlerde hedef bölgelerdeki mutasyonlara bağlı olabilecek genetik değişiklikler ve dolayısıyla kullanılan primer–probların *doğruluğunun teyidini* sağlar.
-
-

Türkiye'de durum

- Fark edilen İlk olgu Mayıs 2002'de Tokat'ta
- Ateş, baş ağrısı, kas ağrısı ve kanama şikayetleri ile hastalığın KKKA olduğu anlaşıldı
- Daha önceki yıllarda da hastalığın var olduğu tahmin ediliyor

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ VAKA BİLDİRİM ÇİZELGESİ

..... İl Sağlık Müdürlüğü
Epi Numarası:

1. HASTA BİLGİLERİ:

Adı ve Soyadı	
Baba adı	
Yaşı	
Cinsiyeti	
Adresi	
Telefonu	
Mesleği	
Şikâyetlerin Başladığı Tarih	
Hastahaneye Başvuru Tarihi	
Numune Alınış Tarihi	

2. HASTANIN ŞİKÂyetLERİ

- | | | |
|---|-------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Hikâyesinde ateş | <input type="checkbox"/> Baş ağrısı | <input type="checkbox"/> Yaygın vücut ağrısı |
| <input type="checkbox"/> Halsizlik | <input type="checkbox"/> Bulantı | <input type="checkbox"/> Kusma |
| <input type="checkbox"/> Karın ağrısı | <input type="checkbox"/> İshal | <input type="checkbox"/> Hemorajik semptomlar (Belirtiniz) |
| <input type="checkbox"/> Diğer (Belirtiniz) | | |

3. EPİDEMİYOLOJİK HİKÂYE

- Kene ısırması veya kene ile temas
 Hayvanlarla yakın temas
 Kırsal kesimde yaşama veya son iki hafta içinde kırsal alan ziyareti
 Hayvan kani, dokusu veya vücut sıvıları ile temas
 Hasta kişilerin kan ve vücut salgılarıyla temas ya da laboratuvarında çalışma
 Hasta çevresinde benzer şikâyetleri olan başka vakaların varlığı

4. LABORATUVAR BULGULARI

- | | | |
|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> Lökopeni | <input type="checkbox"/> Trombositopeni | |
| <input type="checkbox"/> AST ve ALT yüksekliği | <input type="checkbox"/> LDH yüksekliği | <input type="checkbox"/> CK yüksekliği |

5. VERİLEN TEDAVİ (Belirtiniz):

6. SONUÇ: Şifa Sevk Eks

7. VARSA BELİRTİLMEK İSTENEN DİĞER HUSUSLAR:

Müşavere Eden Hekimin:
Görev Yeri :
Adı :
Soyadı :
İmzası :

Numune Alınması ve Gönderilmesi

- Hastalardan genellikle birden fazla serum örneđi alınmakta ve laboratuvara gönderilmektedir.
 - Hastanın ilk başvurduğu bulunduğu ildeki hastaneden alınan serum örneğini takiben durumu daha ağır seyreden hastaların sevk edildiği KKKA takibi yapılan merkezlerde 2. – 3. kan örneği alınmakta ve İl Sağlık Müdürlükleri aracılığı ile RSHMB, Viroloji Ref. Araş. Lab. gelmektedir.
 - Hasta bilgi formu eksiksiz olarak doldurulmalıdır
-
-

KKKA LABORATUVAR TANISI- RSHMB, Viroloji Ref.& Araş. Lab.

- Virüs kùltürü
- Elektron mikroskopi
- Molekùler yöntemler *
- Antikor aranması*
- Gen dizilim analizi*
- Antijen aranması

* *RSHMB Viroloji Lab. da çalışılanlar*

1– Virüs kültürü

- Bulaş riskinin yüksek olması nedeni ile **biyogüvenlik seviyesi 4** olan laboratuvarlarda virüs kültürü ve izolasyonu önerilmektedir.
 - Kültür için vireminin olduğu *ilk bir hafta* içinde kan numunesi alınması önerilir.
 - Laboratuvarımızda KKKAV kültürü yapılmamaktadır.
 - Fakat **biyogüvenlik seviye–3** laboratuvar ihalesi yapılmış olup çalışmalar devam etmektedir.
-
-

