

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

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ
HASTALIĞINA KARŞI
KORUYUCU AŞI GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

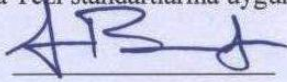
Engin BERBER

2014

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

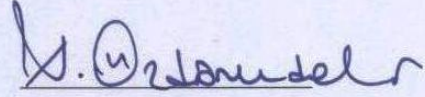
Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Hakan BULUT
Viroloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ



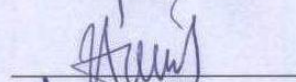
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

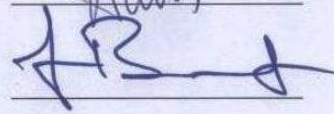
Prof. Dr. Ahmet KALKAN



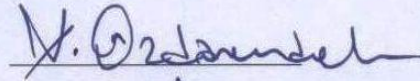
Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ



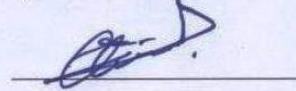
Prof. Dr. Hakan BULUT



Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ



Doç. Dr. Şükrü TONBAK



İTHAF

*Bu tez Kırım-Kongo kanamalı ateşı hastalığı yüzünden hayatını
kaybedenlere ithaf edilmiştir...*

TEŞEKKÜR

*Tez çalışmamda danışmanlığımı üstlenen, karşılaştığım problemlerin
çözülmesinde bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, bilimsel alanda
yetişmemi sağlayan Sayın **Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ**'ye,*

*Viroloji Anabilim Dalı'nın imkânlarından faydalanmamı sağlayan değerli emekli
Öğretim Üyesi Saygıdeğer **Prof. Dr. Yusuf BOLAT**'a,*

*Doktora boyunca bilimsel, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan Viroloji
Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Hakan BULUT**'a,*

*Viroloji Anabilim Dalı alanında doktora eğitimime başlamamda çok büyük katkısı
olan, tez çalışmalarım süresince kendisinden birçok teknik ve yöntem öğrendiğim,
maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın **Doç. Dr. Şükrü TONBAK**'a,*

*Doktora tezimin yazım aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen
Sayın **Doç. Dr. Kezban CAN ŞAHNA**'ya,*

*Lisans ve doktora süresince maddi ve manevi sürekli yardımcı olan, doktora
eğitimime başlamamda büyük katkıları olan Sayın **Prof. Dr. Yesari ERÖKSÜZ** ve
Saygıdeğer eşi **Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ**'e,*

*Doktora eğitimim boyunca tez çalışmamda bana yardımcı olan, beni yalnız
bırakmayan, birçok konuda yardım gördüğüm ve sosyal her konuda müthiş bilgi
sahibi olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, bana katlanan ve sabreden,
çalışma arkadaşım, dostum, ağabeyim Sayın **Dr. Nurettin ÇANAKOĞLU** ve çok
değerli eşi Sayın **Siddika Sadet ÇANAKOĞLU**'na,*

*Kendisinden birçok şey öğrendiğim, tecrübelerini paylaşan, istatistik çalışmalarında bana yardımcı olan maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, sıcak bir aile ortamı sağlayan Sayın **Doç. Dr. Cemal ORHAN**'a ve ailesine, Bilimsel ortama adapte olmamı sağlayan, her konuda kendisine danıştığım, tecrübelerini esirgemeyen Sayın **Yrd. Doç. Dr. Recep KALIN**'a, Arkadaşlıklarını esirgemeyen, beni hiç yalnız bırakmayan, gece gündüz demeden yanımda olan, her konuda yardımcı olan, edindiğim en değerli dostlarım;*

***Dr. Hasan GENÇOĞLU**'na,*

***Arş. Gör. Gökhan Kürşad İNCİLİ** ve değerli eşi **Canan Akdeniz İNCİLİ**'ye,*

Arş. Gör. Sezayi ÖZÜBEK,

***Arş. Gör. Mehmet Ali KISAÇAM** ve **Arş. Gör. Esra BARAN**'a,*

*Doktora çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan, çalışma arkadaşım ve dâliş hocam **Arş. Gör. Mustafa Deniz YÖRÜK**'e,*

*Samimiyetlerini ve desteklerini esirgemeyen değerli araştırma görevlisi arkadaşlarım; **Zeynep SEMEN**, **Fatma TERLEMEZ** ve **Seda İFLAZOĞLU**'na, Veteriner Hekim olmamda ve doktora eğitimime başlamamda bana yardımcı olan, her konuda sürekli destekleyen Sayın **Veteriner Hekim Sebahattin YAZICI**'ya, Son olarak; hayatta en çok değer verdiğim, beni yetiştiren ilk hocam, çok değerli anneme ve hayatımdaki en kıymetli canım aileme,*

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım...

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

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
GRAFİK LİSTESİ	xv
KISALTMALAR LİSTESİ	xvi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Dünyada ve Türkiye’deki Tarihsel Gelişimi	7
3.2. Viral Sınıflandırma	10
3.3. Viral Yapı ve Viral Genom Özellikleri	13
3.3.1. Viral Proteinler ve Fonksiyonları	15
3.3.2. Virüs Çoğalma Stratejisi	19
3.4. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Patogenezi	23
3.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Epidemiyolojisi	25
3.5.1. Omurgalı Rezervuar ve Konaklar	26
3.5.2. Artropod Vektör Keneler	27
3.5.3. Bulaş Yolları ve Risk Grupları	32

3.5.4. Deneysel Hayvan Modelleri	33
3.6. Klinik ve Laboratuvar Bulguları.....	34
3.7. Teşhis Yöntemleri.....	37
3.7.1. Biyokimyasal Testler.....	37
3.7.2. Virüs İzolasyonu	38
3.7.3. Moleküler Teknikler	38
3.7.4. Serolojik Metotlar	39
3.8. Tedavi Amaçlı Uygulamalar.....	40
3.8.1. Destekleyici Tedaviler.....	41
3.8.2. Ribavirin Uygulaması.....	41
3.8.3. Antikor Tedavileri.....	43
3.8.4. Diğer Antiviral Uygulamalar	44
3.9. Koruma ve Kontrol	45
3.9.1. Aşılama.....	45
3.9.2. Korunma	47
3.10. Amaç	48
4. MATERYAL METOT	50
4.1. Viral Stokların Hazırlanması	50
4.1.1. Turkey-Kelkit06 Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Virüs Suşunun İzolasyonu	50
4.1.1.1. Materyal.....	50
4.1.1.2. Metot.....	50
4.2. Titrasyon Testi.....	51
4.2.1. Psödo-Plak Testi	51

4.2.1.1. Materyal.....	51
4.2.1.2. Metot.....	52
4.2.2. Testin Görüntülenmesi	53
4.2.2.1. Materyal.....	53
4.2.2.2. Metot.....	54
4.3. Hücre Kültür Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı için Virüs Üretimi.....	56
4.3.1. Vero E6 Hücre Kültürü	56
4.3.1.1. Materyal.....	56
4.3.1.2. Metot.....	56
4.3.2. Vero E6 Hücrelerinde Turkey-Kelkit06 Suşunun Üretilmesi	58
4.3.2.1. Materyal.....	58
4.3.2.2. Metot.....	58
4.4. Fare Beyni Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı için Virüs Üretimi.....	59
4.4.1. Materyal.....	59
4.4.2. Metot	59
4.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantre Edilmesi.....	60
4.5.1. Vero E6 Hücre Kültüründe Üretilen Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantre Edilmesi	60
4.5.1.1. Materyal.....	60
4.5.1.2. Metot.....	61

4.5.2. Fare Beyninde Üretilen Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı	
Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantre Edilmesi.....	62
4.5.2.1. Materyal.....	62
4.5.2.2. Metot.....	63
4.6. Turkey-Kelkit06 Suşunun Ultrasantrifüj Sükroz Dansite Gradiyent	
Metodu ile Pürifikasyonu	64
4.6.1. Sükroz Tabakalarının Hazırlanması	64
4.6.1.1. Materyal.....	64
4.6.1.2. Metot.....	64
4.7. Turkey-Kelkit06 Suşunun İnaktivasyonu ve Diyaliz	67
4.7.1. Materyal.....	67
4.7.2. Metot	67
4.8. Turkey-Kelkit06 Suşunun İnaktivasyonunun Psödo-Plak Testi ile Teyit	
Edilmesi.....	68
4.8.1. Materyal.....	68
4.8.2. Metot	69
4.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforez Hazırlama ve	
Görüntüleme	70
4.9.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforez Hazırlanması.....	70
4.9.1.1. Materyal.....	70
4.9.1.2. Metot.....	71
4.9.2. Coomassie Brilliant Blue ile Boyama	72
4.9.2.1. Materyal.....	72
4.9.2.2. Metot.....	73

4.10. Western Blot	73
4.10.1. Materyal.....	73
4.10.2. Metot.....	74
4.11. Lowry Testi.....	76
4.11.1. Materyal.....	76
4.11.2. Metot.....	76
4.12. Aşı Gruplarının Oluşturulması, Adjuvanizasyon ve Aşılamalar	77
4.12.1. Alüminyum Hidroksit ile Adjuvanizasyon	77
4.12.2. Montanide ile Adjuvanizasyon	78
4.12.3. AS03 ile Adjuvanizasyon	78
4.12.4. Aşı Kontrol ve Deney Kontrol	78
4.13. İmmünizasyonlar.....	79
4.13.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Kan Serumı Elde Edilmesi	79
4.14. İndirekt ELISA.....	80
4.14.1. Materyal.....	80
4.14.2. Metot.....	81
4.15. Psödo-Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi.....	82
4.15.1. Materyal.....	82
4.15.2. Metot.....	83
4.16. İstatistik ve Hesaplamalar.....	84
5. BULGULAR	85
5.1. Psödo-Plak Testi	85
5.2. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Karşı Aşı Geliştirme Çalışmaları.....	90

5.2.1. Hücre Kültür Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı	90
5.2.2. Fare Beyni Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı	92
5.3. Virüs Pürifikasyonu	93
5.3.1. Western Blot ve SDS-PAGE	93
5.4. Virüs İnaktivasyonu	97
5.5. İmmünizasyonlar.....	98
5.5.1. Fare Beyni ve Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı ile İmmünizasyon Sonrası Oluşan ELISA Titreleleri	99
5.5.2. Fare Beyni ve Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşıların Nötralizasyon Titreleleri.....	102
5.5.3. Uzun Süreli İmmun Yanıtların Değerlendirilmesi	106
5.5.4. Farklı Adjuvantlarla Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşının Adjuvanize Edilmesi ve ELISA Titreleleri.....	111
5.5.5. Farklı Adjuvantlarla Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşının Adjuvanize Edilmesi ve Nötralizasyon Titreleleri.....	112
6. TARTIŞMA.....	115
7. KAYNAKLAR	127
8. ÖZGEÇMİŞ.....	137

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Fare beyni 3. pasaj Turkey-Kelkit06 virüs suşunun Vero E6 hücre kültürlerinde enfeksiyon sonrası enfektif viral antijen miktarları.	90
Tablo 2. Fare beyni ve hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan doz gruplarında üç immünizasyon sonrası elde edilen serumlara ait indirekt ELISA IgG antikor yanıtları	101
Tablo 3. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait nötralizan antikor titreler (PPRNT ₅₀).	103
Tablo 4. Fare beyni tabanlı inaktif aşı ile yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait nötralizan titreler (PPRNT ₅₀).	104
Tablo 5. Farklı adjuvantlar ve adjuvant kullanılmadan 10 µg dozlarla yapılan üç immünizasyon sonrası ikinci haftalara ait ortalama IgG ELISA titreleri.....	112
Tablo 6. Farklı adjuvantlarla ve adjuvantsız (aşı kontrol) 10 µg dozla yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait nötralizan antikor titreler	113

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. KKKAH virüsünün morfolojisi	13
Şekil 2. Turkey-Kelkit06 KKKAH suşunun protein şeması.....	15
Şekil 3. Hücre içerisinde viral glikoproteinlerin işlenim aşamalarının şematik görünümü	16
Şekil 4. Viral segmentlerden proteinlerin transkripsiyon ve translasyon aşamalarının şematik görünümü	18
Şekil 5. KKKAH virüsünün intrasellüler replikasyon aşamalarının şematik görünümü	22
Şekil 6. KKKAH'nin klinik ve laboratuvar seyri.....	25
Şekil 7. KKKAH'nin coğrafik dağılımı.....	26
Şekil 8. KKKAH virüsünün doğadaki sirkülasyonu	29
Şekil 9. <i>Hyalomma marginatum</i> türü kenelerin dünyadaki dağılımı.....	31
Şekil 10. Virüs pürifikasyonu için hazırlanan süroz dansite gradiyentler	65
Şekil 11. Fraksiyon kollektör cihazı ile sürozun fraksiyonlara ayrılması.....	66
Şekil 12. Fare beyninden izole edilen 3. pasaj Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun Vero E6 (A) ve SW-13 (B) hücrelerinde psödo plak testi ile görüntülenmesi	86
Şekil 13. 3. pasaj Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun Vero E6 hücrelerinde psödo-plak testinde görüntülendikten sonra oluşan plakların mikroskopik görüntüsü.....	87
Şekil 14. SW-13 hücrelerinde Vero E6 hücre kültür Po virüs titresinin görünümü	88

Şekil 15. Normal enfekte olmayan Vero E6 hücreleri (A) ve KKKAH Turkey-Kelkit06 suşu ile enfeksiyonun 5. gününde Vero E6 hücrelerinin (B) görünümü	91
Şekil 16. PEG8000 ile çöktürme sonrasında ultrasantrifügasyon ile konsantre edilen protein peletlerin görünümü.....	91
Şekil 17. Virüs pürifikasyonu için hazırlanan sükroz tabakaları (A) ve ultrasantrifügasyon sonrası tüplerin görünümü (B).....	92
Şekil 18. KKKAH virüsüne spesifik viral proteinlerin ve büyüklüklerinin Western blot testi ile görüntülenmesi	93
Şekil 19. Fraksiyon kollektör ile 0.5 ml toplanan sükroz fraksiyonların Western blot ile görüntülenmesi.....	94
Şekil 20. Fare beyni aşı antijenlerinin PEG çöktürme sonrası (A) ve protamin sülfat uygulandıktan sonraki (B) sükroz tabakalarından fraksiyonlara ayrıldıktan sonra yapılan Western blot görüntüleri.....	95
Şekil 21. Fare beyni aşısı için hazırlanan ve pürifiye edilen aşı antijenleri (A) ile hücre kültür tabanlı inaktif aşı için hazırlanan ve pürifiye edilen aşı antijenlerinin (B) pürifikasyon öncesi ve pürifikasyon sonrası SDS jel boyama görüntüleri	96
Şekil 22. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile 20 µg dozda yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait 24 kuyucuklu pleytte Log4 ile yapılan nötralizasyon testi.....	102

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Fare beyni 3. pasaj Turkey-Kelkit06 virüs suşunun Vero E6 hücre kültürlerinde enfeksiyon sonrası enfektif viral antijen titresinin günlere göre değişimi	89
Grafik 2. KKKAH virüsünün formaldehit ve oda ısısındaki inaktivasyonu	97
Grafik 3. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile üç farklı dozda yapılan immünizasyonlara ait indirekt ELISA IgG antikor titre yanıtları	100
Grafik 4. Fare beyni tabanlı inaktif aşı ile üç farklı dozda yapılan immünizasyonlara ait indirekt ELISA IgG antikor titre yanıtları	100
Grafik 5. Fare beyni aşısı ve hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile 5 µg (A), 10 µg (B) ve 20 µg (C) dozlarda yapılan immünizasyonlara ait aşı gruplarındaki nötralizan antikor titreleri (PPRNT ₅₀).....	105
Grafik 6. Fare beyni aşısı ve hücre kültür tabanlı inaktif aşılar ile 5 µg (A), 10 µg (B) ve 20 µg (C) dozlarda yapılan immünizasyonlara ait aşı gruplarındaki 2 ay aralıklarla bir yıllık nötralizan antikor titreleri (PPRNT ₅₀).....	108
Grafik 7. İndirekt ELISA testi ile bir yıl boyunca iki ay aralıklarla ölçülen aşı ve doz gruplarına ait IgG antikor yanıtların OD değerlerinin gösterilmesi	110
Grafik 8. AS03, Montanide, Alum ve Aşı Kontrol (adjuvantsız) gruplarına ait 10 µg doz ile yapılan üç immünizasyon sonrası IgG antikor titre artışları	111
Grafik 9. Montanide, AS03, Alum ve aşı kontrol (adjuvantsız) gruplarına ait 10 µg doz ile yapılan 2. ve 3. immünizasyon sonrası nötralizan antikor titre seviyeleri	114

KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
AS03	: Adjuvant sistem 03
AST	: Aspartat aminotransferaz
BALB/c	: Bagg Albino, Inbred araştırma fare suşu
BHK-21	: Yavru hamster böbrek hücresi
BSL	: Biyogüvenlik seviye laboratuvar
CDC	: Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi
cDNA	: Kopya DNA
CF	: Komplement fiksasyon
cm ²	: Santimetre kare
CO ₂	: Karbondioksit
cRNA	: Kopya ribonükleik asit
CsCl	: Sezyum klorit
DIC	: Disemine intravasküler koagülasyon
DNA	: Deoksiribonükleikasit
EIA	: Enzim immün test
ELISA	: Enzim ilintili immünosorbent test
ER	: Endoplazmik retikülüm
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
FFP	: Taze dondurulmuş plazma
FRNT	: Flöresan redüksiyon nötralizasyon
g	: Gram
G	: İğne ölçü birimi

Gc	: Karboksi terminal uç glikoprotein
Gn	: Amino terminal uç protein
GP	: Glikoprotein
ICTV	: Uluslararası Viral Taksonomi Komitesi
ID	: İmmünodifüzyon
IFA	: İmmünfloresan test
IFN	: İnterferon
IFNAR ^{-/-} KO	: İnterferon α/β reseptör çıkartılan fare
IgG	: İmmünoglobulin G
IgM	: İmmünoglobulin M
i.k.	: İntrakraniyal
i.p	: İntraperitoneal
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
KKKA	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi
KKKAH	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı
KKKAHV	: Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü
L	: Large segmenti
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LLC-MK2	: <i>Macaca mulatta</i> maymun böbrek hücresi
Log	: Logaritma
M	: Medium segmenti
MAbs	: Monoklonal antikorlar
mg	: Miligram

mg/dL	: Miligram/desilitre
ml	: Mililitre
mm ³	: Milimetre küp
MOI	: Multiplicity of Infection
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MWCO	: Moleküler ağırlık cut-off
nm	: Nanometre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
NP	: Nükleoprotein
NSm	: Yapısal olmayan M protein
NSs	: Yapısal olmayan S protein
nt	: Nükleotit
OD	: Optik dansite
ORF	: Açık okuma bölgesi
OTU	: Ovaryan tümör proteini
PPFU	: Psödo-plak formasyon ünitesi
PPRNT	: Psödo-plak redüksiyon nötralizasyon test
PreGc	: Gc Prekürsörü
PreGn	: Gn Prekürsörü
RdRP	: Ribonükleik asit bağımlı ribonükleik asit polimeraz enzimi
RKPL	: Aminoasit motifi
RNA	: Ribonükleik asit

RPHA	: Ters pasif hemaglutinasyon testi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RRL	: Aminoasit motifi
RT-PCR	: Tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
S	: Small segmenti
STAT-1	: Transkripsiyon 1 sinyal dönüştürücü ve aktivatörü
SW-13	: İnsan böbreküstü bezi karsinoma hücresi
U/L	: Unite/Litre
Vero E6	: Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı
VKA	: Viral kanamalı ateşi
vRNA	: Viral ribonükleik asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
°C	: Santigrat derece

1. ÖZET

KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ HASTALIĞINA KARŞI KORUYUCU AŞI GELİŞTİRİLMESİ

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü (KKKAHV), insanlarda şiddetli kanamalı hastalığa neden olan kene kaynaklı bir virüstür. Türkiye’de, ilk klinik Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı (KKKAH) vakası 2002 yılında tanımlanmıştır. Türkiye’de bugüne kadar 8000’den fazla KKKAH vakası bildirilmiş olup ciddi halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Hastalığın vaka sayılarının artması, mortalite oranının yüksek olması ve etkili bir tedavisinin olmayışı, KKKAH’nin toplum sağlığını tehdit eden bir biyoterörizm ajan olduğunu düşündürmektedir. Bu bağlamda, KKKAH’ye karşı etkili ve güvenli bir aşı geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, Vero E6 hücre kültürlerinden ve fare beyinlerinden pürifiye edilerek formalin ile inaktive edilip, Alum adjuvant ile formüle edilerek hazırlanan potansiyel KKKAHV aşılarının immünojenitelerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada altı gruba ayrılan (n=6 her bir grup) 4-6 haftalık BALB/c fareler, Alum ile adjuvanize edilen 5, 10 ve 20 µg dozlarda hücre kültür tabanlı aşı ve fare beyni tabanlı aşı ile intraperitoneal (i.p.) yolla immünize edildi. İlk immünizasyondan sonra 21. ve 42. günlerde aynı dozlarla aşılama tekrar edildi. Hem hücre kültür tabanlı aşıda hem de fare beyni aşısında oluşan serum antikor seviyeleri doza bağlı olarak artış göstermektedir. Hücre kültür tabanlı aşının her üç doz gruplarında oluşan serum antikor titreleri fare beyni aşısının uygulandığı doz gruplarından elde edilen titrelerden önemli derecede yüksek olduğu belirlendi. Hücre kültür tabanlı aşının 5 µg doz grubunda aşılama

sonraki 12. ayda ölçülen ortalama nötralizan antikor seviyesi, fare beyni aşısının aynı doz grubundaki 4. ayda ölçülen ortalama nötralizan antikor seviyesi ile benzer olduğu görüldü. Bu sonuçlar açık bir şekilde KKKAHV'ye karşı geliştirilen hücre kültür aşısının, fare beyni aşısına göre daha fazla potansiyel koruyucu etkinliği olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü, inaktif aşı, adjuvantlar, koruyucu yanıt, uzun süreli immünite.

2. ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PROTECTIVE VACCINE AGAINST CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER INFECTION

Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) is a tick-borne virus that causes severe hemorrhagic disease in humans. The first clinical Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) infection was recognized in 2002 in Turkey. Currently, outbreak of CCHF is occurring in Turkey with more than 8000 cases reported creating a serious threat to public health. Increased number of cases, the high mortality rates, considered to be as a bioterrorism agent and lack of effective therapy making CCHF a serious threat to public health. Therefore, development of a safe and effective vaccine against CCHFV should be considered.

This present study evaluates the immunogenicity of potential CCHFV vaccines, based on purified from Vero E6 cell culture and mice brain, inactivated with formalin and formulated with Alum adjuvant. In this study, six groups (n=6 each) of 4 to 6 week old BALB/c mice were immunized via the intraperitoneal (i.p.) route with 5, 10 and 20 µg of the cell culture-based or the mouse brain-derived vaccines adjuvanted with Alum. Booster injections with same formulation were given on 21, and 42 days after first immunization. Serum antibody titer induced by cell culture-based and mouse brain derived vaccines increased in a dose dependent manner. Serum antibody titer induced by cell culture-based vaccine with all three concentrations was significantly higher than those obtained from in mice immunized with mouse brain derived vaccine. The mean of neutralization antibody levels at 12 month post-vaccination in 5 µg dose in mice immunized with culture-based vaccine was as same as the mean of neutralization

level at 4 month post-vaccination in mice immunized with the same dose of mouse brain derived vaccine. These results clearly indicate that the cell culture-based vaccine against CCHFV has more potential protective efficacy than mouse brain derived vaccine.

Keywords: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, inactivated vaccine, adjuvants, protective response, long-term immunity.

3. GİRİŞ

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı (KKKAH) kenelerle nakledilen ve yüksek mortaliteyle seyreden viral bir zoonozdur. Hastalık Asya, Afrika, Balkanlar ve Orta Doğu'da görülmekte olup ölüm oranı %3-30 arasında değişmektedir. Hastalığın belirtileri yüksek ateş, şiddetli baş, sırt ve karın ağrısı, yaygın kanama ve ekimozlar ile karakterizedir (1, 2, 3). Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı medikal açıdan önemli tüm artropod kaynaklı virüsler arasında Dengue Fever'dan sonra en yaygın görülen ikinci hastalıktır. Hastalık, zoonotik olmasından dolayı 2006 yılında Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından ihbari mecburi hastalıklar sınıfına, Ulusal Alerji ve Enfeksiyöz Hastalıklar Enstitüsü (NIAID) tarafından Grup C patojenler listesine dahil edilmiştir (1, 3, 4, 5).

Etken *Bunyaviridae* ailesine mensup *Nairovirus* genusu içinde yer alan tek iplikli, negatif polariteli, üç segmentli RNA virüsüdür. Virüs doğada kene-omurgalı-kene siklusuyla sirküle olmaktadır (3). Çok sayıda ixodid kene türünden virüs izole edilmesine karşın *Hyalomma* spp. keneler virüsün asıl vektörü ve rezervuarı konumundadır (6). Enfeksiyon sıklıkla virüs ile enfekte kenelerin ısırması, çıplak elle ezilmeleri, KKKAH virüs ile enfekte akut fazdaki hastalarla temas ya da viremik fazdaki hayvanların kan ve dokuları ile olan temaslara gerçekleşmektedir (1, 2, 3).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığının erken teşhis edilmesi, olası tedavi yöntemlerine başlanabilmesi ve kontrol altına alınması açısından çok önemlidir. Hastalığın erken teşhisinde, virüsün belirlenmesine yönelik testler önem arz etmektedir. Bu testler arasında, virüsün izolasyonuna yönelik hücre kültür sistemi,

immünohistokimyasal boyamalar ve antijen belirlemeye yönelik enzim immün testler (EIA), tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) gibi testler yer almaktadır. Ayrıca enfeksiyondan ortalama 7 gün sonra KKKAH spesifik immüno globulin M (IgM) ve immüno globulin G (IgG) antikorları enzim ilintili immüno sorbent test (ELISA) ile belirlenebilir düzeye ulaşmaktadır (1, 7).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığının sınırlı tedavi seçenekleri bulunmaktadır. Özellikle destekleyici tedaviler hastalara uygulanan en yaygın tedavi yaklaşımıdır. Destek tedavisi olarak taze donmuş plazma (FFP), trombosit ve eritrosit süspansiyon transfüzyonu gibi replasman yöntemler hastalığın tedavisinde uygulanmaktadır (8). Hastalıktan iyileşen bireylerden ve KKKAH virüs ile immünize edilen hayvanlardan elde edilen anti-KKKAH virüs serum antikorları kullanılarak pasif transfer yoluyla yapılan immünoterapi tedavileri de uygulanmaktadır (8, 9). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), KKKAH'ye karşı ribavirin tedavisini önermektedir. Her ne kadar ribavirin uygulamasının virüs replikasyonunu, semptomları ve ölüm oranını azalttığı gözlemlenmiş de randomize klinik çalışmaların yapılmaması, etkisinin sadece gözlemsel olarak değerlendirilmesi ve etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılamamasından dolayı ribavirin kullanımı henüz tartışmalıdır (1, 2, 3, 8, 9). Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığına karşı FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış etkili bir aşı bulunmamaktadır. Fare beyinlerinden üretilerek inaktive edilip hazırlanan deneysel bir aşı Bulgaristan, eski Sovyetler Birliği'nin Rostov bölgesinde ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde gönüllü insanlarda kullanılarak yüksek oranda antikor yanıt oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak, aşının deneysel olarak virüse karşı koruyucu olduğu belirlenememiştir. Ayrıca aşının fare

beyinlerinden elde edilmesi, bazı otoimmün hastalıkları tetikleme riski bulunması nedeniyle birçok ülkede kullanımına izin verilmemiştir (1, 2, 9). Bu amaçla, hastalığın koruma ve kontrolünde daha etkin, halk sağlığı açısından risk taşımayan modern aşılarda geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığına ait ilk serolojik bulgular 1970 yılında Ege Bölgesi'nde (%9 seropozitiflik) saptanmasına karşın hastalık ülkemizde ilk olarak 2002 yılında tanımlanmış ve vaka sayısı her yıl giderek artmaya devam etmiştir. Türkiye'de yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, Kelkit Vadisi olarak adlandırılan bölgenin *Hyalomma marginatum marginatum* kene türü açısından yüksek prevalansa sahip olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde 2013 Eylül ayı itibari ile 8000 civarında doğrulanmış vaka ve %5 oranında mortalite rapor edilmiştir (10, 11, 12).

3.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığının Dünyada ve Türkiye'deki Tarihsel Gelişimi

Hastalık ilk olarak 12.yy'da Tacikistan'da idrarda, dışkıda, tükürükte ve karın boşluğunda kan bulunması ile karakterize kanamalı hastalık olarak tanımlanmıştır. Hastalığa başlangıçta bit veya karatavuk kuşlarında sıklıkla bulunan *Hyalomma* türü kene larvalarının neden olabileceği düşünülmüştür. Hastalık ayrıca Özbekistan yerel halkı tarafından khungribta (kanama), khunymuny (burun kanaması) ve karakhalak (kara ölüm) olarak adlandırılmıştır. Orta Asya'da akut enfeksiyöz kapillarotoksikozis, akut enfeksiyöz kanamalı hastalık ve Özbekistan hemorajik ateşi KKKAH'ye benzer seyrettiği için uzun bir süre aynı isimlerle anılmıştır (2).

Modern medikal dönemlere gelindiğinde 1944-1945 yıllarında II. Dünya Savaşı sırasında Kırım Bölgesi'ndeki köylülere yardım eden 200 kadar Sovyetler Birliği askerinin enfekte olmasıyla hastalık klinik olarak tanımlanmıştır. Bundan kısa bir süre sonra pirojenik tedavi gören psikiyatri hastalarına Kırım hemorajik ateşi (KHA) hastalarından akut fazda alınan kan örneklerinin filtratları inoküle edilmiş ve ateşli sendromların gözlenmesiyle hastalığın viral kaynaklı olduğu gösterilmiştir (1, 2, 13). Daha sonraki çalışmalarda hastalığa neden olan virüsün vektörü olduğundan şüphe edilen *Hyalomma marginatum* kene türlerinin nimfal dönemdeki süspansiyonlarının filtratları hazırlanarak sağlıklı gönüllü insanlara inoküle edilmiştir. Hastalığa ait karakteristik semptomlar, inokülasyondan iki gün sonra deneysel olarak gösterilmiş viral etiyoloji ve taşıyıcı kene türü ortaya konulmuştur. Ardından, Drosdov adlı hastadan alınan örneklerin Chumakov ve ark. tarafından, yeni doğan beyaz farelere intraserebral olarak inoküle edilmesiyle 1967 yılında Sovyetler Birliği'nde ilk izolat elde edilmiş ve suşa hastanın adı verilmiştir. Hastalık vakaların çıktığı yer ve virüs izolasyonun yapıldığı yerin coğrafi konumundan dolayı Kırım kanamalı ateşi (KKA) olarak adlandırılmıştır (2, 13, 14, 15). İki yıl sonra bu virüsün, şimdiki adıyla Demokratik Kongo Cumhuriyeti olarak bilinen Belçika Kongosu'nda ateşli bir çocuktan 1956 yılında izole edilen virüs ile antijenik, fizikokimyasal ve morfolojik olarak benzer olduğu ortaya konulmuştur. Takip eden epidemilerde de izole edilen virüs suşları geliştirilen serolojik ve antijenik testler ile doğrulanmıştır. Virüs, "Kırım kanamalı ateşi-Kongo virüsü" ve şimdiki adıyla "Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü (KKKAV)" olarak adlandırılıp, hastalığa da "Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı (KKKAH)" adı verilmiştir (1, 2, 13, 14, 16, 17, 18).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi virüsü/hastalığı, Afrika (Demokratik Kongo Cumhuriyeti, Uganda, Moritanya, Güney Afrika, Tanzanya, Nijerya, Senegal vb.), Güneydoğu Avrupa (Rusya, Bulgaristan, Kosova, Türkiye, Yunanistan vb.), Orta Doğu (Birleşik Arap Emirliği, Irak, İran, Suudi Arabistan, Umman) ve Asya (Çin, Kazakistan, Tacikistan, Özbekistan, Pakistan) kıtalarında ve çok sayıda ülkede rapor edilmiştir (14). Türkiye’de ilk serolojik vakalar 1970’li yıllarda Ege Bölgesi’nde arboviral kaynaklı seroepidemioloji çalışmasında hemagglütinasyon inhibisyon test ile insan serum örneklerinde %9,2 olarak kaydedilmiştir (19). Ancak, 2002 yılından önce herhangi bir KKKAH klinik vakası veya kenelerde KKKAH virüsü varlığı bildirilmemiştir. 2002-2003 yıllarında Doğu Anadolu Bölgesi’nde özellikle Tokat ve Sivas illerindeki hastanelere kanamalı ateş belirtileri gösteren hasta başvuruları, aynı zamanda Ankara’daki hastanelere de benzer şekilde çok sayıda hasta başvuruları olmuştur. Bölgedeki beklenmedik klinik sendromlardan dolayı Sağlık Bakanlığı Temmuz 2003’de epidemiyolojik bir inceleme başlatmış ve bu rapora göre benzer hastaların birçoğunun geçmişinde hayvan çiftliklerinde çalışmış olduğu, rahatsızlıkların kene ısırması ile başladığı, laboratuvar ve klinik bulguları olarak ise bütün hastalarda trombositopeni, lökopeni, yüksek transaminaz seviyeleri [özellikle aspartat transaminaz (AST) ve laktat dehidrogenaz (LDH)], ateş, kas ağrısı, bulantı ve baş ağrısı görüldüğü bildirilmiştir. Türkiye’de daha önceki yıllarda viral kanamalı ateş (VKA) vakaları rapor edilmediğinden, serumlar ilk olarak *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Leptospira* ve *Coxiella* gibi bakteriyolojik yönden ve ayrıca kimyasal ve radyoaktif toksikasyonlar yönünden incelenmiştir. Bu döneme kadar olan süreçte hastalık tanımlanamamıştır. Sağlık Bakanlığı medikal önlemlerin yanında kenelere karşı

koruyucu önlemler, sağlık çalışanlarının ve veteriner hekimlerin bilgilendirilmesine yönelik çalışmalar başlatmıştır. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi (RSHM) tarafından benzer vakalara ait serumların ulusal bazda toplanmasına başlanmıştır. Elde edilen bu serumlar, Fransa'nın Lyon kentindeki Pastör Enstitüsü'ne daha detaylı çalışılması amacıyla gönderilmiştir. Ağustos 2003 tarihinde Pastör Enstitüsü, serolojik ve moleküler incelemeler sonucunda etkenin KKKAH virüsü olduğunu bildirmiştir. Bu durum Türkiye'de bildirilen ilk viral kanamalı ateş vakaları olarak kaydedilmiştir (12, 19, 20).

3.2. Viral Sınıflandırma

Uluslararası Viral Taksonomi Komitesi'ne (ICTV) göre *Bunyaviridae* ailesi içerisinde memelilerde enfeksiyon oluşturan; *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve bitkilerde enfeksiyon oluşturan; *Tospovirus* olmak üzere beş genus yer almaktadır. *Hantavirus* genusu içerisinde 24, *Nairovirus* genusunda 7, *Orthobunyavirus* genusunda 48, *Phlebovirus* genusunda 9, *Tospovirus* genusunda ise 8 tür bulunmaktadır. *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus* genusunda yer alan virüsler artropotlarla taşınırken *Hantavirus* genusunda yer alan virüsler rodentlerle taşınmaktadır (21, 22). *Nairovirus* genusunda yedi serogrup bulunmaktadır ve bunların tamamının ixodid ve argasid keneler tarafından taşındığı bilinmektedir. En önemli serogrup KKKAHV ve Hazara virüsün yer aldığı Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA) grubu ile Nairobi koyun hastalığı (NSD) virüsü ve Dugbe virüsün yer aldığı Nairobi koyun hastalığı virüs serogruplarıdır. *Nairovirus* genusu içerisinde KKKAH virüsü, Dugbe virüsü ve Nairobi koyun hastalığı virüsü insanlarda

hastalık oluşturan önemli viral etkenlerdir (1, 2). Bu aile içerisindeki virüsler; ensefalit [La Crosse virüs (LACV), Jamestown Canyon virüs (JCV), Toscana virüs (TOSV)], kanamalı ateş [KKKAHV, Rift Vadisi humması (RFVF), Hantaan virüs, Andes virüs (ANDV)] ve kardiyopulmoner sendrom [Sin Nombre virüs (SNV)] gibi önemli zoonoz hastalıklara neden olmaktadır (2, 23).

Murphy ve ark., 1973 yılında Kongo virüsünün *Bunyaviridae* ailesindeki diğer virüslerle morfolojik olarak benzer olduğunu göstermiştir. Chumakov ve ark., 1975 yılında Kırım kanamalı ateşi virüsünün ve Kongo virüsünün elektron mikroskopi çalışmasında her iki suşun morfolojik olarak farksız olduğunu ortaya koymuş ve böylece etken *Bunyaviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmıştır (16, 24).

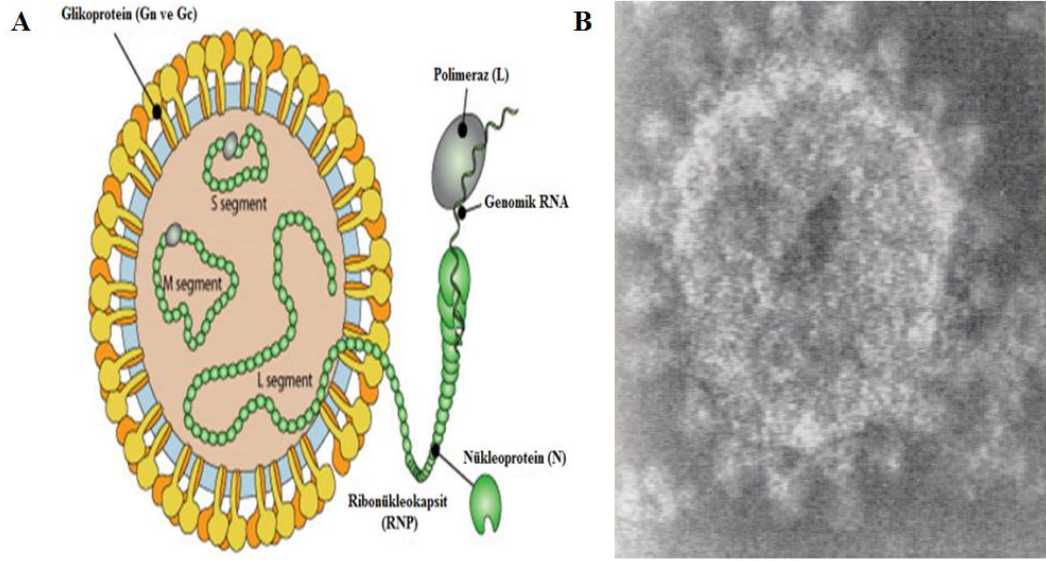
Filogenetik sınıflandırma çalışmalarına göre; Karti ve ark., Türkiye’de ilk kez 2002-2003 yıllarında görülen KKKAH vakalarından elde edilen serum örneklerinden, Turkey Gumushane200310845 ve Turkey Gumushane200310849 olarak isimlendirdikleri izolatların virüs nükleoprotein gen bölgesine ait, 483 bazlık kısmi parçasını sekanslamışlardır. Filogenetik analiz sonuçlarına göre Türkiye’de ortaya çıkan KKKAH vakalarında iki farklı izolatın sirküle olduğu ve bunların sırasıyla Kosova ve Güneybatı Rusya izolatlarına yakın olduğu, İran izolatlarından ise tamamen farklı olduğu ortaya konulmuştur (20). Ardından 2006 yılında Deyde ve ark. Turkey200310849 adlı izolatın tüm genomunu sekanslamışlardır. Daha önce tüm genom sekansları bildirilen KKKAH virüs izolatlarının filogenetik analizlerine göre Turkey200310849 suşu Rusya, Bulgaristan ve Kosova izolatlarının da içinde bulunduğu Avrupa/Türkiye (Grup V) içerisinde sınıflandırılmıştır (25). Yapılan çok sayıdaki filogenetik analiz

alışmaları sonucunda KKKAH virüs izolatlarının yedi farklı gruba ayrıldığı ve aynı grupta yer alan izolatların birçoğunun aynı coğrafik bölgelerden elde edilen virüslere ait olduğu belirlenmiştir (14).