2- Moleküler yöntemler

- Real-time PCR ile virüs RNA'sının gösterilmesi
 - *Viremik dönem (0. günden 12.-13. güne kadar uzayabilir*
 - Örnek: Hasta serumu
 - Kolon veya manuel ekstraksiyon yöntemi ile RNA elde edilir
 - “*In-house*” Real-time PCR yöntemi uygulanır
 - Metod tek aşamalı olup, “ABI 7700” (*GATA Viroloji*) yada “*Stratagene*” (*RSHMB Viroloji*) cihazı kullanılarak 40 döngüde gerçekleştirilir.
-
-

3. Antikor aranması-i

- Antikor ELISA ve IFA yöntemleri ile araştırılabilir.
 - Ticari olarak satışa sunulmuş CE belgeli kit üretimi henüz yoktur.
 - Laboratuvarımızda *CDC (ABD)*'den temin edilen KKKA virusu antijenleri ile **in-house ELISA** yöntemiyle **IgG ve IgM** antikorları taranabilmektedir.
-
-

3. Antikor aranması-ii

- İlk alınan serum örneğinden **Real-Time PCR** çalışılmakta,
 - 5. günü geçmiş örneklerde ise **ELISA-IgM** araştırılmaktadır.
 - İlk 5 günde alınmış olmasına rağmen Real time PCR yöntemi ile “**Negatif**” çıkan hastalarda **ELISA-IgM** testi yapılmaktadır.
-
-

3. Antikor aranması–iii

- **ELISA–IgG** testi ise bir toplulukta hastalığa karşı kazanılmış antikor yanıtının saptanması için **serosürveys** çalışmalarında kullanılabilen bir yöntemdir. Ayrıca tanısı şüpheli hastalarda ileri dönemde test yapılabilir.
-
-