Tonbak ve ark.'nın 2006 yılında Kelkit Vadisi olarak adlandırılan bölgede yaptıkları bir çalışmada sığır, koyun ve keçilerden elde ettikleri çok sayıdaki kenelerden virüs izolasyonu yapmışlardır. Virüs nükleoprotein gen bölgesine ait 212 bazlık kısmi parçanın filogenetik analiz sonucuna göre; Türkiye'deki KKKAH vakalarına sebep olan virüsün Grup V içerisinde yer alan Kosova, Bulgaristan ve Rusya suşlarına genetik olarak yakın olduğunu göstermişlerdir (10). Özdarendeli ve ark. 2007 yılında Kelkit Vadisi'nde daha geniş bir alanda yaptıkları çalışmada, 2007 yılındaki KKKAH vakalarından elde edilen insan serumları ve 2005-2006 yıllarında evcil memelilerden toplanan kene örneklerinden virüs izolasyonu yapmışlardır. Hem insan hem de kenelerden elde edilen virüs izolatların M segmentlerine ait 417 bazlık kısmi parçaların filogenetik analizinde, Tonbak ve ark.'nın buldukları sonuca benzer şekilde Türkiye'deki KKKAH virüs izolatlarının Avrupa ve Rusya izolatlarının dahil olduğu Grup V içerisinde yer aldığını göstermişlerdir (26). Özdarendeli ve ark. 2010 yılında yaptıkları başka bir çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi'nde tedavi görmekte olan ve KKKAH klinik semptomları gösteren bir hastadan virüs izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. "Turkey-Kelkit06" adı verilen KKKAH virüs izolatının, tüm genomunu sekanslayarak filogenetik analizini yapmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Turkey-Kelkit06 virüs izolatı Grup V içerisinde yer alan diğer izolatlar ile hem nükleotit hem de aminoasit dizilimi yönünden yüksek oranda benzerlik göstermiştir (27).

3.3. Viral Yapı ve Viral Genom Özellikleri

Nairovirüsler, *Bunyaviridae* ailesinin diğer üyelerine temel yapı, morfogenez, replikasyon siklusu ve fizikokimyasal özellikleri bakımından genel olarak benzer özellikler göstermektedir. Viryonlar sferik, ortalama 100 nm çapında, konak hücre kökenli yaklaşık 5-7 nm kalınlığında çift katmanlı lipit bir zarla çevrili kapsit ve 8-10 nm uzunluğunda glikoprotein uzantılarına sahiptir (Şekil 1) (2, 28, 29, 30, 31). Viryonların moleküler ağırlığı $3.26 (\pm 0.46) \times 10^8$, sükröz ve sezyum klorit (CsCl)'deki buoyant yoğunlukları sırasıyla 1.16-1.18 ve 1.20-1.21 g.cm⁻³, sedimentasyon katsayı aralığı ise 350-500 S arasındadır (32, 33).

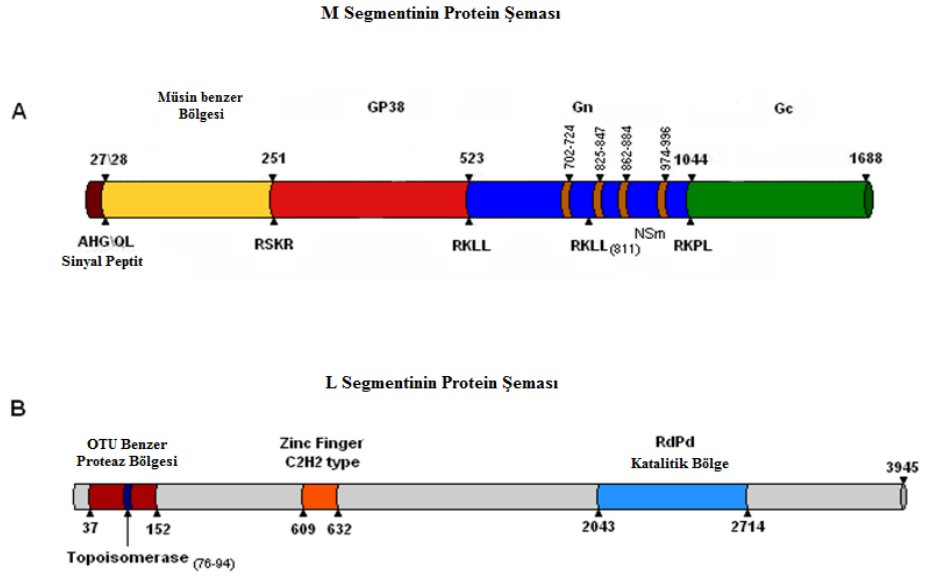


Şekil 1. KKKAH virüsünün morfolojisi. (A) Virüsün yapısal ve morfolojik görünümü ve (B) enfekte BHK-21 hücrelerde elektron mikroskopik görünümü (29, 34)

Viral genom tek iplikli, negatif polariteli ve sırasıyla büyüklüklerine göre isimlendirilmiş S, M, L olmak üzere üç segmentli RNA'dan oluşmaktadır (1, 2, 27). Her üç segmentin 3' terminal uçlarının ilk 8-13 nükleotitik (nt) bazları çok

iyi korunduğundan benzer sekans dizilimleri bulunmaktadır, 5' uçlarda ise komplementer konsensüs sekans dizilimi yer almaktadır. Terminal uçlardaki baz eşleşmesinden dolayı RNA segmentleri stabil “panhandle” yapısında ve kovalent olmayan kapalı sirküler bir şekle sahiptir. *Bunyaviridae* ailesinde, genus içi virüsler arasında terminal uçlar son derece iyi korunmuştur. Ancak, genuslar arasında farklılıklar vardır (2, 33, 35, 36). Viral RNA; S, M, L segmentleri sırasıyla ortalama 1.7 kb, 5.4 kb, 12.2 kb olmak üzere yaklaşık 19 kb nükleotit büyüklüğünde ve her bir segment açık okuma bölgesine (ORF) sahiptir (2, 27, 37).

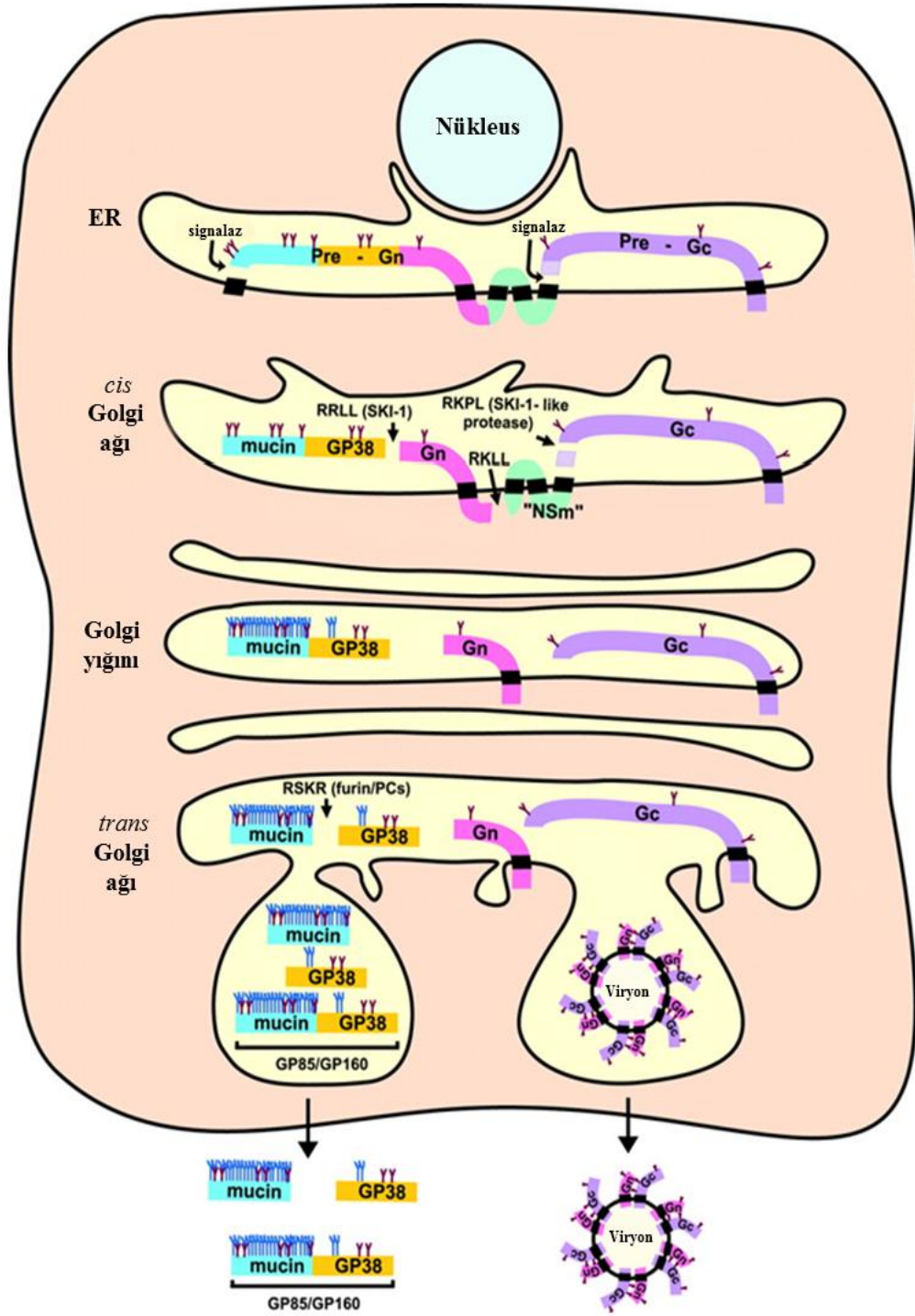
Türkiye’de izole edilen Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun, 2010 yılında Özdamar ve ark. tarafından tüm genom analizi yapılarak izolatanın 1673 nt S, 5364 nt M, 12.149 nt L olmak üzere toplam 19.186 bazdan oluştuğu ortaya konulmuştur. S segmenti 56-1504 baz aralığında bir ORF bölgesine sahiptir. Bu bölgeden 482 aminoasit büyüklüğünde bir nükleoprotein kodlanmaktadır. M segmenti 5067 bazdan oluşan ve 78-5144 baz aralığında bulunan ORF bölgesine sahiptir. Bu okuma bölgesi 1688 amino asit uzunluğunda bir poliprotein kodlamaktadır. Bu poliprotein üzerinde RSKR251, RKLL523 ve RKPL1040 adlı subtilaz SKI-1’in kesim bölgeleri olan aminoasit motifleri yer alır. Bu bölgelerden kesim sonucunda sırasıyla GP38, Gn ve Gc proteinleri oluşmaktadır. L segmenti ise 78-11.915 nt arasında 11.838 nt uzunluğunda, 3945 amino asit büyüklüğünde bir ORF içermektedir. ORF üzerinde RNA bağımlı RNA polimeraz enzim (RdRP) ise 2043-2714 nolu bölgeden kodlanmaktadır. Aynı zamanda ovaryan tümör (OTU) benzeri proteaz (37-152), C₂H₂ tip bir çinko parmağı (609-632), topoizomera (76-94) bölgelerine de rastlanmıştır (Şekil 2) (27).



Şekil 2. Turkey-Kelkit06 KKKAH suşunun protein şeması. M segmentinin poliprotein (A) ve L segmentine ait protein şeması (B) ile aminoasit motif bölgelerinin konumları (27)

3.3.1. Viral Proteinler ve Fonksiyonları

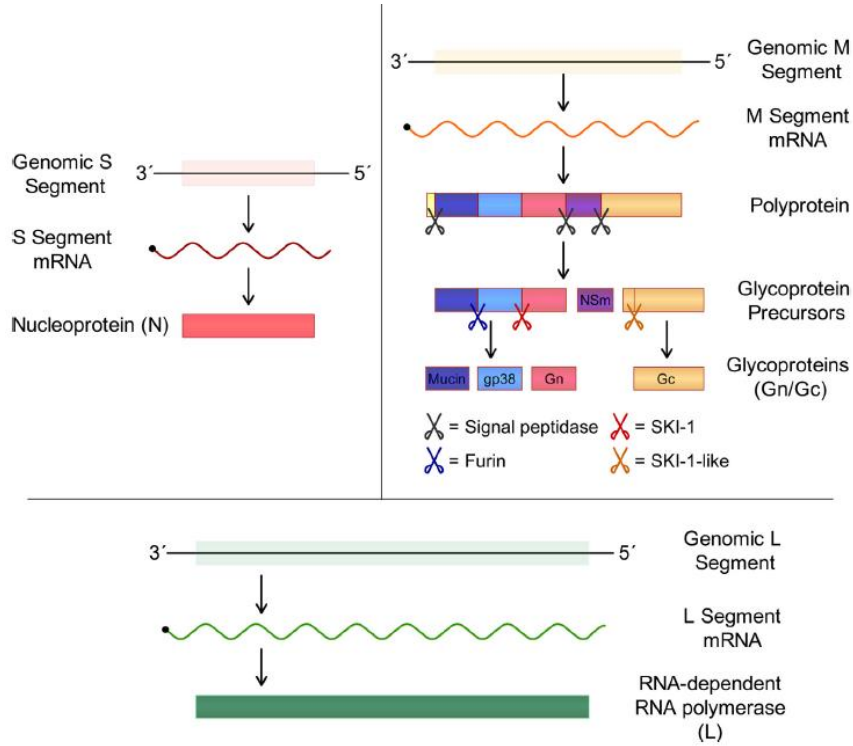
Bunyaviridae ailesi içerisindeki L segmenti, 6.3 ile 12 kb arasında değişen büyüklüklere sahiptir. Sekans analizlerine göre *Nairovirus* genusunda yer alan virüslerdeki L segmenti diğer genuslardaki L segmentlerinden yaklaşık iki kat daha büyüktür. L segmenti tarafından yalnızca 450 kDa büyüklüğünde RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRP) enzimi sentez edilmektedir. Viral RNA (vRNA) ve kopya RNA (cRNA)'ların replikasyon/transkripsiyonlarını sağlamaktadır. *Nairovirus* L gen segmentinin analizlerinde, amino (N) terminal ucunda genus içinde korunmuş ovarian tümör (OTU) benzeri proteaz bölgesi tespit edilmiştir (2, 25, 27, 38, 39, 40).



Şekil 3. Hücre içerisinde viral glikoproteinlerin işlenim aşamalarının şematik görünümü (41)

Nairovirus M segmenti 3.5-6 kb büyüklüğünde olup diğer genoslardan %30-50 daha büyüktür (2). Bu segment tarafından yaklaşık 240 kDa büyüklüğünde bir poliprotein kodlanmaktadır. Proteolitik kesim sonucunda 140 kDa büyüklüğünde PreGn ve 85 kDa büyüklüğünde PreGc prekürsör proteinler oluşmaktadır. Bu proteinler endoproteolitik ve postranslasyonel aşamalardan sonra 37 kDa büyüklüğünde Gn ve 75 kDa büyüklüğünde Gc glikoproteinlerine dönüşmektedir (Şekil 3) (2, 26, 39, 41). Gn ve Gc proteinler önceleri G1 ve G2 olarak adlandırılmış olsa da daha sonra amino (N) terminal ve karboksi (C) terminal uçlarda yer almalarına göre Gn ve Gc olarak isimlendirilmektedirler. PreGn konak hücrelerde bulunan endoplazmik retikulumun cis-Golgi kısmında Gn'nin N terminal ucunun oluşması için subtilaz SKI-1 tarafından kesilmektedir. Bu arada musin-GP38 bölgesi oluşmakta ve furin tarafından işlenerek çözünebilir yapıdaki GP38, GP85, GP160 ve musin benzeri glikoproteinler ortaya çıkmaktadır (42, 43). M segmenti üzerinde yapılan sekans ve protein analizleri sonucunda %31 nükleotit, %27 aminoasit farklılaşması olduğu gösterilmiştir. Bu farklılaşma virüsün, artropod ve omurgalı konak hücrelerine daha etkili tutunması ve farklı immün yanıtlara daha iyi uyum sağlayacak şekilde gelişmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (25, 26). Gn ve Gc glikoproteinlere ilaveten *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve ambisens yöntemle de *Tospovirus* genusundaki virüslerin PreGn'nin C terminal ucundan yaklaşık 14 kDa büyüklüğünde NSm adlı protein sentezledikleri bilinmektedir (36, 44). Bouloy ve ark., tersine genetik yöntemleri kullanarak yaptıkları bir çalışmada, NSm proteinin anti-apoptotik fonksiyonu olduğunu bildirmişlerdir (45). Altamura ve ark., *Nairovirus* genusunda yer alan IbAr10200 adlı KKKAH virüs izolatı üzerinde yaptıkları bir

çalışmada ise pürifiye virüslerde, NSm proteinini belirlenmemesine rağmen enfekte hücrelerde NSm'nin sentezlendiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda KKKAH virüsün replike olabildiği çok sayıda omurgalı hücreler tarafından NSm proteinini sentezlenmektedir. Bu durum KKKAH virüsüne vektörlük yapan kene hücrelerinde de gösterilebilirse virüsün konak seçiciliği aydınlatılmış olacaktır (44, 46).



Şekil 4. Viral segmentlerden proteinlerin transkripsiyon ve translasyon aşamalarının şematik görünümü (47)

S segmenti 1-2.2 kb büyüklüğündedir. Bu segment tarafından 55 kDa büyüklüğünde N protein (NP) sentez edilmektedir. *Nairovirus* ve *Hantavirus*'lerde aynı büyüklükte sentez edilen N proteinini diğer genuslardan sentez edilen N proteinlerinden daha büyüktür (36, 42, 44, 48). NP, viral RNA'larla etkileşime girerek ribonükleoprotein kompleksini meydana

getirmektedir. Bu kompleks, viral genomik RNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonunda görev almaktadır (48). Wang ve ark. yaptıkları bir çalışmada, KKKAH virüs N proteininin oligomerize ribonükleoprotein (RNP) ve serbest monomer olmak üzere iki farklı konformasyonu olduğunu göstermişlerdir. N proteinin oligomerize formdan serbest monomerik forma dönüştüğü sırada kaspaz-3 enzim kesim bölgesi açığa çıkmakta ve hücresel kaspaz-3 enzimler tarafından kesildiği belirtilmektedir. Bu kesim bölgesi sadece monomerik formda açığa çıkmaktadır. Bu bölgenin mutasyonu kaspaz-3 tarafından kesilmeyi inhibe ederek viral RNA transkripsiyonu sırasında viral polimeraz enzimini daha fazla aktive eder. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı viral N proteininin konak hücre kaspaz-3 enzimi tarafından kesilmesi, viral RNA sentezinin kontrol edilmesi ve KKKAH enfeksiyonuna karşı konakçı savunma mekanizmasının gelişmesi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (49). *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* ve *Tospovirus* genuslarında NP'den başka yapısal olmayan 10-50 kDa büyüklüğünde NSs sentez edilmektedir (36). Bridgen ve ark., NSs proteinin hücresel protein sentezini azalttığını ve interferon uyarımını engellediğini göstermişlerdir (50).

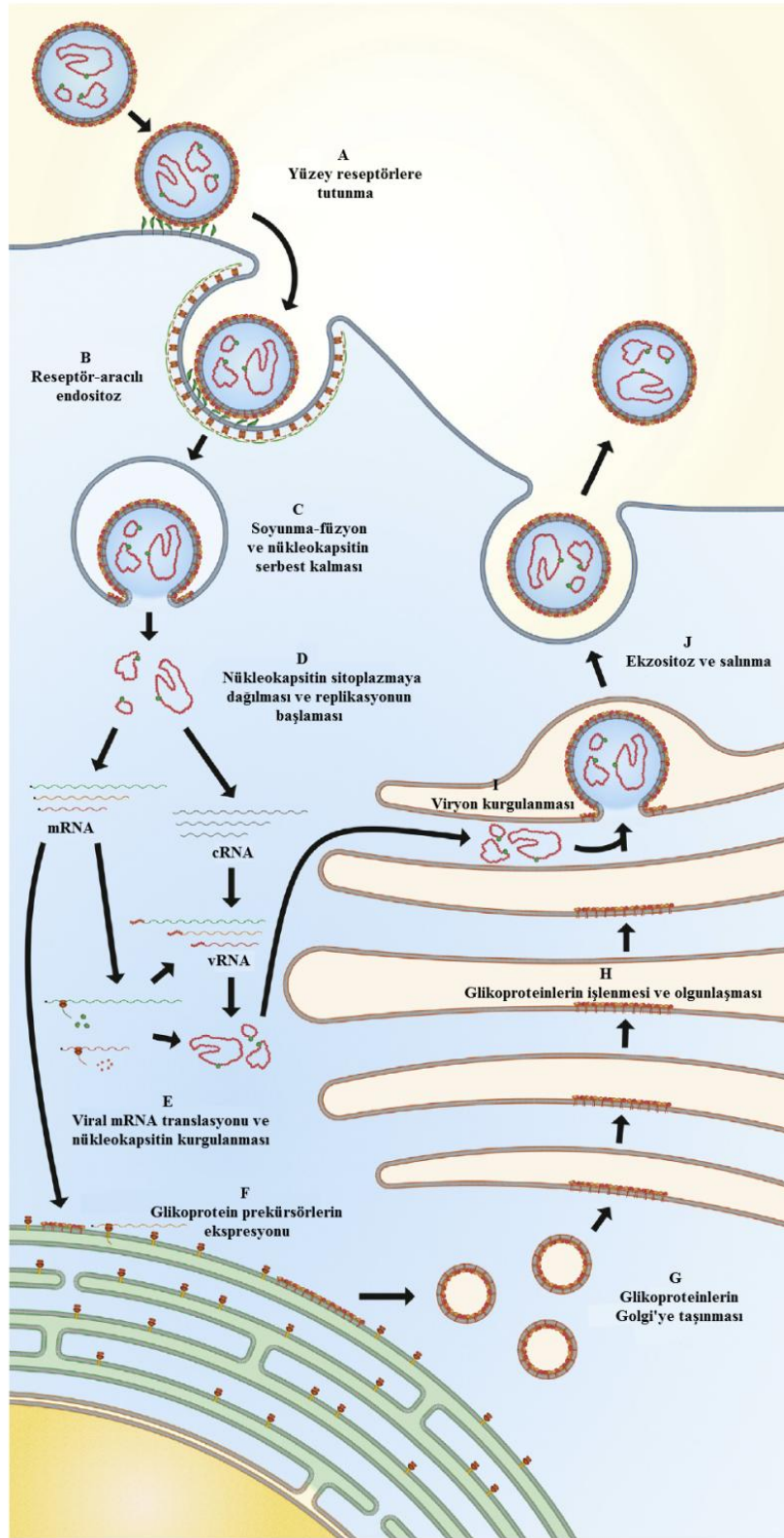
3.3.2. Virüs Çoğalma Stratejisi

Virüslerin çoğalma siklusu, hedef hücre yüzeyinde bulunan ilgili reseptörlere viral glikoproteinlerinin tutunması ile başlar. *Bunyaviridae* ailesinde bu olay tam olarak aydınlatılamamıştır. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsünün hücre yüzeyine tutunmasında Gn ve Gc'nin birlikte büyük çoğunlukla da Gc glikoproteininin sorumlu olduğu bilinmektedir. Hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda, hücre yüzeyinde nükleolin reseptörü bulunan hücre tiplerinin

enfeksiyona daha çok duyarlı olduğu gösterilmiştir (36, 51). Mirazimi ve ark., yaptıkları çalışmalarda, virüsün polarize hücrelerin bazolateral yüzeylerinden girdiği, hücre mikrotübüllerinde yapılan manipölasyonların ise virüsün biyogenezisini engellediğini göstermişlerdir (52, 53, 54).

Kırım-Kongo kanamalı ateşı hastalığı virüsünün hücre içerisine alınması ise klatrin aracılı endositoz ile gerçekleştiği ve asidik pH'da glikoproteinlerin konformasyonel değişiklikler ile birlikte internalizasyona uğradığı bildirilmiştir (54, 55). Füzyon gerçekleşmesinin hemen ardından RNP'ler hücre sitoplazmasında serbest kalır ve sadece RdRP enzim ile ilişkili olan vRNA'lar transkribe edilir. L proteinin endonükleaz aktivitesi sayesinde konakçı hücre sitoplazmasında bulunan, mRNA'lara ait oligonükleotit parçaları kullanılarak viral mRNA sentezi başlatılır. Bu mekanizmaya “şapka çalma” adı verilir, influenza virüslerin aksine bunyavirüsler nüklear mRNA'ları kullanmazlar. Viral RNA'lar mRNA sentezi, viral protein translasyonunun sağlanması ve yeni viral RNA'ların üretilmesinde kullanılacak cRNA'ların oluşmasında kalıp olarak kullanılırlar. M segmenti, çoğunlukla endoplazmik retikulum (ER) membrana bağlı ribozomlar aracılığıyla protein translasyonunu gerçekleştirir. Poliprotein olarak üretilen M glikoprotein prekürsörleri (PreGn ve PreGc) sinyal peptidazlar tarafından postranslasyonel kesim işlemine uğrarlar. Prekürsör proteinler endoplazmik retikulum/cis-Golgi kompartmanlarında bulunan serin proteaz subtilisin-keksin izoenzim-1 (SKI-1) proteazlar tarafından proteolize edilerek Gn ve Gc glikoproteinlerin N terminal uçları oluşturulur. Bu arada PreGn N terminal ucunda müsün-GP38 bölgesi oluşmakta ve furin tarafından işlenerek çözünebilir yapıdaki GP38, GP85, GP160 ve musin benzeri glikoproteinler meydana

getirilmektedir (Şekil 4) (35, 42, 43). Gn proteinin doğru bir şekilde glikolize olması, katlanması KKKAH virüs glikoproteinlerin lokalizasyonu ve transportu için oldukça önemlidir. Aksi halde ER’de hem Gc hem de diğer viral proteinler birikmektedir. Nükleoprotein, aktin filamentleri veya mikrotübül ağlar aracılığıyla perinüklear kompartmana transport edilir ve RNA segmentlerinin “panhandle” formasyonunu oluşturarak RNP’leri şekillendirirler. L proteinin de perinüklear bölgeye lokalize olduğu düşünülmektedir. Kurgulanma ve olgunlaşma tam olarak aydınlatılamasa da Golgi kompleksinden sekretuvar yolu kullanarak zar kazanan viryonlar, hücreden serbest kalırlar (Şekil 5) (36, 42, 56, 57, 58).



Şekil 5. KKKAH virüsünün intrasellüler replikasyon aşamalarının şematik görünümü (47)

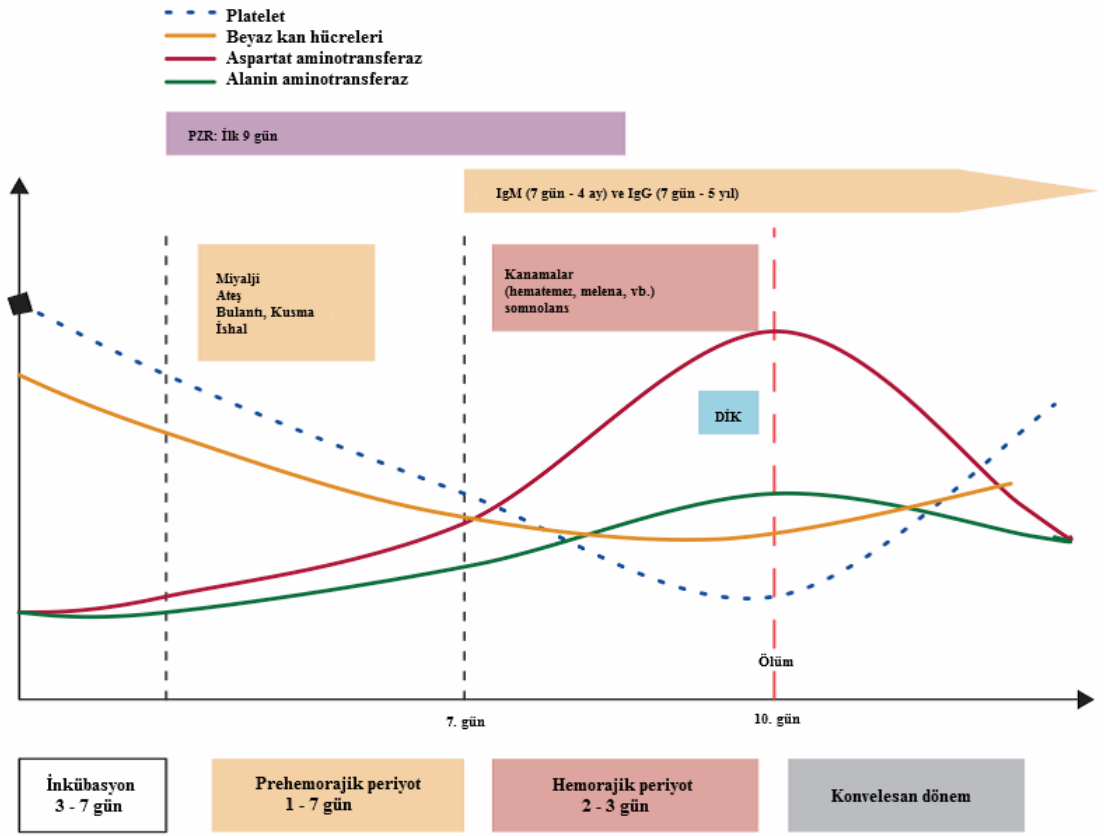
3.4. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Patogenezi

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı patogenezi, yakın zamana kadar hastalığın sporadik olarak görülmesi, klinik patoloji uygulamalarının sınırlı olması, ölen hastalara otopsi yapılamaması, virüsün gelişmiş laboratuvarlarda (BSL-4) çalışılmasına izin verilmesi ve hayvan modelinin olmaması gibi sebeplerden dolayı tam olarak aydınlatılamamıştır. Sınırlı sayıda yapılan patogenezi çalışmaları ise kan parametreleri üzerindeki değişiklikler ve hasta bireylerin karaciğerlerinden alınan biyopsilerin incelenmesiyle mümkün olabilmektedir (1, 2). Ancak, son zamanlarda geliştirilen transjenik hayvan modelleri sayesinde enfeksiyonun patogenezi hakkında daha detaylı bilgilere ulaşılabilmektedir (59, 60).

Kanamalı ateşe neden olan virüsler immün sistemle ilgili hücreleri enfekte etmekte, vasküler sistem ve lenfoid organlarda regülasyon bozukluğu ile birlikte viral replikasyonu gerçekleştirmektedir. Damar endotel hücrelerinin enfeksiyonu KKKAH patogeneziinde önemli rol oynamaktadır. Endotelyum ya doğrudan viral faktörler tarafından ya da konak hücre kaynaklı mediyatörler aracılığıyla hedef haline getirilir. Aynı zamanda endotelial hücrelerde virüsün replikasyonu da gerçekleşir. Böylece vasküler endotellerde fonksiyon bozuklukları ortaya çıkar. Endotel hasar platelet agregasyonu ve degranülasyonun uyarılmasına neden olarak intrinsik koagülasyon kaskatların aktivasyonu ile hemostazın bozulmasına neden olur. Endotel hücrelerin aktivasyonu enflamatuvar bölgeye lökositlerin adezyon ve transmigasyon reaksiyonlarının başlamasına yol açar. Yapılan deneysel *in vitro* çalışmalarda intrasellüler adezyon molekül 1 (ICAM1) ve vasküler hücre adezyon molekül 1 (VCAM1) ile endotelial adezyon molekül (E-selektin)

regölasyonlarında artışlar gösterilmiştir. Ölümcül KKKAH vakalarında, hastalığın erken safhasında dikkat çekici derecede anormal koagölasyon sistem indikatörlerin artması ve dissemine intravasküler koagölasyonların (DİK) görülmesi hastalığın seyri hakkında önemli bilgiler vermektedir (1, 2).

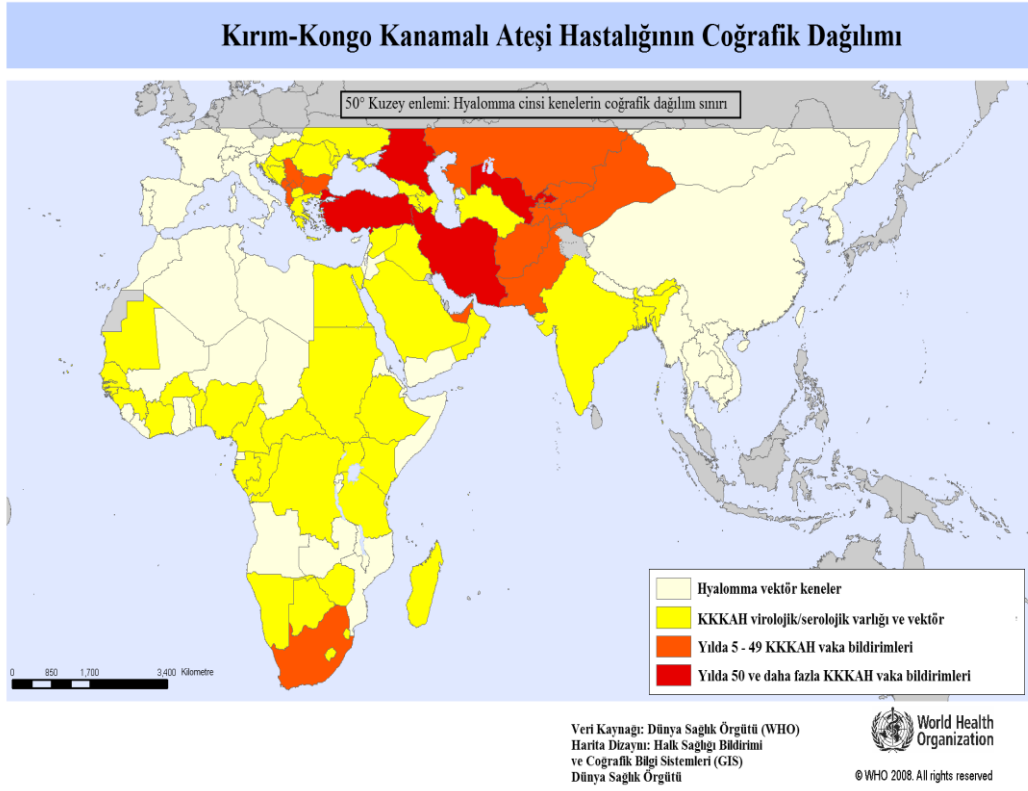
Türkiye’de yapılan bir çalışmada hastaların %50’sinde reaktif hemofagositoz gözlenmiştir. Bu durum hemofagositozun enfeksiyon boyunca sitopenide önemli rol oynadığını kanıtlamaktadır (1, 61). Hemofagositik lenfohistiyozis; interferon gama ($INF\gamma$), tümör nekrozis faktör alfa ($TNF\alpha$), interlöykin 1 (IL-1), IL-6 gibi yardımcı T lenfosit-1 (Th1) sitokinlerin aşırı artışından sorumlu olmakla birlikte sitokinlerin KKKAH patogenezinde indirekt olarak katılmasının kanıtı olmaktadır. Proenflamatuvar sitokinlerin aşırı artması kanama ve koagölasyona da sebep olarak gösterilmektedir. Birincil patofizyolojik olay, eritrosit ve plazmanın damar dışına sızmasıdır. Trombositopeni ve platelet sayısının, ölümcül vakaların erken safhalarında son derece düşük olması, KKKAH enfeksiyonunda belirleyici özellik olarak bilinmektedir. Ölümcül vakalarda DIC skoru, IL-6 ve $TNF\alpha$ seviyeleri ile pozitif; IL-10 seviyesi ile de negatif korelasyon göstermektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda serum aspartat (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) seviyelerinin artışı, protrombin ve kısmi tromboplastin süresinin uzadığı da gözlenmiştir (Şekil 6) (1, 2, 61, 62, 63, 64, 65, 66). Tüm bu çalışmalar, vasküler endotel hasarının KKKAH enfeksiyonu ile karakterize olmasının nedeni olarak, virüse karşı konak tarafından çoklu mekanizmaların tetiklenmesi ile açıklanmaktadır. Benzer sonuçlar, geliştirilen *in vivo* hayvan modellerinde de gösterilmiştir (2, 59, 60, 67).



Şekil 6. KKKAH'nin klinik ve laboratuvar seyri (DİK: dissemine intravasküler koagulopati) (1)

3.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Epidemiyolojisi

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı, kene kaynaklı arboviral bir enfeksiyondur. Hastalık sporadik olarak görülmekle birlikte doğada kene→omurgalı→kene siklusı ile sirküle olmaktadır. Omurgalı canlılar ve keneler hastalığın rezervuarı olarak rol oynamaktadır. Enfeksiyon insanlar dışındaki omurgalılarda geçici bir viremi şeklinde ve gizli seyreder. Keneler, akut viremi dönemindeki omurgalı hayvanlardan kan emdikleri esnada enfekte olurlar (68).



Şekil 7. KKKAH'nin coğrafi dağılımı (69)

3.5.1. Omurgalı Rezervuar ve Konaklar

Virüs bugüne kadar; sığır, koyun, keçi, tavşan, kirpi, fare ve köpek olmak üzere çok sayıda evcil ve vahşi hayvanlardan izole edilmiştir. Avrupa, Asya ve Afrika kıtalarının bazı bölgelerinde yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda; sığır, deve, at, eşek, koyun, keçi ve domuz gibi hayvanlarda antikor varlığı tespit edilebilmiştir. Aynı zamanda Tacikistan'da bir sürüngen ve kaplumbağada da antikor belirlendiği bildirilmiştir (1, 2).