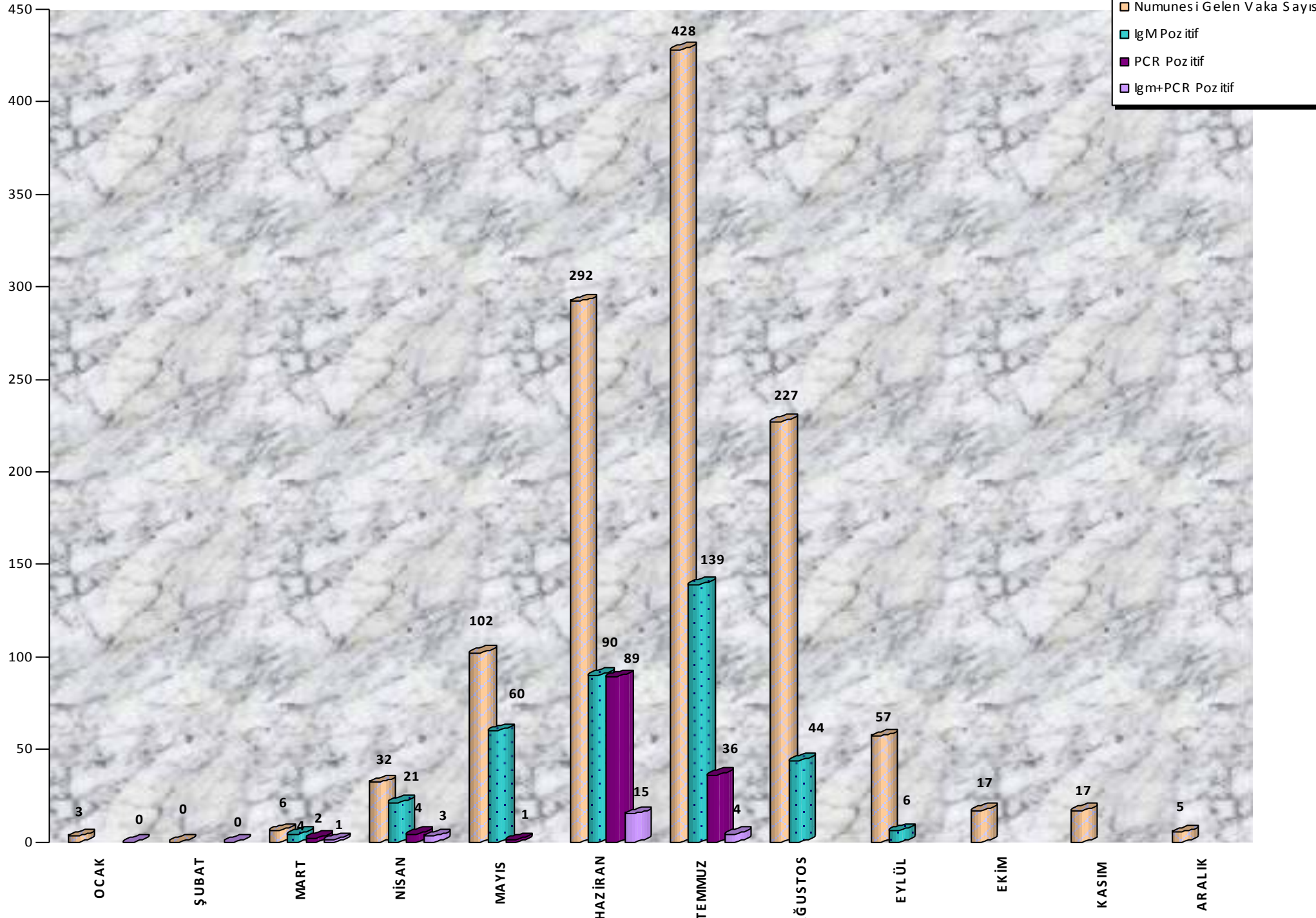
3. Antikor aranması-iv

- IFA yöntemi ile KKKAV-IgM ve IgG saptanabilmesi için RSHMB ile Euroimmun firması ile yürütülen proje çalışması vardır.
- Kit geliştirilebilmesi için öncelikle KKKAV antijenlerinin elde edilme gerekliliği vardır
 - Hücre kültüründe virüs izolasyonu yada
 - Diğer moleküler yöntemler

2006 RSHMB KKKA LABORATUVARI POZİTİF VAKALARIN AYLARA GÖRE DAGILIMI

2006/AYLAR	Numunesi Gelen Vaka Sayısı	Çalışılan IgM Sayısı	IgM Pozitif	IgM Pozitiflik Oranı	Çalışılan PCR Sayısı	PCR Pozitif	PCR Pozitiflik Oranı	Pozitif Vaka Sayısı	Pozitiflik Oranı
OCAK	3	2		0,00	1		0,00	0	0,00
ŞUBAT	0	0		0,00	0		0,00	0	0,00
MART	6	6	4	66,67	6	2	33,33	5	83,33
NİSAN	32	34	21	61,76	24	4	16,67	25	78,13
MAYIS	102	114	60	52,63	3	1	33,33	68	66,67
HAZİRAN	292	329	90	27,36	233	89	38,20	167	57,19
TEMMUZ	428	565	139	24,60	333	36	10,81	179	41,82
AĞUSTOS	227	322	44	13,66	15		0,00	45	19,82
EYLÜL	57	79	6	7,59	0		0,00	8	14,04
EKİM	17	19		0,00	0		0,00	0	0,00
KASIM	17	21		0,00	0		0,00	0	0,00
ARALIK	5	6		0,00	0		0,00	0	0,00
TOPLAM 2006	1186	1470	364	24,76	615	132	21,46	497	41,91

2006 KKKA VAKALARI- AYLARA GÖRE DAĞILIMI



2007 YILI RSHMB KKKA LABORATUVARI

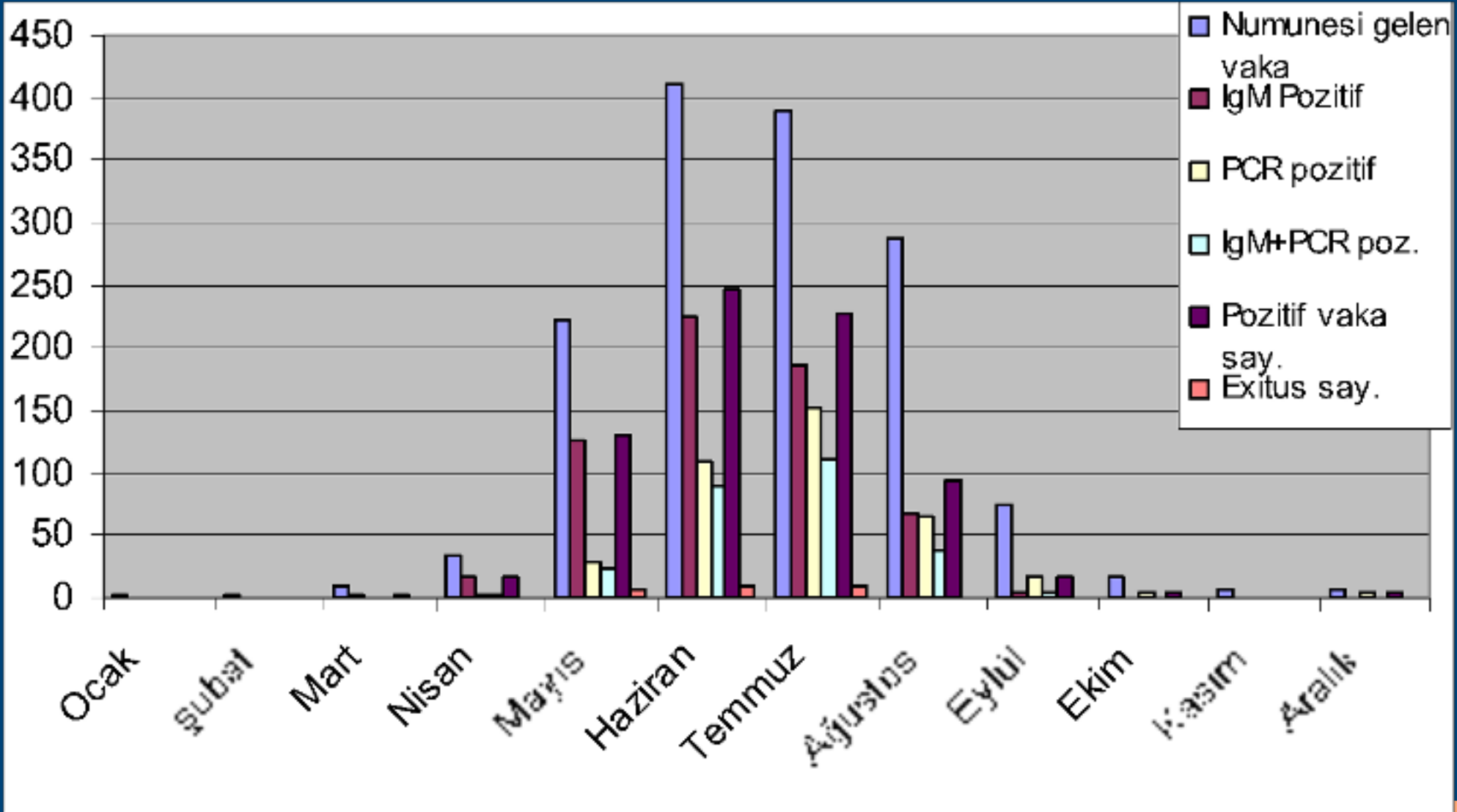
IgM ve PCR POZITIFLERİN DAGILIMI

2007/AYLAR	Gelen Numune Sayısı		VAKA SAYISINA GÖRE											
			Numunesi Gelen Vaka Sayısı	ELISA IgM			PCR			TOPLAM			EXITUS	
				Çalışılan IgM Sayısı	IgM Pozitif	IgM Pozitiflik Oranı	Çalışılan PCR Sayısı	PCR Pozitif	PCR Pozitiflik Oranı	IgM+PCR Pozitif	Pozitif Vaka Sayısı	Pozitiflik Oranı	SAYISI	ORANI
OCAK	3		3	3	0	0,00	3	0	0,00	0	0	0,00	0	0,00
ŞUBAT	4		4	3	0	0,00	4	0	0,00	0	0	0,00	0	0,00
MART	12		12	9	2	22,22	9	0	0,00	0	2	22,22	0	0,00
NİSAN	46		46	33	16	48,48	33	3	9,09	3	16	48,48	0	0,00
MAYIS	343		343	222	126	56,76	222	28	12,61	24	130	58,56	8	3,60
HAZİRAN	647	5	642	412	226	54,85	412	110	26,70	89	247	59,95	9	2,18
TEMMUZ	634	12	622	390	187	48,07	383	153	39,95	112	228	58,46	10	2,56
AĞUSTOS	418	4	414	289	67	23,18	279	65	23,30	38	94	32,53	0	0,00
EYLÜL	192	80	112	76	5	6,58	76	16	21,05	4	17	22,37	0	0,00
EKİM	19		19	17	1	6,25	16	4	25,00	1	4	23,53	0	0,00
KASIM	9		9	8	0	0,00	8	0	0,00	0	0	0,00	0	0,00
ARALIK	9		9	7	0	0,00	7	4	57,14	0	4	57,14	0	0,00
TOPLAM 2007	2336	101	2235	1469	630	43,36	1437	379	26,37	271	742	50,51	27	1,84