Berezin ve ark. yaptıkları bir çalışmada, çok sayıda ekin kargası ve dağ güvercinlerini KKKAH virüsü ile deneysel olarak enfekte etmişlerdir. Çalışma sonucunda bu kanatlılarda viremi ya da antikor yanıtı oluşmadığı belirlenmiştir. Ancak, aynı kanatlılar üzerinden toplanan nimfal dönemdeki kenelerden, KKKAH

virüsü izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bazı deneysel enfeksiyonlardan sonra da kanatlı hayvanların birçoğunun virüse dirençli olduğu görülmüştür. Ancak, devekuşlarında, seroepidemiyolojik testlerde KKKAH virüsüne karşı antikor yanıtı olduğu belirlenmiştir. Yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında ise 1- 4 günlük viremi gerçekleşmekte ve iç organlarda beşinci güne kadar virüs belirlenebilmektedir. Bu durum, devekuşlarının endemik bölgelerden uluslararası bölgelere naklinde karantina süresi uygulanmasına yol açmıştır (2).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsünün omurgalı canlılar arasında yayılmasında, kene aracılı taşınma söz konusudur. Devekuşları dışında kanatlı hayvanların özellikle göçmen kuşların, enfekte keneleri nakletmeleri dışında hastalığın epidemiyolojisi üzerine doğrudan katkıları bulunmamaktadır (1).

Maymunlarda deneysel enfeksiyonlar yapılmasına karşın doğada, insanlar dışında diğer omurgalı memeli hayvanlarda sadece geçici bir viremi görülmekle birlikte herhangi bir klinik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 7) (1, 2).

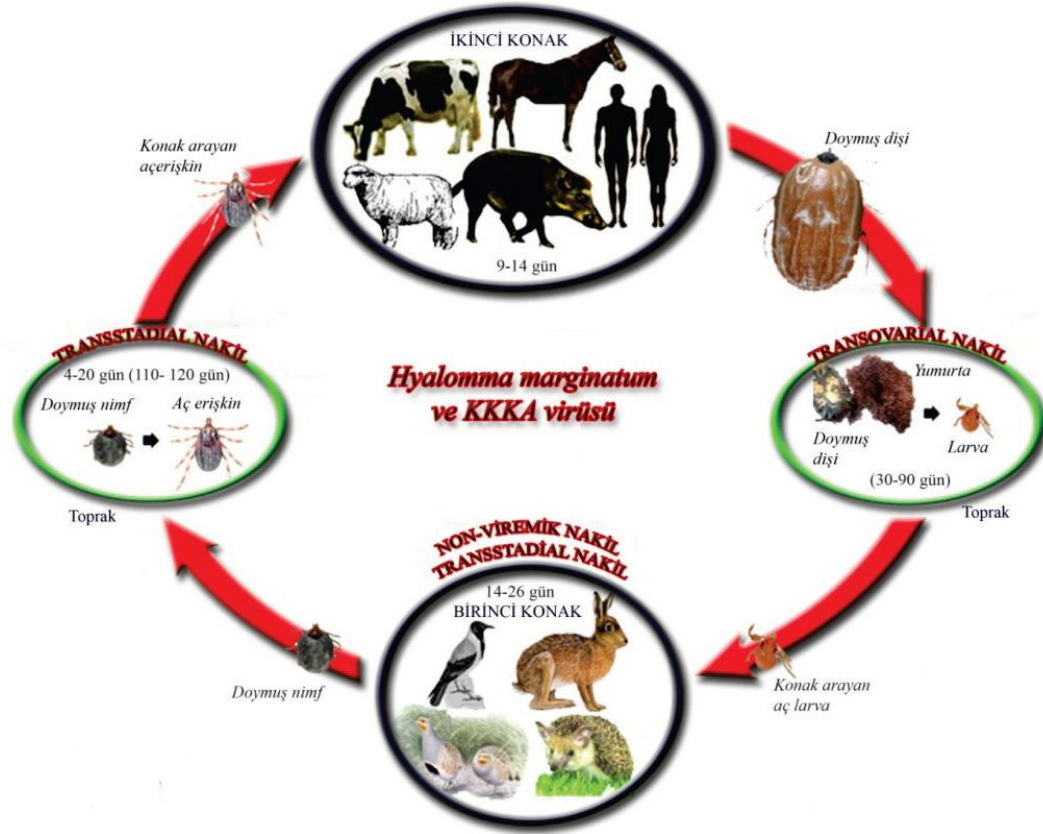
3.5.2. Artropod Vektör Keneler

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü omurgalı hayvanlara, enfekte kenelerin kan emmesi esnasında nakledilmektedir. Kırım'da 1944-1945 yıllarında ortaya çıkan endeminin bulunduğu bölgede, insanların hastalıktan önce kene ile temas ettikleri ve bölgenin kene bakımından yoğun olması şüpheleri üzerine kenelerin virüsü nakletmiş olabileceği düşünülmüştür. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı vektörünün keneler olduğu, Chumakov ve ark. tarafından *Hyalomma marginatum*'un filtre edilmiş süspansiyonların gönüllü insanlara inoküle edildikten sonra hastalık oluşmasıyla anlaşılmıştır (2).

Ixodidae ve *Argasidae* ailesine bağlı, 30'dan fazla kene türünden virüs izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak, bunların tümünün vektör olabilme yeterlilikleri yoktur. Vektörlük, virüs izolasyonun dışında virüsü duyarlı canlıya nakledebilme ve viremik canlılardan alabilme yeteneğine sahip olmasını gerektirmektedir. *Ixodidae* ailesinde yer alan başta *Hyalomma marginatum* olmak üzere *H. anatolicum* ve *H. truncatum* kenelerin, KKKAH virüsünü transtadial, transovarial, veneral ve horizontal (aynı konaktan kan emme esnasında) olarak naklettikleri kanıtlanmıştır (1). Ixodid keneler larva, nimf ve erişkin olmak üzere üç gelişim dönemine sahiptir. Larva ve nimfler tavşan gibi küçük memeliler ve karpileri seçerken erişkin formları sığır, koyun, keçi gibi büyük memeli canlıları tercih ederler (2, 5). Vektör kenelerin dişi erişkin formları, enfekte bir konaktan viremik dönemde kan emdiği sırada etkeni alır ve yumurtalarına transovariyal olarak nakleder. Böylece yeni nesiller, etkenle enfekte olarak gelişmeye başlar. Kenelerin gerçek anlamda vektör olabilmesi için bir gelişme döneminde kan emdiği viremik bir konaktan virüsü alabilmesi (larva→nimf), sonraki gelişme döneminde gömlek değiştirme sırasında etkeni taşıması (nimf→erişkin), duyarlı başka konaklardan kan emerken etkeni transtadiyal olarak aktarabilmesi ve etkeni yumurtalarına (erişkin→yumurta) transovariyal olarak nakledebilmesi gerekmektedir (Şekil 8) (64).

Deneyssel olarak, KKKAH virüsü ile enfekte edilen kenelerin tükürük bezleri, üreme organları ve az da olsa diğer doku ve organlarında virüsün ürediği, titre artışı ile gösterilmiştir. Kene hücre kültürlerinde, *in vitro* olarak yapılan enfeksiyonlarda virüsün titresinde artış olduğu bildirilmiştir. Ancak, memeli hücre

kültürlerinin aksine virüsün hücre ölümlerine neden olmadığı ve virüsü herhangi bir sitopatik etki göstermeden tolere ettiği gözlenmiştir (70).

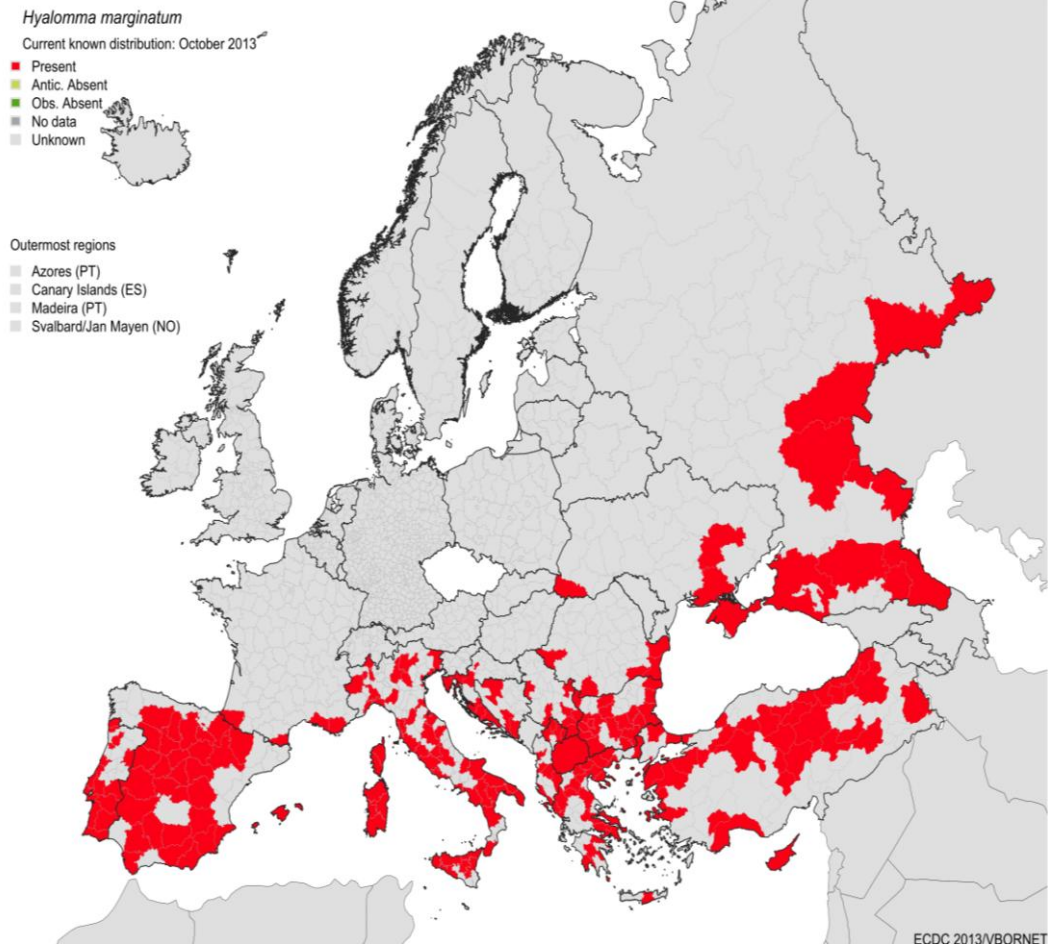


Şekil 8. KKAH virüsünün doğadaki sirkülasyonu (12)

Çok sayıda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, KKAH'nin kenelerin olgunlaşmamış formlarının aktif olduğu bahar ve yaz aylarında ortaya çıktığını göstermiştir. *Hyalomma* türü keneler bozkır, ovalar, yarı çöl alanlar, tarım arazileri, dağ etekleri ve aynı zamanda çayır arazileri, çalılıklar ve ormanlık bitki örtüsü ile zengin nehir havzaları gibi çok çeşitli coğrafik alanlarda bulunabilmektedir. Kış ikliminin yumuşak olması, sonbahar aylarının sıcak olması, yağışların azalması, arazi ekimlerinin değişmesi ve kullanımı, rezervuar

hayvan türlerinin popölasyonlarındaki değışiklikler kenelerin uygun yaşam alanlarının artmasına katkı sağlamaktadır. Özellikle sonbaharın bitiminde yıllık sıcaklık ortalamalarının artması, nimflerin hızlıca erişkin forma dönüşmelerini sağlamakta böylelikle kış aylarını atlatma şansları artmaktadır. Hafif geçen kış mevsimi de kenelerin yaşam oranlarını arttırmakta, kene popölasyonlarının çoğalması ve bölgede yüksek prevalansa ulaşmalarına neden olmaktadır. İklimlerdeki değışiklikler, kenelerin doğrudan yaşam oranlarını, gelişimlerini ve aktivitelerini etkilemektedir. Birçok ülkede, KKKAH vakalarının genel iklimsel ve çevresel şartların değışmesine bağılı olarak geliştiğı bildirilmiştir (1, 11).

Göçmen kuşların ve hayvan hareketlerinin, virüsün geniş coğrafik alanlara yayılmasında potansiyel rollerinin olduğu bilinmektedir. Türkiye’de 2002 yılında ilk kez ortaya çıkan KKKAH vakalarında, Balkanlar’dan göç eden kuşların neden olabileceğı ileri sürölse de ne göçmen kuşlarda ne de bunların taşıdığı kenelerde virüs tespit edildiğine dair bulgular mevcut değildir (1, 19).



Şekil 9. *Hyalomma marginatum* türü kenelerin dünyadaki dağılımı (71)

Türkiye, sıcak iklimlerin ve bitki örtüsünün çeşitliliğinin (otlak alanlar, çayır araziler, orman ve tarımsal alanlar) fazla olduğu bölgelere sahip olması, *Hyalomma* türü keneler için doğal bir ortam oluşturmaktadır ve bu bölgelerde, KKKAH enfeksiyon oranları ile yüksek korelasyon göstermektedir (11).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı; Afrika, Asya, Avrupa'nın güneydoğu bölgesi ve Orta Doğu'da olmak üzere 30'dan fazla ülkede rapor edilmiş olup kene kaynaklı viral enfeksiyonlar içerisinde en büyük coğrafik dağılıma sahiptir (Şekil 9). İlginç bir şekilde tek bir serolojik bulgudan yıllar sonra, 2002 yılında Türkiye'de ilk kez Doğu Karadeniz Bölgesi'nde hastalık

ortaya çıkmıştır (2). Türkiye’de KKKAH virüs izolasyonu ise ilk kez Özdarendeli ve ark. tarafından Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi’nde yatmakta olan KKKAH teşhisi konulan bir hastanın kanından yapılmıştır (27).

3.5.3. Bulaş Yolları ve Risk Grupları

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü insanlara, sıklıkla enfekte kenelerin ısırmasıyla bulaşır. Aynı zamanda enfekte kenenin çıplak elle ezilmesi, akut enfekte fazdaki hastalarla temas ya da viremik çiftlik hayvanlarıyla temas sonrası enfeksiyonun olduğu bildirilmiştir (1, 2).

Endemik bölgelerde, tarım ve hayvancılıkla uğraşan insanlar kenelerin tesadüfî konakları konumundadır. Bu grupta yer alanların büyük çoğunluğunu tarım çalışanları, hayvan sahipleri ve çobanlar, kesimhane çalışanları ile veteriner hekimler oluşturmaktadır. Bu gruptaki çalışanlar aynı zamanda risk altındaki gruplar sınıfında değerlendirilmektedir (1, 2). Bunlara ilaveten endemik bölgelerde kamp, piknik, yürüyüş ve avcılık yapan kişiler de risk altında bulunmaktadır. Türkiye’deki endemik vakaların %90 gibi büyük bir bölümünü çiftçiler oluşturmaktadır (1).

Endemik bölgelerde yaşayanlar dışında, hastane ve sağlık çalışanları da ikincil yüksek risk grubunu oluşturmaktadır. Özellikle KKKAH virüsü ile enfekte hastaların hospitalize edildiği hastanelerden çok sayıda nozokomiyal bulaş vakaları bildirilmiştir (2). Bunların başında %33’lük oranla akut enfekte bireye ait iğnenin kazayla sağlık çalışanına batması, %8.7’lik oranla da enfekte hastanın kanıyla olan temaslarla KKKAH geliştiği rapor edilmiştir. Ayrıca enfekte hastaya yapılan cerrahi müdahaleler ve otopsi sırasında oluşan yaralanmalarla enfeksiyon

oluştugu bildirilmiştir. Viral materyal ile çalışan laboratuvar personellerinde dahi enfeksiyon meydana geldiği Afrika’da birkaç kez rapor edilmiştir (1, 2, 18).

Hava yolu ile bulaş olabileceğinden şüphe edilse de henüz kanıtlanmamıştır (1).

3.5.4. Deneysel Hayvan Modelleri

Patogenez, konakçı immünitesi ve *in vivo* viral replikasyon çalışmalarında, hayvan modelleri çok önemli araçlardır. Hayvan deneyleri, anti-viral ilaç ve aşı çalışmalarının geliştirilmesinde bilimsel temelleri oluşturmaktadır. Hayvan modellerine genel olarak etik ya da pratik olmayan sebeplerden dolayı, doğrudan hedef canlı üzerinde çalışılamadığında ihtiyaç duyulmaktadır. Kanada Ulusal Araştırma Konseyi (NRC) 1985 yılında hazırladığı raporda, hayvan modelleri; analog uygunluğu, bilgi aktarılabilirliği, genetik benzerlik, biyolojik özelliklerin bilinirliği, sonuçların genele uygulanabilirliği, deneysel uygulamaların kolaylığı, ekolojik özellikler ve etiksel özellikleri bakımından dikkate alınarak seçilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (72).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü ilk izole edildiğinden itibaren çok sayıda evcil ve laboratuvar hayvanları üzerinde potansiyel hayvan model çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan deney hayvanlarında, çok az ya da hiç viremi görülmezken yüksek oranda nötralizan antikor seviyelerine rastlandığı ancak, klinik semptomlar oluşmadığı bildirilmiştir. Çoğu kanamalı ateş hastalıklarının aksine, primatlarda dahi KKKAH enfeksiyonu gelişmemektedir. Yavru fare modellerinde yapılan deneysel çalışmalarda, kan ve karaciğerde yüksek miktarda virüs titresini belirlenebilmiştir. Aynı zamanda sistemik viral

saçılma ve makrofaj hücrelerinde enfeksiyon oluştuğu bildirilse de dalaktan virüs izolasyonu yapılamamıştır. Enfeksiyon, sadece insanlarda kanamalı ateş gibi klinik belirtiler göstermekte, diğer konakçılarda sadece geçici bir viremi oluşmakta ve semptomlar genellikle gizli ya da hafif seyretmektedir. Bu yüzden hastalığın patogenezi, profilaksi, tedavi ve aşı çalışmalarında kullanılmak üzere bilinen bir hayvan modeli mevcut değildir (8).

İnsan interferonlarının (IFN) bunyavirüslere karşı antiviral etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda IFN yanıtın KKKAH virüs replikasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca Tip I (IFN - α, β) ve Tip II (IFN - γ) interferon reseptörleri çıkartılmış fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, interferonların antiviral savunma etkilerinin çok önemli olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda Tip I (IFNAR^{-/-}) hücre yüzey reseptörler ve intrasellüler transkripsiyon sinyal dönüştürücü ve aktivatör (STAT-1) protein çıkartılan (KO) fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, Tip I IFN yanıtının hastalığın belirtilerinin kontrol altına alınmasında önemli olduğu, IFN reseptörleri çıkartılan KO farelerin düşük virüs titrelerine dahi son derece duyarlı oldukları gösterilmiştir. Böylece geliştirilen IFNAR^{-/-} ve STAT-1 KO deneysel hayvan modelleri, KKKAH'nin patogenezi, tedavi ve aşı çalışmalarının aydınlatılmasında yardımcı olması düşünülmektedir (47, 59, 60).

3.6. Klinik ve Laboratuvar Bulguları

Hastalığın inkübasyon periyodu, virüs ile olan temas şekline ve virüs yüküne göre değişmektedir. Enfekte kene tarafından ısırılma vakalarında inkübasyon periyodu 1-3 gün olarak belirlenmiştir. Ancak, 9 güne kadar

uzayabildiği de bildirilmiştir. Enfekte kan ile olan temasta normal inkübasyon periyodu 5-6 gün olabilmekte ancak, 13 güne kadar uzayabilmektedir. Hastalık grip benzeri semptomlarla ortaya çıkmaktadır. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı vakalarının birçoğu, hafif ve spesifik olmayan ateş belirtileri göstermesine rağmen, bazı hastalarda şiddetli kanamalara neden olabilmektedir (1, 2, 3, 47, 73, 74).