2007 KKKA VAKALARI- AYLARA GÖRE DAĞILIMI

	Numunesi gelen vaka	IgM Pozitif	PCR pozitif	IgM+PCR poz.	Pozitif vaka say.	Exitus say.
Ocak	3	0	0	0	0	0
Şubat	3	0	0	0	0	0
Mart	9	2	0	0	2	0
Nisan	33	16	3	3	16	0
Mayıs	222	126	28	24	130	8
Haziran	412	226	110	89	247	9
Temmuz	390	187	153	112	228	10
Ağustos	289	67	65	38	94	0
Eylül	76	5	16	4	17	0
Ekim	17	1	4	1	4	0
Kasım	8	0	0	0	0	0
Aralık	7	0	4	0	4	0
TOPLAM	1469	630	379	271	742	27

2007 KKKA VAKALARI- AYLARA GÖRE DAGILIMI



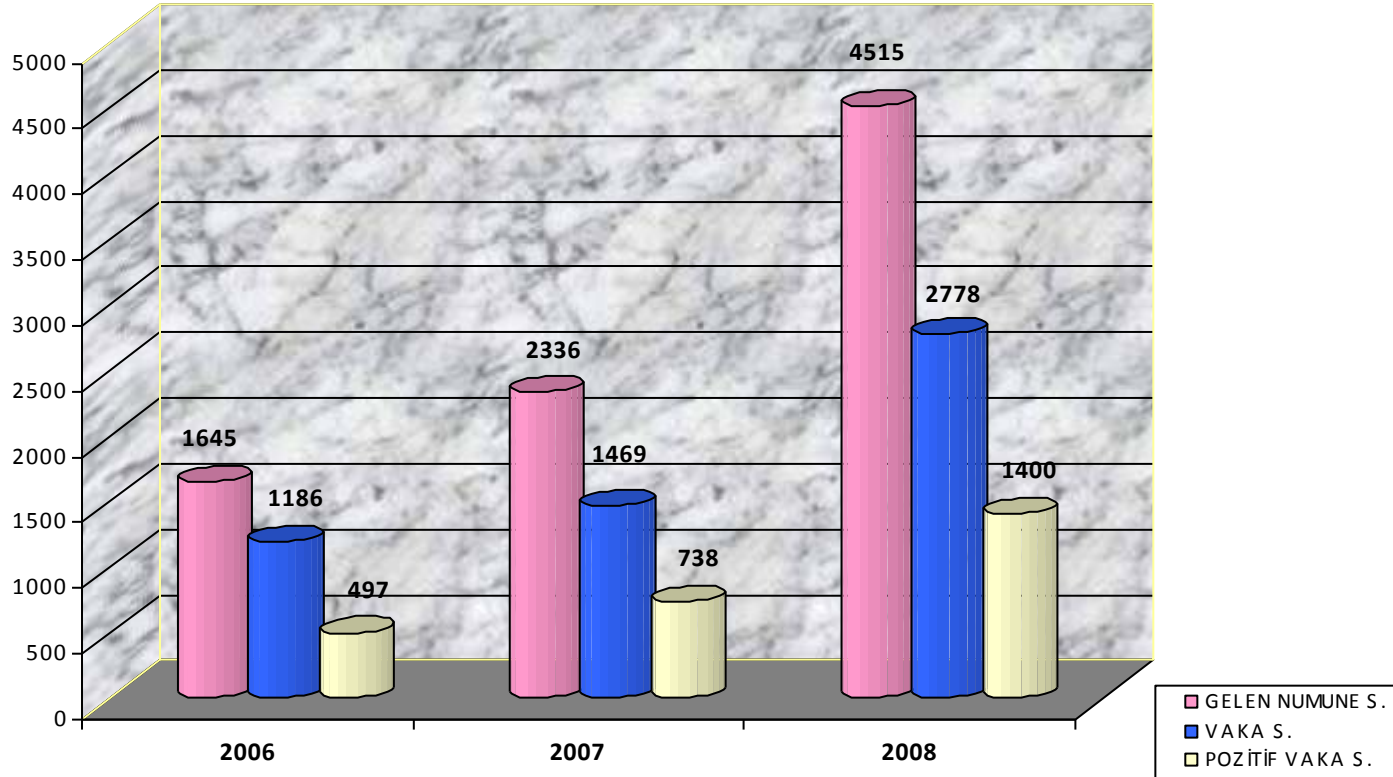
2008 YILI RSHMB KKKA LABORATUVARI

IgM ve PCR POZITİFLERİN DAGILIMI

2008 YILI CCHF VERİLERİ

2008/AYLAR	GELEN NUMUNE SAYISINA GÖRE							VAKA SAYISINA GÖRE											
	Gele n Num une Sayı sı	Ça lış m aya El ve ri ş li Ol m ayan Nu m une	Ça lış maya El ver iş li Num une	Ça lı ş ıla n IgM Sayı sı	IgM Pozi tif	Ça lı ş ıla n PCR Sayı sı	PCR Pozi tif	ELISA IgM			PCR		TOPLAM		EXITUS				
								Num unes i Ge le n Vaka Sayı sı	Ça lı ş ıla n IgM Sayı sı	IgM Po zitif	IgM Pozitifli k Oranı	Ça lı ş ıla n PCR Sayı sı	PCR Pozit if	PCR Pozitifli k Oranı	IgM ve/ veya PCR Poziti f	Pozitif lik Oranı	BİL DİR Mİ YAP ILA N EX SAY ISI	EX VA KA SA YIS I	ORA NI
OCAK																			
ŞUBAT	3		3				3	3	0	0,00	3	0	0,00	0	0,00			0,00	
MART	15		15			1	14	14	0	0,00	14	4	28,57	1	7,14	1		0,00	
NİSAN	88		88	85	17	77	27	65	62	6	9,68	65	35	53,85	33	50,77	3	3	4,62
MAYIS	575	7	568	413	194	395	197	349	195	55	28,21	349	215	61,60	237	67,91	10	8	2,29
HAZİRAN	1232	12	1220	882	317	853	405	744	410	64	15,61	742	364	49,06	452	60,75	28	22	2,96