Kapillar hasar, KKKAH vakalarında sık görülen bir patolojidir. Bu nedenle hastalığın ilk olarak ortaya çıktığı Sovyetler Birliği'nde "kapillar toksikozis" olarak adlandırılmıştır. Hastalığın ölümle sonuçlanmasından; aşırı kan kaybı, şok, beyin, karaciğer, böbrek hasarı ile kalp ve akciğer gibi çoklu organ yetmezlikleri sorumlu tutulmuştur (2, 3).

Klinik olarak hospitalize edilen ve gözlenen hastalarda, hastalığın seyri; inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelesan olmak üzere dört klinik faza ayrılmıştır.

İnkübasyon periyodu; viral yük ve bulaş yoluna bağlı olarak değişmekle birlikte 3-7 gün arasındadır. Kan yoluyla bulaşlarda, bu süre daha kısa sürebilmektedir. Prehemorejik faz; 1 ile 7 gün arasında olmakla birlikte ortalama 3 gün sürmektedir. Hastalık 39-41°C'ye kadar yükselen ani ateş, baş ve kas ağrısı ile birlikte görülen halsizlik ile karakterizedir. Ateş ortalama 4-5 gün kadar sürer, bazı durumlarda diyare, mide bulantısı ve kusma görülebilmektedir. Yüz, boyun ve göğüste hiperemiler, skleralarda hemoraji görüldüğü bildirilmiştir. Hemorajik faz; 2-3 gün gibi kısa sürmektedir. Genellikle hastalığın 3. ile 5. günleri arasında hızla gelişmektedir. Deride gelişen kanamalarda elementer lezyonlar, peteşi ile yaygın hematomlar arasında değişmektedir. Kanamalar mukoz membranlarda

görülmektedir. Kanamalara en sık; burun, gastrointestinal, üriner ve solunum sisteminde rastlanmaktadır. Karaciğer ve dalakta büyüme olduğu da bazı vakalarda bildirilmiştir. Konvelasan faz; hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasından 10-20 gün sonraki dönemde, hayatta kalmayı sürdüren hastalarda görülmektedir. Bu dönemde değişken nabız, taşikardi, bradikardi, düşük kan basıncı gibi belirtilerin olduğu çeşitli vakalar da rapor edilmiştir. Enfeksiyonun yeniden nüks etmesi ya da hastalığın bifazik olduğuna dair hiçbir bilgi yoktur (1, 2, 3, 47, 75).

Hastalığın laboratuvar bulguları arasında, kan biyokimyası ve tam kan sayımında; hastalığın ilk haftasında gelişen trombositopeni, lökopeni, fatal vakalarda trombosit sayısında ise ileri derecede azalma olabilmektedir. Hastalığın şiddetli seyrettiği vakalarda, hemoglobin seviyesi de düşüktür. Aynı zamanda; pıhtılaşma bozuklukların gelişmesi, protrombin zamanının (PT) ve aktive kısmi tromboplastin (aPTT) zamanlarında uzama, fibrin yıkım ürünleri ve D-dimerlerin artışı, fibrinojen miktarında azalma meydana gelmektedir. Bu durum DIC'in oluştuğunun göstergesidir. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte serumda; ALT, AST, LDH enzim seviyelerinde artışlar meydana gelmektedir. Hipotansif hastalarda görülen kan üre nitrojen (BUN) ve kreatin fosfokinaz (CPK) seviyelerindeki artışlar böbrek yetmezliğinin ölçülmesine yardımcı olmaktadır. Tam kan sayımı ve kan biyokimyası test sonuçları, yaşamaya devam eden hastalarda 5 - 9 gün arasında normal seviyelere dönmektedir (1, 3, 47, 75). Ayrıca yapılan bir klinik laboratuvar çalışmasında, IL-6 ve TNF- α seviyelerinin ölümcül vakalarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (61).

3.7. Teşhis Yöntemleri

Erken teşhis, hem tedavi başarısı hem de hastalığın bulaşın önlenmesi açısından çok önemlidir. Ani başlayan ateş, halsizlik gibi grip benzeri klinik semptomlar ve hastanın öyküsü (özellikle de endemik bölgede bulunması), kene ısırması ya da enfekte kan, doku ya da hasta bireyle teması KKKAH için şüphelenilmesi gereken durumlardır. Klinik bulgulara ilaveten, hastalığın biyokimyasal-hematolojik sonuçlarla birlikte değerlendirilmesi gerekir. Hastalığın aynı zamanda bakteriyel, viral, paraziter hastalıklar ve nonenfeksiyöz patolojiler yönünden ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Ayırıcı tanıda dikkat edilmesi gerekli hastalıklardan bazıları riketsiyoz, leptospiroz, boreliyo, meningokokkal enfeksiyonlar, hantavirüs, malariya, sarıhumma, Dengue humması, Omsk kanamalı hastalığı, Lassa ateşi, Ebola, Marburg gibi kanamalı ve ateşli hastalıklardır. Bu konularda özellikle nozokomiyal bulaş açısından sağlık personelinin bilgilendirilmesi, gerekli önlemlerin alınması ve hastanın izole edilmesi gerekmektedir. Hastalığın kesin tanısı için virüs izolasyonu yanında, moleküler ve serolojik metotlar kullanılmaktadır (1).

3.7.1. Biyokimyasal Testler

Trombositopeni, enfeksiyonun değişmez bulgusudur. Hastalarda lökopeni, AST, ALT, LDH ve CPK seviyelerinde artış meydana gelmektedir. Hemostaz testlerinde ise PT, aPTT zamanı uzamıştır. Bazı vakalarda, fibrinojen düzeyi düşmekte ve fibrin yıkım ürünleri artmaktadır (1).

3.7.2. Virüs İzolasyonu

KKKAH virüsün izolasyonu ve kùltivasyonu yüksek biyogùvenlik şartlarını sağlayan laboratuvarlar gerektirmektedir (1).

Virüs izolasyonu, hastalığın ilk 2-7 günleri arasındaki viremik akut fazdaki hasta serumu, doku ya da endemik bölgelerden toplanan kene süspansiyonlarının, 1-2 günlük yavru fare beyinlerine intrakraniyal (i.k.) ya da intraperitoneal (i.p.) yolla inoküle edilmesiyle yapılmaktadır. Virüs izolasyonu aynı zamanda Vero, SW-13, BHK-21, LLC-MK2 gibi hücre hatları kullanılarak da yapılmaktadır. Hücre kùltür izolasyonları fare beyinlerinden yapılan izolasyonlara göre daha hızlı ve kolay ancak, duyarlılığı daha düşüktür ve yüksek virüs konsantrasyonu gerektirmektedir. Virüs izolasyonu, inokulasyondan sonraki 2 ile 5. günlerde yapılabilmektedir. Hücre kùltürlerinde, virüs suşuna ve hücre hattına bağlı olarak bir sitopatik etki görülebileceği gibi hiçbir sitopatik etki de görülmeyebilir. Bu yüzden immünofloresan (IFA) ve bu tez çalışması kapsamında geliştirilen psödo-plak testi gibi monoklonal ya da poliklonal serumların kullanıldığı immünokimyasal testlerle hücre kùltürlerinde, virüs teşhisi ve virüs titresinin belirlenmesi yapılabilmektedir (1, 2, 7).

3.7.3. Moleküler Teknikler

Tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), hızlı olması açısından KKKAH virüsün laboratuvar teşhisi için en sık kullanılan yöntemdir. RT-PCR son derece özgöl, duyarlı ve hızlıdır. RT-PCR doğrudan virüsün genetik materyalini tespit etmesi ve buna uygun olarak dizayn edilebilir olması, virüsün kùltivasyonuna gerek duymaması ve yüksek güvenliklı laboratuvar şartları

gerektirmemesi açısından son derece kolay ve güvenle uygulanabilir bir yöntemdir. Hastalığın ilk haftasından sonra serumda enfektif virüs miktarı azalmasına karşın viral RNA 16. güne kadar RT-PCR ile belirlenebilmektedir. Bu yönüyle enfektif virüsü belirlemeye yönelik testlere göre daha avantajlı olmaktadır. Ayrıca epidemiyolojik araştırmalar için sahadan toplanan kene örneklerinden de viral nükleik asit doğrudan belirlenebilmektedir. Bir diğer avantajı da elde edilen kopya DNA (cDNA)'lar ile virüsün genetik olarak sekanslanması ve filogenetik analizlerde kullanılabilmesidir (1, 2, 75, 76).

Klasik RT-PCR testinin daha gelişmiş olanı ve kantitatif değer veren otomatize real-time PCR testi; kontaminasyon oranını azaltması, daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmasından dolayı virüs suşları arasındaki varyasyonları belirleyebilmesi, dakikalar içerisinde sonuçlanması, viral nükleik asit hakkında kantitatif olarak bilgi vermesi ve monitörize edilebilmesi yönüyle daha fazla avantaja sahiptir (1, 2, 76, 77, 78).

3.7.4. Serolojik Metotlar

Hastalık belirtileri ortaya çıktıktan 7 gün sonrasında, spesifik IgM ve kısa süre sonra da IgG antikorlar ELISA ve IFA testleri ile belirlenebilmektedir. Akut bir enfeksiyon, çift örnekli serumda 4 kat titre artışı veya tek bir örnekte IgM antikorlarının saptanması ile tanımlanır. Enfeksiyondan 4 ay sonra, spesifik IgM belirlenebilir düzeyin altına düşerken IgG en az 5 yıla kadar belirlenebilir düzeyde kalmaktadır. ELISA testleri, IFA testlerine göre oldukça duyarlı ve daha hassastır. Ölümcül vakalarda antikor yanıt nadiren belirlenebilmektedir. Hastalık genellikle serum ve karaciğer biyopsi örneklerinden yapılan virüs izolasyonları ile

doğrulanmaktadır. Hastalığın akut fazında, serum örneklerinden ve şüpheli kene homojenatlarından yapılan antijen ELISA ve IFA testleri ile viral antijenler belirlenerek de enfeksiyon teşhis edilebilmektedir. Bunların yanında ters pasif hemaglutinasyon testi (RPHA) ile hastalığın 1 ile 5. günleri arasında serum örneklerinden, kene homojenatlarından, hücre kültürü ve yavru fare beyinlerinden hızlı bir şekilde antijen tespit edilmiştir. Ancak, bazı karşılaştırma çalışmalarında RPHA'nın ELISA'ya göre daha düşük, komplement fiksasyon (CF), immünodifüzyon (ID) ve IFA'ya göre daha yüksek hassasiyette olduğu bildirilmiştir (1, 2, 47, 79). Son zamanlarda rekombinant KKKAH virüs nükleoprotein (rNP) ve monoklonal antikorlar kullanılarak geliştirilen ELISA ve IFA testleri ile enfekte hasta serumundan hastalığın erken dönemlerinde, antikor tespiti ile teşhis yapılabilmektedir (80, 81, 82, 83). Ayrıca flöresan redüksiyon nötralizasyon (FRNT) ve son zamanlarda geliştirilen psödo-plak redüksiyon nötralizasyon testleri (PPRNT) ile serumdaki koruyucu antikor yanıt titresi ölçülerek hastalığı atlatan bireyler teşhis edilebilmektedir (84).

3.8. Tedavi Amaçlı Uygulamalar

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığının bilinen spesifik bir tedavisi yoktur. Hastalığın tedavisinde uygulanan güncel yaklaşımlar; destekleyici tedaviler, ribavirin uygulaması, antikor tedavileri ve diğer antiviral tedavi seçenekleri ile sınırlı kalmaktadır (8, 47).

3.8.1. Destekleyici Tedaviler

Destekleyici tedavi, vaka yönetiminin çok önemli bir parçasıdır. Bunlar arasında; trombosit, taze donmuş plazma ve eritrosit süspansiyon transfüzyonları yer almaktadır. Kan ürünleri ile yapılan bu tür replasman tedavileri, hastanın tam kan sayımı günde bir veya iki kez kontrol edilerek yapılmalı, aksi halde pulmoner ödem gelişmesine neden olabilmektedir. Potansiyel kanama odaklarının olabileceği düşünülmeli ve peptik ülserli hastalar için histamin reseptör blokörleri verilmeli, kas içi enjeksiyonlardan ve koagülasyon sistem üzerine etkileri olan aspirin gibi ilaçların kullanımından kaçınılmalıdır. Ayrıca nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar da kullanılmamalıdır. Hastanın, sıvı ve elektrolit dengesi sürekli kontrol edilmelidir. Trombosit desteği ile trombositopeni ve trombosit fonksiyon bozuklukların neden olduğu kanamalar önlenebilmekte veya kontrol altına alınabilmektedir. Taze donmuş plazma infüzyonu ise koagülasyon faktör bozuklukların, PT ve aPTT'nin normale dönmesine yardımcı olmaktadır (1, 8, 85).

3.8.2. Ribavirin Uygulaması

Ribavirin sentetik pürin nükleozit analogudur ve çok sayıda RNA ve DNA virüslerin replikasyonunu engellediği *in vitro* olarak gösterilmiştir (8, 86). Ribavirinin, KKKAH'deki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hepatit C virüs (HCV), respiratuvar sinsitiyal virüs (RSV) ve son zamanlarda Lassa ateşi gibi viral hastalıkların tedavisinin kullanımında lisanslanmıştır. Ribavirinin oral, intravenoz ve özellikle RSV enfeksiyonlarında kullanım için geliştirilen aerosol formları bulunmaktadır. Bazı viral hastalıklarda yapılan çalışmalarda, ribavirinin

antiviral etkisini; (i) viral guanililtransferaz ve viral metiltransferaz gibi enzimler tarafından gerçekleştirilen viral şapka çalma mekanizmasını, (ii) RNA-bağımlı RNA polimeraz aktivitesini ve (iii) viral helikaz aktivitesini engelleyerek gerçekleştirdiği desteklenmektedir (87, 88, 89, 90, 91).

Yavru farelerde yapılan deneysel bir çalışmada, ribavirin tedavisinin KKKAH'nin mortalitesini düşürdüğü ve ortalama ölüm sürelerini uzattığı gözlenmiştir (8, 92, 93). Ayrıca Bente ve ark., STAT-1 KO fareler kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ribavirinin enfeksiyondan koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir (60). Randomize klinik çalışmaların insanlar üzerinde yapılması etik olmadığı için ribavirinin etkisi ancak, gözlemsel çalışmalarla tanımlanmıştır (1, 92).

Koksal ve ark., yaptıkları bir çalışmada, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi (RSHM) tarafından KKKAH teşhisi konulan 136 hastayı, randomize olarak iki gruba ayırmışlardır; 64 hastaya hastalığın erken döneminde başlanarak 10 gün boyunca oral ribavirin ve destekleyici tedavi uygulanırken 72 hastaya sadece destekleyici tedavi uygulamışlardır. Çalışma sonucuna göre iki grup arasında hastalığın inkübasyon periyodu, klinik belirtiler ve laboratuvar bulguları, hasta yatış süreleri, platelet infüzyon ihtiyaçları, platelet seviyelerinin normale dönmesinde geçen süreler arasında istatistiki olarak fark görülmemiştir. Bu sonuçlara göre ribavirin tedavisinin, KKKAH tedavisinde önemli bir katkısının bulunmadığı ileri sürülmüştür. Bununla birlikte ribavirinin etkisi hala tartışmalıdır (94).

Hafif seyreden vakalarda ribavirin kullanılması tavsiye edilmemektedir. Ancak, şiddetli vakaların tedavisinde kullanımı önerilmemektedir. Hastalığın

şiddeti Swanepoel kriterlerine göre tanımlanmıştır ve şiddetli vaka tanımı hastalığın ilk beş gününde; beyaz kan hücre sayımı $\geq 10.000/\text{mm}^3$, platelet sayımı $\leq 20.000/\text{mm}^3$, AST seviyesi ≥ 200 U/L, ALT seviyesi ≥ 150 U/L, aPTT ≥ 60 saniye, fibrinojen seviyesi ≤ 110 mg/dL olduğu vakalardır (95, 96). Ribavirinin KKKAH’de hem oral hem de intravenöz kullanımının etkili olduğunu destekleyen birçok çalışma olmasının yanı sıra, ribavirin hastalığın erken dönemlerinde etkili olurken, kanamalar başladıktan sonra etkisi olmadığı da ileri sürülmektedir. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı virüsü ile enfekte bireylerde yapılan ribavirin uygulamalarında ilaca bağlı herhangi bir yan etki görülmediği ancak, gebe kadınlarda teratojenik etkisinden dolayı kontraendike olduğu bildirilmiştir (1).

3.8.3. Antikor Tedavileri

Kırım-Kongo kanamalı hastalığından iyileşen insanlardan elde edilen serumlar, hasta bireylere pasif transfer edilerek hastalık tedavi edilmeye çalışılmıştır. Serum ile tedavi uygulamaları ilk olarak Chumakov tarafından 1944-1945 yıllarında görülen vakalarda kullanılmıştır ve az da olsa faydalı olduğu bildirilmiştir. Sonraki yıllarda intramusküler kullanım için “CCHF-bulin” ve intravenöz kullanım için “CCHF-venin” olmak üzere iki farklı immünoglobulin geliştirilerek Bulgaristan’daki vakalarda denenmiştir. Bu şekilde yapılan tedavi uygulamalarında, hastaların daha hızlı iyileştikleri bildirilmiş ancak, kontrol grupları oluşturulmamıştır. Kubar ve ark. tarafından, Türkiye’de hastalıktan iyileşen insanlardan elde edilen hiperimmün serumlar ile şiddetli vakalarda yapılan tedavi uygulamalarında, serum tedavisinin umut verici olduğunu

bildirmişlerdir. Ancak, bu çalışmada kontrol grubu oluşturulmamıştır (8, 47, 92, 97).

Berlotti-Ciarlet *ve ark.*, KKKAH virüsün Gn ve Gc glikoproteinlere karşı ürettikleri monoklonal antikorlar (MAbs) ile *in vitro* ve *in vivo* koruma denemeleri yapmışlardır. SW-13 hücre hattı kullanarak yaptıkları nötralizasyon testinde, anti-Gc MAbs nötralizan etkiye sahipken anti-Gn MAbs'ın nötralizan etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Ancak, yavru farelerde *in vivo* olarak yaptıkları pasif immünizasyon denemelerinde anti-Gc MAbs'ın fareleri öldürücü dozdan koruyamadığı, anti-Gn MAbs'ın ise koruduğu görülmüştür. Bu sonuç, nötralizasyonun sadece antikor özelliğine bağlı olmadığını aynı zamanda konakçı hücre faktörlerine ve antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksite ile ilişkili olmasıyla açıklanmıştır (98).

3.8.4. Diğer Antiviral Uygulamalar

Birçok viral enfeksiyona karşı, hücreler tarafından Tip I IFN'ler ve interferon stimüle eden genler (ISGs) aktive edilerek innate immün yanıt uyarılmaktadır (99). Tip I hücre yüzey reseptörleri çıkartılan farelerin (IFNAR^{-/-}) KKKAH enfeksiyonlarına duyarlı oldukları ve virüsün Tip I IFN duyarlı virüsler arasında yer aldığı bilinmektedir. İnterferonların KKKAH enfeksiyonlarına karşı etkisinin incelendiği *in vitro* bir çalışmada, Tip I IFN'lerin virüs replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. İnterferonları tedavide kullanılmasında, hasta bireylerde enflamatuvar yanıtı tetikleyebileceği ve hastalığın klinik etkilerini azaltılabileceği düşünülmektedir ancak, *in vivo* olarak daha detaylı incelemelere ihtiyaç duyulmaktadır (47, 59, 100).

Andersson ve ark., tarafından yapılan bir diğerk çalışmada, interferonlar tarafından uyarılan insan Mx proteinin, KKKAH virüsü ile enfekte hücrelerde, virüsün NP proteini ile interakseyona girerek viral replikasyonu inhibe ettiğı gösterilmiştir (101). Tip I IFN'ler tarafından uyarılan ISG20, proteinkinaz R (PKR) gibi farklı proteinlerin de virüsün replikasyonunu engellediğı *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (102).

3.9. Koruma ve Kontrol

3.9.1. Aşılama

Viral hastalıklara karşı korunmada, aşılama çok önemlidir. Ancak, KKKAH'ye karşı geliştirilen güvenilir ve FDA tarafından onaylanmış bir aşı mevcut değildir. Şimdilik kullanımı sınırlı tek aşı sadece Bulgaristan'da üretilmektedir (8).

S. Vassilenko, 1968 yılında iki hastadan yavru fare beyinlerine enjeksiyon yaparak KKKAH virüsü izole etmiştir. Fare beyinlerinde üretilerek kloroform ve 58 °C'de inaktive edilen virüs, alüminyum hidroksit içerisinde adsorbe edilerek hazırlanmıştır. 1970 yılında Sovyetler Birliğı'nde geliştirilen KKKAH aşısı, binlerce insanda denendikten sonra test edilen serumlarda, tekrar doz aşılama yapıldığında bile düşük seviyede nötralizan antikor olduğı belirlenmiş ancak, koruyucu etkinliğı değerlendirilmemiştir. 1974 yılından itibaren benzer bir aşı özellikle askeri ve sağık personelleri, çiftçiler ve Bulgaristan'daki endemik bölgelerde yaşayan insanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Aşının koruyucu etkinliğı, 21 yıllık aşılama sonrası ve aşılamadan öncesine göre değerlendirilerek yapılmış ve dört kata kadar vaka sayısında azalma olduğı bildirilmiştir. Ancak,

aşılanan insanlar, bireysel olarak gözlenmemiştir. Geçen bu süreç içerisinde KKKAH virüsün ekolojik ve epidemiyolojik şartlarının değişmesi, insanların koruyucu önlemler almaları ve daha dikkatli olmaları da bu azalışta etkili olmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Bulgar aşısının hem hücresel hem de humoral immün yanıtı KKKAH'ye karşı uyardığı ancak, dört kez aşılanan kişilerde dahi nötralizan antikor yanıtın düşük olduğu bildirilmiştir (11, 92, 103, 104, 105).

K. Spick ve ark., Rift Vadisi humması virüsü (RVFV) ve KKKAH için M segment DNA aşılı dizayn ederek her bir DNA aşısını tek başlarına ve Hantaan virüs (HTNV) ile kene ensefalit virüsü (TBEV) için dizayn ettikleri DNA aşılı ile birlikte multivalent olarak BALB/c fareler üzerinde test etmişlerdir. Kırım-Kongo kanamalı hastalığına karşı dizayn edilen DNA aşısının çok zayıf nötralizan antikor yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (106).

Ghiasi ve ark., yaptıkları bir çalışmada virüs Gn ve Gc glikoprotein genlerini, tütün bitkisine klonlayarak stabil glikoprotein üreten transjenik bitkiler üretmeyi başarmışlardır. Elde ettikleri transjenik bitki yaprak ve kökleri ile BALB/c fareleri besleyerek oral immünizasyon sağlamaya çalışmışlardır. Sadece transjenik bitki ile besledikleri farelerde, Gn ve Gc'ye karşı 1:256 oranında bir IgG titre artışı olduğunu, beslemenin yanı sıra bitkilerden purifiye ettikleri Gn ve Gc proteinler ile enjeksiyon yaptıkları grupta 1:32000 oranında daha yüksek bir IgG yanıt oluştuğunu bildirmişlerdir. Deney hayvan modeli ve gelişmiş laboratuvar olmadığı için koruyuculuğu test edilememiştir. Çalışma sonuçlarına göre bu şekilde oluşturulan transjenik bitkilerin, endemik ve yüksek riskli

bölgelere dağıtılmasıyla hayvanların immünize edilmeleri, böylece olası KKKAH vakalarının önlenebileceği önerilmiştir (107).

3.9.2. Korunma

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığına karşı korunma ve kontrol tedbirlerinin başında halkın, risk altında bulunan tarım ve sağlık çalışanlarının bilgilendirilmesi gerekmektedir. Enfeksiyonla mücadelede keneler en önemli basamağı oluşturmaktadır. Özellikle endemik bölgelerde yetiştirilen çiftlik hayvanları, kenelere konaklık etmeleri ve enfeksiyonun yayılmasına neden olmalarından dolayı uygun akarisitlerle düzenli olarak ilaçlanmalıdır (3, 12). Bunların yanı sıra, endemik bölgelerde yaşayan ya da bu gibi yerlere seyahat amacıyla gidenlerin, kişisel önlemler alması gerekmektedir. Repellent kullanmaları, koruyucu elbiseler giymeleri, şüpheli hayvanlarla temastan kaçınmaları, doku ve doku sıvılarıyla temas etmemeleri ve vücutlarında sürekli kene kontrolü yapmaları gerekmektedir. Kene ısırmasında kimyasal ajanlar kullanmadan, uygun mekanik yöntemlerle, mümkün olduğunca kısa zamanda kene çıkartılmalı ve en yakın sağlık kuruluşundan bilgi alınmalıdır. Nozokomiyal bulaş riski açısından sağlık çalışanları; eldiven giyme, hastaya ait vücut sıvısı bulaşmış ekipmanlarla dikkatli çalışma ve hastanın izolasyonu gibi standart koruyucu önlemler almalıdır (1, 2, 3, 11).

3.10. Amaç

İlk olarak 12. yüzyılda Tacikistan'da tanımlanan KKKAH, inkübasyon periyodunu takiben idrarda, tükürük, rektumda ve abdominal kavitede kan görülmesi, vücutta yaygın kanamalarla ve yüksek mortaliteyle seyreden zoonotik bir hastalık olarak tarif edilmiştir. Virüsün yüksek derecede patojenitesi nedeniyle bioterorizmde kullanılabileceği nedeniyle Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi (CDC) tarafından kategori C virüsü sınıflandırması yapıldı. Güney Afrika, Rusya, İran, Eski Yugoslavya (Kosova) ve Bulgaristan gibi ülkelerde yüksek mortaliteyle seyreden ciddi salgınlar yaşanmıştır. Hastalığa sebep olan virüsün, yüksek enfektif tabiatı nedeniyle yüksek güvenlikli laboratuvarlarda çalışılma zorunluluğu virüs ile ilgili çalışmaların kısıtlı sayıda kalmasıyla sonuçlanmıştır.

Ülkemizde KKKAH vakaları, 2002 yılından itibaren görülmeye başlandı. 2002 yılındaki toplam 17 vakada ölüm görülmedi. Ertesi yıl vaka sayısı 133'e çıktı ve 6 kişi hastalıktan yaşamını kaybetti. 2004-2006 yılları arasında vaka sayıları ve hastalıktan yaşamını kaybedenlerin sayısı arttı. 2004 yılında 249 vaka, 13 ölüm; 2005 yılında 266 vaka, 13 ölüm; 2006 yılında 438 vaka, 27 ölüm görüldü. 2013 Eylül ayı itibari ile 8000 civarında doğrulanmış vaka ve %5 oranında mortalite rapor edilmiştir. Gerek Sağlık Bakanlığı'nın gerekse Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın hastalığın kontrol altına alınması, yayılmasının önlenmesi ve bölge halkının konuyla ilgili bilinçlendirilmesi çabalarına rağmen KKKAH her geçen yıl vaka ve ölüm sayısı bakımından artışını sürdürmeye devam etti. Daha da önemlisi, hastalığın ilk çıktığı yerler Tokat ve Sivas yörelerini içine alan ve Kelkit Vadisi olarak tanımlanan sınırlı bir bölgedeyken

günümüzde Aydın'dan Erzurum'a, Şanlı Urfa'dan Yozgat'a kadar geniş bir coğrafyaya yayıldı.

Hastalıktan korunmada koruyucu aşılama çok önemli bir yer tutmaktadır. Bununla birlikte, KKKAH'ye karşı FDA tarafından onaylanmış henüz etkili bir aşı yoktur. Sadece fare beyinlerinden üretilerek inaktive edilip hazırlanan anti-KKAKH aşısı Bulgaristan'da Bul-Bio Enfeksiyöz ve Parazitik Hastalıklar Ulusal Merkezi (BulBio-NCIPD Ltd.) tarafından üretilmektedir. Ancak, aşının deneysel olarak virüse karşı koruyucu olduğu belirlenmemiştir. Ayrıca aşının fare beyinlerinden elde edilmesi, insanlarda otoimmün hastalıklar oluşturma riski taşımaktadır ve birçok ülkede kullanımına izin verilmemektedir. Böylece daha güvenli ve etkili aşılardan üretilmesi gerekmektedir.

Yukarıdaki veriler bize, ülkemiz için ciddi bir zoonotik hastalık olan KKKAH'ye karşı, en kısa zamanda en rasyonel çözüm üretecek proje ya da projeler oluşturulması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmanın amacı; spesifik bir tedavisi ve koruyucu aşısı olmayan KKKAH'ye karşı aşı antijeninin hücre kültür sisteminde ve fare beyininde olmak üzere, iki farklı sistemde üretilerek konsantre edilmesi, inaktivasyonu ve pürifikasyonun yapılarak, aşı antijenlerinin elde edilmesidir. Hücre kültür tabanlı aşı ile fare beyininden hazırlanan aşılardan Alum adjuvantı ile adjuvanize edilerek, BALB/c farelerinin 3'er hafta aralıklarla 3 kez intraperitoneal yolla immunize edilerek, oluşacak anti-KKKAHV nötralizan antikorların belirlenmesi ve hangi aşı antijeninin KKKAH'ye karşı koruyucu antikorları daha fazla indüklediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. MATERYAL METOT

4.1. Viral Stokların Hazırlanması

4.1.1. Turkey-Kelkit06 Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Virüs

Suşunun İzolasyonu

4.1.1.1. Materyal

Fare: BALB/c

Enjektör: Hayat, 1 ml 3P 30G 1014

Fetal Bovine Serum (FBS): Sigma, F2442

Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B): Sigma, A5955

DMEM F-12 Ham: Sigma, D8900

Santrifüj: Hettich, Universal 320R

1.5 ml santrifüj tüp: USA Scientific, 1615-5500

-80°C dolap: Nuaire, NU-9483E

Virüs üretme vasatı: %2 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham

Not: Canlı Turkey-Kelkit06 KKKAH virüsü ile ilgili bütün çalışmalar biyogüvenlik seviye 3 laboratuvarında (BSL-3) ve biyogüvenlik kabinlerinde yapılmıştır.

4.1.1.2. Metot

Virüs üretimi amacıyla 2006 yılında Türkiye’de endemik bölge olan Kelkit Vadisi’nde yaşayan bir hastanın kanından izole edilen Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşu kullanıldı (27).

Bu amaçla, 2-3 günlük yavru BALB/c farelere intraserebral yolla 30 µl kan örnekleri enjekte edildi. 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 beyni 1200 µl %2 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham ile homojenize edildi ve -80 °C dondurucuda saklandı.

Fare beyinleri buz kabında çözdürülerek beyin homojenatları +4°C'de 1200 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 1 ml olacak şekilde transfer edildi.

Bu şekilde fare beyinlerinde üç kez virüs pasajı yapılarak elde edilen 3. virüs pasajları -80°C'de ana stok olarak saklandı (27).

4.2. Titrasyon Testi

4.2.1. Psödo-Plak Testi

4.2.1.1. Materyal

24 kuyucuklu pleyt: Costar, 3524

Trypsin-EDTA: Sigma, T4049

DMEM F-12 Ham: Sigma, D8900

FBS: Sigma, F2442

Antibiyotik (Penisilin/streptomisin/amfoterisin B): Sigma, A5955

Karboksi metil selüloz: Sigma, C9481

Benmari: Memmert, SV 1422

Karbondioksitli inkübatör: Nuaire, Class 100

Otoklav: Hirayama, HA-240MIV

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı: Fisher Scientific, 11-300-49SHP

Hücre üretme vasatı: %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham içerisinde hazırlandı.

Overlay vasatı: %2 oranında karboksi metil selüloz, dH₂O içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 300°C ve 500 rpm hızda karıştırılarak çözündürüldü. 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilerek iki kat yoğunlukta hazırlanan DMEM F-12 Ham ile 1:1 oranında %2 FBS ve %1 antibiyotik ilave edilerek homojenize edilerek hazırlandı.

4.2.1.2. Metot

Test yapılmadan bir gün önce, 24 kuyucuklu pleyte Vero E6 hücreleri, Trypsin-EDTA ile kaldırılarak hücre üretme vasatı içerisinde kuyucuk başına 20×10^4 /ml geçildi.

Yedi adet santrifüj tüpü işaretlenerek bütün tüplere sulandırma solüsyonu olarak 0.9 ml DMEM F-12 Ham 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. Dilüsyonlar bu şekilde, log 10 tabanında 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar yapılarak hazırlandı (7).

Bir gün öncesinden hazırlanan, 24 kuyucuklu pleytteki hücre üretme vasatı alındı ve önce hücre kontrolden başlanarak en yüksek sulandırmadan en düşük sulandırmaya doğru %80 monolayer olan hücrelerin üzerlerine, her sulandırım için dörderli olmak üzere ve her bir kuyucuğa 0.2 ml sulandırılmış virüs geçildi. İki kuyucuğa virüs kontrol olarak sulandırılmamış virüsten, iki kuyucuğa da hücre kontrol olarak sadece sulandırım solüsyonundan 0.2 ml geçildi.

Pleyt 37°C’de, %5 CO₂’li inkübatöre konulup 1 saat süreyle ve 15 dk’da bir çalkalanarak adsorbsiyona bağlı ekim yapıldı.

Enfeksiyon sonunda kuyucuklardaki inokülüm atıldı ve 37°C benmaride ısıtılan overlay vasatından her kuyucuğa 1ml eklendi. Pleyt 37°C’de %5 CO₂’li etüvde 5 gün inkübe edildi (7).

4.2.2. Testin Görüntülenmesi

4.2.2.1. Materyal

Sodyum fosfat monobazik (NaH₂PO₄•H₂O): Merck, K91348245 738

Sodyum fosfat dibazik (Na₂HPO₄): Sigma, S0876

%37 Formaldehit: Sigma F8775

Fosfat tampon solüsyonu (PBS): Amresco, E404-200 TABS

Triton X-100: Sigma, T9284

Çalkalayıcı: IKA KS260, 2980300

Yağsız süt tozu: Pınar süt tozu

Tris hidroklorür/Tris-HCl (NH₂C(CH₂OH)₃•HCl): Sigma, T3253

Sodyum klorür (NaCl): Merck, K92033000 546

Polisorbat 20/Tween-20: Merck, S4662084 636

Goat Anti-Mouse β-gal konjugat: Southern Biotech, 1010-06

Magnezyum klorit (MgCl₂): Merck, S4845833 730

N,N-Dimetilformamit (HCON(CH₃)₂): Sigma, D4551

X-Gal (C₁₄H₁₅BrClNO₆): Sigma, B4252

Nitrotetrazolium Blue chloride/NBT (C₄₀H₃₀N₁₀O₆ •2Cl): Sigma, N6876

%10 Nötral tampon formalin solüsyonu:

4 g sodyum fosfat monobazik

6.5 g sodyum fosfat dibazik

100 ml %37'lik formaldehit

dH₂O içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürüldükten sonra pH 6.8'e ayarlanarak 1000 ml'ye tamamlandı.

Permeabilizasyon solüsyonu: %0.1 Triton X-100 içeren PBS.

Bloklama solüsyonu: %5 yağsız süt tozu içeren PBS

TBST solüsyonu:

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

%0.1 Tween-20

dH₂O içerisinde hazırlandı.

Substrat solüsyonu: %99 dimetilformamid içerisinde 50 mg/ml çözdürülen X-Gal ve %70 dimetilformamit içerisinde 83 mg/ml çözdürülen NBT'den 1/300 oranında 5mM MgCl₂ içeren PBS solüsyonuna ilave edildi.

4.2.2.2. Metot

Enfeksiyondan sonraki 4. gün kuyucuklara steril kabinde nötral buffer formalin solüsyonundan 0.5 ml konuldu ve hücreler oda ısısında 20 dk fikse edildi.

İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki solüsyon uzaklaştırıldı ve hücreler 1ml PBS ile yıkandı.

Kuyucuklara permeabilizasyon solüsyonundan 0.5 ml ilave edilip 4 kez 5 dk süreyle oda ısısında 50 rpm hızdaki çalkalayıcıda hücreler permeabilize edildi.

Son permeabilizasyon işleminin ardından kuyucuklar 0.5 ml bloklama solüsyonu ile 30 dk oda ısısında çalkalayıcıda 50 rpm hızda inkübe edilerek bloklandı.

Bloklama işleminden sonra hücreler 1ml PBS ile yıkandı.

KKKAH virüsüne karşı elde edilmiş poliklonal fare serumu TBST 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 dk aralıklarla üç kez TBST ile yıkandıktan sonra 1/1500 oranında TBST içerisinde sulandırılan Goat Anti-Mouse β -gal konjugat ile 1 saat süreyle oda ısısında 50 rpm hızda çalkalayıcıda inkübe edildi.

Hücreler tekrar TBST ile 10 dk aralıklarla üç kez yıkandıktan sonra substrat solüsyonundan 0.2 ml her kuyucuğa ilave edilip 37°C'de inkübatörde 15-30 dk arasında inkübe edildi.

Enfekte hücreler mavi renkte belirginleştikten sonra kuyucuklar, dH₂O ile yıkandı ve çıplak gözle oluşan odaklar sayıldı.

Virüs titresinin hesaplanması için;

$$\text{PPFU/ml} = \frac{\text{sayılan odak ortalaması}}{(\text{inokülüm miktarı}) \times (\text{dilüsyon oranı})}$$

formülü kullanıldı (7).

4.3. Hücre Kültür Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı

Aşısı için Virüs Üretimi

4.3.1. Vero E6 Hücre Kültürü

4.3.1.1. Materyal

Santrifüj: Beckman Coulter, Allegra X-22

DMEM F-12 Ham: Sigma, D8900

FBS: Sigma, F2442

Antibiyotik (Penisilin/Streptomisin/amfoterisin B): Sigma, A5955

Trypsin-EDTA: Sigma, T4049

PBS: Amresco, E404-200 TABS

Hücre üretme vasatı: %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12

Ham

Hücre: Vero E6 (Fırat Üniversitesi (FÜ) Viroloji ABD Hücre kültür stoğu)

12.5 cm² Flask: Falcon, 35018

25 cm² Flask: Corning, 3056

75 cm² Flask: Corning, 430720

175 cm² Flask: Corning, 431079

15 ml Santrifüj Tüp: Usa Sci., 1475-0511

Azot tankı: Taylor-Wharton, LS750

4.3.1.2. Metot

Azot tankından çıkartılan bir adet Vero E6 hücre stoğu 37°C’de benmaride hızlıca çözündürüldükten sonra 15 ml santrifüj tüpünde 9 ml hücre üretme vasatı içerisinde 10 kat dilüe edildi.

1000 rpm'de 5 dk oda ısısında santrifüj edilerek süpernatant döküldü ve hücre peleti 1 ml hücre üretme vasatı süspanse edilerek 5 ml'ye %20 FBS içeren hücre üretme vasatı ile tamamlandı.

Hücre süspansiyonları 12.5 cm² hacmindeki hücre kültür flaskına geçildi ve 37 °C'de, % 5 CO₂ etüvde 6 saat hücrelerin yapışması için bekletildi.