TEMMUZ	1601	16	1585	1193	377	1148	428	977	594	75	12,63	971	361	37,18	486	49,74	16	8	0,82
AĞUSTOS	865	4	861	734	173	633	129	535	418	49	11,72	532	90	16,92	175	32,71	5	1	0,19
EYLÜL	136		136	89	13	81	15	91	50	1	2,00	76	12	15,79	16	17,58	1		0,00
TOPLAM 2008	4515	39	4476	3396	1091	3187	1202	2778	1746	250	14,32	2752	1081	39,28	1400	50,40	64	42	1,51



2006-2007-2008 KIRIM KONGO VERİLERİ



2006-2007-2008 Vaka Artışı ve Vaka Pozitiflik Oranları

	2006	2007	2008	2008'in 2006'ya Göre Vaka Artış Oranları (%)
GELEN NUMUNE SAYISI	1645	2336	4515	274,5
VAKA SAYISI	1186	1469	2778	234,2
POZİTİF VAKA S.	497	738	1400	281,7
POZİTİFLİK ORANI	41,9	50,2	50,4	

Sonuçlar

- Her yıl laboratuvara gelen örnek sayılarında artış olmaktadır
 - RSHMB Bölge müdürlüklerinde aynı sistemlerin kurularak yükün dağıtılması hedeflenmiştir.
- Vakalara ait sonuçların hızlı olarak hastanelere ulaştırılabilmesi için posta ile resmi sonuç bildiriminin yanında **e-posta** yoluyla sonuç bildirilmektedir
- *Sonuçlar;*
- RSHMB  İl Sağlık Md.leri  Hastane

Gen dizilim analizi

- Ülkemizde 2006, 2007 ve 2008 yıllarında farklı illerden saptanan 53 adet KKKA virüsünün gen dizilim analizleri yapılarak (*RSHMB Viroloji-AÜ Vet. Viroloji*) ülkemize komşuluk eden veya etmeyen diğer ülkelerdeki KKKA virüsleri ile olan genetik benzerlikleri de ortaya konmuş durumdadır.
- *Sonuç:* KKKAV'lerinin real-time PCR testlerindeki olası hedef bölge farklılıklarının saptanması için gen dizilim analizi yapılması gerekliliği vardır.



RSMB VİROLOJİ LAB. ÇALIŞANLARI ADINA
TEŞEKKÜRLER