Altı saat sonra hücre üretme vasatı %10 FBS içeren yeni vasat ortamı ile değiştirildi ve monolayer oluncaya kadar yaklaşık 5 gün inkübatörde bekletildi.

Monolayer olan hücrelerin vasatı dökülerek hücreler 1 ml Trypsin-EDTA solüsyonu ile yıkandı ve tekrar 1 ml Trypsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek 37°C etüvde, 2-3 dk hücrelerin flask tabanından ayrılması için bekletildi.

Hücreler tek tek hale geldikten sonra hücre üretme vasatı ile süspanse edilerek 10 ml'ye tamamlandı ve 15 ml santrifüj tüpüne transfer edildi.

1000 rpm'de, 5 dk oda ısısında santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve 1 ml hücre üretme vasatı ile hücreler süspanse edildi. 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 25 cm² hücre kültür flaskına pasaj yapıldı.

Flask 37 °C'de, %5 CO₂ etüvde hücreler monolayer olana kadar yaklaşık 5 gün bekletildi.

Bu şekilde hücreler 75 cm² flasklara ve son olarak 175 cm² flasklara pasajlanarak çoğaltıldı.

4.3.2. Vero E6 Hücrelerinde Turkey-Kelkit06 Suşunun Üretilmesi

4.3.2.1. Materyal

Santrifüj: Beckman Coulter, Allegra X-22R

-80°C Derin dondurucu: Nuaire, NU-9483E

DMEM F-12 Ham: Sigma, D8900

FBS: Sigma, F2442

Antibiyotik (Penisilin/Streptomisin/amfoterisin B): Sigma, A5955

Trypsin-EDTA: Sigma, T4049

Hücre üretme vasatı: %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12

Ham

Virüs stoğu: KKKAHV (Turkey-Kelkit06; 3. pasaj)

Virüs üretme Vasatı: %2 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham

Virüs ekim vasatı: %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham

4.3.2.2. Metot

Virüs üretimi için, hücreler %80 monolayer olacak şekilde her 175 cm² flask için 20 ml hücre üretme vasatı içerisinde pasajlanarak çoğaltıldı.

Pasajdan 16 saat sonra titresi 4.8×10^5 PPFU/ml olan Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun 3. pasaj stoğu kullanıldı. Enfeksiyon oranı 0.01 MOI (multiplicity of infection) olacak şekilde 4.8×10^3 titredeki virüs miktarı her flask için 5 ml virüs ekim vasatı içerisinde dilüe edildi ve flasklardaki hücre üretme vasatları dökülerek 5 ml virüs süspansiyonları ile adsorbsiyona bağlı ekim yapıldı.

Flasklar 37°C, %5 CO₂ etüvde 15 dk aralıklarla çalkalanarak 1 saat süreyle inkübe edildi.

Enfeksiyon sonunda, virüs süspansiyonları dökülerek 20 ml virüs üretme vasatı ilave edildi. Tekrar 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edilen flasklar, günlük olarak mikroskop altında incelendi.

Hücrelerin %70'inin parçalandığı 3. günde flasklar -80°C dondurucuya kaldırıldı (108).

4.4. Fare Beyni Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı için Virüs Üretimi

4.4.1. Materyal

Fare: BALB/c

Enjektör: Hayat, 1 ml 3P 30G 10014

Virüs stoğu: KKKAHV (Turkey-Kelkit06; 3. pasaj)

1.5 ml santrifüj tüp: USA Sci., 1615-5500

Virüs üretme vasatı: %2 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham

4.4.2. Metot

Fare beyinde virüs üretimi için farklı tarihlerde doğan 2-3 günlük 60 adet BALB/c yavrularına enjektör ile intraserebral yolla 30 µl 3. pasaj Turkey-Kelkit06 (4.8×10^5 PPFU/ml) KKKAH virüsü enjekte edildi.

Enfeksiyondan sonraki 5. günde servikal dislokasyon ile fareler ötenazi edildi.

Aseptik şartlarda ve uygun şekilde fare beyinleri çıkartılarak buz kabında steril 1.5 ml santrifüj tüplere alındı.

Beyinler eğri uçlu makas yardımıyla 1200 µl virüs üretme vasatı içerisinde homojenize edilerek -80°C'ye kaldırıldı (27).

4.5. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantre Edilmesi

4.5.1. Vero E6 Hücre Kültüründe Üretilen Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantre Edilmesi

4.5.1.1. Materyal

Dinatriumdihydrogenethylenediaminetetraacetat/EDTA(C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈•2 H₂O): Merck, 8421

Sodyum klorit (NaCl): Merck, K92033000 546

%23 (w/v) oranında dH₂O içerisinde manyetik karıştırıcıda çözündürüldü ve otoklavda sterilize edildi.

Polyethylene Glycol 8000/PEG 8000: Promega, V3011

50°C'deki dH₂O içerisinde %50 (w/v) oranında çözündürülerek hazırlandı.

Isıticılı manyetik karıştırıcı: Fisher Scientific, 11-300-49SHP

Soğutmalı santrifüj: Nüve, NF800R

50 ml santrifüj tüp: Falcon, 2070

Ultrasantrifüj: Beckman, Optima L-70K

0.22 µm şırınga filtre: Sartorius, 16534

10X TEN (Tris/EDTA/NaCl) solüsyonu:

0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)

0.01 M EDTA (pH 8.0)

1 M NaCl

dH₂O içerisinde hazırlandı. 1X için 100 ml 10X TEN solüsyonu 900 ml dH₂O ile 1 litreye tamamlanan solüsyon, pH 7.2 - 7.4'e ayarlanarak 0.22 µm filtreden süzülerek filtre edildi.

SW 28 Tüp: Beckman, Polyallomer, 326823

SW 41 Tüp: Beckman, Ultraclear, 344059

4.5.1.2. Metot

-80°C'ye kaldırılan, virüs üretilen hücre flaskları 10'lu flasklar halinde çözdürüldü.

Virüs içeren hücre süspansiyonları, 50 ml santrifüj tüplere alınarak +4°C'de 3000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi.

Süpernatantlar 500 ml cam balon şişelere aktarıldı. Toplam 200 ml olan süpernatant hacminin %15'i kadar %23 NaCl'den 30 ml, 230 ml olan final hacmin ise %10'u kadar PEG8000'den 23 ml yavaşça ilave edildi.

Virüs-PEG karışımı +4°C'de manyetik karıştırıcıda 16 saat süreyle 100 rpm'de karıştırıldı.

SW 28 ultrasantrifüj tüplere 38 ml paylaştırılan virüs-PEG karışımı ultrasantrifüjde +4°C'de 12000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi.

İlk süpernatant dökülerek oluşan peletler her tüp için 500 µl 1X TEN solüsyonu ile çözdürülüp tek tüpte birleştirildi. Tüpler +4°C'de 5500 rpm'de 20 dk süreyle santrifüj edildi.

İkinci süpernatantlar alındı ve SW 41 ultrasantrifüj tüplerinde 12 ml'ye 1X TEN solüsyonu ile tamamlanarak +4°C'de 24000 rpm'de 2 saat süreyle ultrasantrifüj edildi.

Süpernatantlar döküldükten sonra peletlerin üzerine 1 ml TEN solüsyonu ilave edilerek +4°C’de 2 saat süreyle yavaşça çözündürüldü.

Konsantre edilen süpernatantlar sükroz pürifikasyon için kullanılabildi. -20°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Bütün işlemler buz kabında ve steril hava akışlı kabinlerde yapıldı.

4.5.2. Fare Beyninde Üretilen Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı

Turkey-Kelkit06 Suşunun Konsantre Edilmesi

4.5.2.1. Materyal

Santrifüj: Hettich, Universal 320R

Protamin sülfat: Merck, K36409023 701

Sodyum klorit (NaCl): Merck, K92033000 546

%23 (w/v) oranında dH₂O içerisinde manyetik karıştırıcıda çözündürülerek otoklavda sterilize edildi.

Polyethylene Glycol 8000/PEG 8000: Promega, V3011

50°C’deki dH₂O içerisinde %50 (w/v) oranında çözündürülerek hazırlandı.

Isıticılı manyetik karıştırıcı: Fisher Scientific, 11-300-49SHP

Soğutmalı santrifüj: Nüve, NF800R

50 ml santrifüj tüp: Falcon, 2070

Ultrasantrifüj: Beckman, Optima L-70K

0.22 µm şırınga filtre: Sartorius, 16534

10X TEN solüsyonu:

0.1 M Tris-HCl (pH 8.0),

0.01 M EDTA (pH 8.0),

1 M NaCl

dH₂O içerisinde hazırlandı. 1X için 100 ml 10X TEN solüsyonu 900 ml dH₂O ile 1 litreye tamamlanarak pH 7.2-7.4'e ayarlandı ve 0.22 µm filtreden süzülerek filtre edildi.

SW 28 Tüp: Beckman, Polyallomer, 326823

SW 41 Tüp: Beckman, Ultraclear, 344059

4.5.2.2. Metot

-80°C'ye kaldırılan fare beyinleri buz kabında çözdürüldü.

Tüpler +4°C'de 12000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar bir araya getirildi. Cam balon şişeye alınan 72 ml süpernatant hacminin %15'i kadar %23 NaCl'den 10.8 ml, 82.8 ml olan final hacmin %10'u kadar PEG8000'den 8.28 ml yavaşça ilave edildi.

Virüs-PEG karışımı +4°C'de manyetik karıştırıcıda 16 saat süreyle 100 rpm'de karıştırıldı.

SW 28 ultrasantrifüj tüplere 38 ml paylaştırılan virüs-PEG karışımı ultrasantrifüj'de +4°C'de 12000 rpm'de 30 dk süreyle santrifüj edildi.

İlk süpernatant dökülerek ve oluşan peletler her tüp için 500 µl 1X TEN solüsyonu ile çözdürülüp tek tüpte birleştirildi. Tüpler +4°C'de 5500 rpm'de 20 dk süreyle santrifüj edildi.

İkinci süpernatantlar alındı ve konsantre edilen virüse 2 mg/ml oranında protamin sülfat ilave edilerek +4°C'de, buz kabında 2 saat inkübe edildi.

Karışım SW 41 tüpte +4°C’de 17000 rpm hızda 5 dk santrifüj edildi ve oluşan süpernatant pürifiye edilmek üzere -20°C’de kullanılabilecek kadar muhafaza edildi.

4.6. Turkey-Kelkit06 Suşunun Ultrasantrifüj Sükroz Dansite Gradyent Metodu ile Pürifikasyonu

4.6.1. Sükroz Tabakalarının Hazırlanması

4.6.1.1. Materyal

Sükroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$): Sigma, S7903

%20, %30, %40, %50 ve %60 w/w oranlarında sükroz solüsyonları TEN solüsyonu içerisinde çözündürüldükten sonra 0.22 µm’den filtre edilerek hazırlandı.

0.22 µm şırınga filtre: Sartorius, 16534

SW 41 ultrasantrifüj tüp: Beckman, Ultraclear 344059

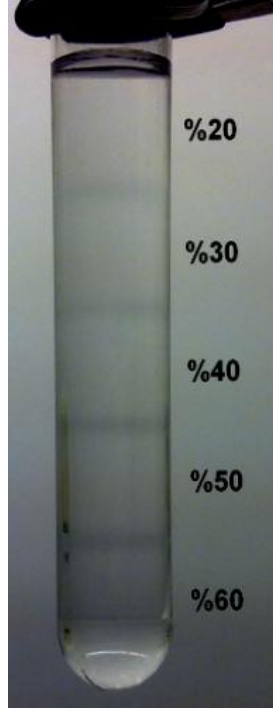
Peristaltik pompa: GE Healthcare, Pump P-1

Ultrasantrifüj: Beckman, Optima L-70K

Gradyent kollektör: GE Healthcare, Frac 920

4.6.1.2. Metot

SW 41 tüplerin en altından başlanarak sırasıyla %60, %50, %40, %30 ve %20 sükroz solüsyonları, 2 ml hacimde üst üste tüpün kenarından yavaşça peristaltik pompa ile 1 rpm hızda ilave edilerek pürifikasyon için sükroz tabakaları hazırlandı ve oda ısısında 3 saat inkübe edildi (Şekil 10).



Şekil 10. Virüs pürifikasyonu için hazırlanan sükröz dansite gradiyentler

Sükröz tabakaların hazırlandığı her bir SW 41 tüpünün en üstündeki %20 sükröz tabakasının üzerine konsantre edilmiş virüsten 1ml yavaşça ilave edildi. Tüpler ultrasantrifüjde 24000 rpm ve +4°C’de 18 saat santrifüj edildi.

Pürifikasyon işlemi peristaltik pompaya bağlı gradiyent kollektör cihazı ile yapıldı. İnfüzyon hortumu peristaltik pompaya takıldı ve hortumun bir ucuna 21 G iğne, diğer ucuna ise 10 cm uzunluğunda iğne takıldı.

10 cm uzunluğundaki iğne SW 41 tüpünün ortasından tüpün en altına ulaşınca kadar gradiyentleri bozmadan yavaşça yerleştirildi. 21 G iğne bulunan uç ise kollektör cihazının kolundaki kendi yerine takıldı.

Kollektörün gövdesinde yer alan tüp tutuculara 1.5 ml santrifüj tüpler yerleştirildi ve peristaltik pompa 3 rpm hızda çalıştırılarak ilk fraksiyonun

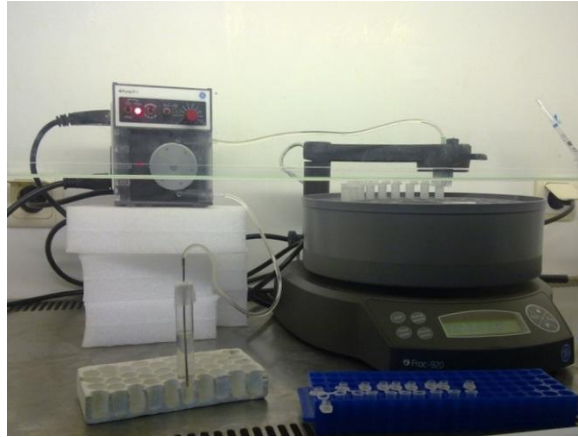
kollektörün ucuna kadar gelmesi beklendi. Daha sonra cihaz 0.5 ml'lik fraksiyonlara ayrılmak üzere programlandı.

Cihaz çalıştırılarak fraksiyonlar işaretli tüplere 0.5 ml olarak ayrıldı (Şekil 11).

Alınan fraksiyonlar Western blot ile test edilene kadar +4°C'de saklandı.

Western blot testinde virüse ait proteinlerin yoğun olarak bulunduğu fraksiyonlar bir araya getirilerek 12 ml'ye TEN solüsyonu ile tamamlandı.

SW 41 tüplerinde 24000 rpm'de 2 saat süreyle +4°C'de ultrasantrifüj yapıldı.



Şekil 11. Fraksiyon kollektör cihazı ile sücrozun fraksiyonlara ayrılması

Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pelete 1 ml TEN solüsyonu ilave edildi ve +4°C'de sadece parmak kuvveti yardımıyla çözünmesine yardım edildi (108).

4.7. Turkey-Kelkit06 Suşunun İnaktivasyonu ve Diyaliz

4.7.1. Materyal

%37 Formaldehit: Sigma F8775

1:40 oranında PBS içerisinde sulandırıldıktan sonra 0.22 µm filtre ile sterilize edildi

Sodyum bisülfat: Merck, S6058956 018

%3.75 oranında PBS içerisinde dilüe edilerek 0.22 µm filtre ile sterilize edildi

20.000 MWCO diyaliz kaseti: Thermo, 66003

PBS: Amresco, E404-200 TABS

1 tablet 1 litre dH₂O içerisinde çözdürüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlandı ve otoklavda steril edildi.

0.22 µm GV Tip Filtre: Millipore, SLGVM33RS

4 ml steril viyal: Greiner bio-one, 127277

Isıticılı manyetik karıştırıcı: Fisher Scientific 11-300-49SHP

4.7.2. Metot

Virüs inaktivasyonu amacıyla 1:40 oranında dilüe edilen %37'lik formaldehitten 1:50 oranında pürifiye virüse ilave edilerek, final konsantrasyonu %0.05 formaldehit kullanıldı.

Karışım 7 gün süreyle oda ısısında inkübe edildi.

Formaldehidin nötralize edilmesi için %3.75 sodyum bisülfattan 1:100 oranında inaktive edilen virüse ilave edildi.

Formaldehit ve sodyum bisülfatın uzaklaştırılması amacıyla karışım diyaliz edildi. Beher içerisine virüs hacminin 500 katı kadar PBS konulup 20.000 MWCO diyaliz kaseti 30 sn kadar PBS ile ıslatıldıktan sonra karışım, diyaliz kaseti içerisine 21 G şırınga yardımıyla aktarıldı.

Kaset, PBS içerisine daldırılıp 100 rpm’de manyetik karıştırıcıda +4°C’de 2 saat aralıklarla iki kez PBS değiştirildi. Behere tekrar PBS ilave edilerek 16 saat +4°C’de diyaliz edildi.

Diyaliz edilen karışım kasetlerden alınıp biraraya getirilerek homojenize edildi ve 0.22 µm şırınga filtre ile steril edilerek kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı (108).

4.8. Turkey-Kelkit06 Suşunun İnaktivasyonunun Psödo-Plak Testi ile Teyit Edilmesi

4.8.1. Materyal

24 kuyucuklu pleyt: Costar, 3524

Virüs ekim vasatı: %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham

PBS: Amresco, E404-200 TABS

Overlay vasatı: %2 oranında karboksi metil selüloz dH₂O içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 300°C ve 500 rpm hızda karıştırılarak çözdürüldü. 121°C’de 15 dk süreyle otoklav edilerek steril edildi. İki kat yoğunlukta hazırlanan DMEM F-12 Ham ile 1:1 oranında % 2 FBS ve %1 antibiyotik ilave edilerek hazırlandı.

4.8.2. Metot

Hem fare beyninden hem de hücre kültüründe üretilen Turkey-Kelkit06 suşunun inaktivasyonun gerçekleştiğini teyit etmek amacıyla 24 kuyucuklu hücre kültürlerine %80 monolayer olacak şekilde Vero E6 hücre geçildi.

İnaktivasyona bırakıldıktan sonra diyaliz edilen Turkey-Kelkit06 suşu antijenleri ile 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar log 10 tabanında 1 ml virüs ekim vasatı ile 3 seri dilüsyon yapıldı.

Dilüe edilmemiş aşı antijeni ve diğer 3 dilüsyon üç replika halinde ve kuyucuk başına 0.2 ml olacak şekilde ekildi.

Negatif kontrol olarak PBS kullanıldı ve aynı şekilde 4 dilüsyon yapılarak iki replika halinde kuyucuklara ekildi.

Virüs kontrol olarak Turkey-Kelkit06 suşunun P_0 virüs stoğundan 10^{-1} 'den 10^{-4} 'e kadar log 10 tabanında ekim vasatı ile 4 seri dilüsyon yapıldı ve tek replika olacak şekilde pleyte ekildi.

Adsorbsiyona bağlı ekim yöntemi ile 1 saat süreyle 37°C 'de 15 dk aralıklarla çalkalanarak inkübe edildi.

İnokülümlar atıldı ve kuyucuklara 1 ml overlay vasatı ilave edildi (7).

Pleyt 37°C 'de %5 CO_2 etüvde 4 gün inkübe edildi.

Enfeksiyonun 4. gününde pleyt, psödo-plak titrasyon görüntüleme testine göre görüntülendi.

4.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforez Hazırlama ve Görüntüleme

4.9.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforez Hazırlanması

4.9.1.1. Materyal

Mini-PROTEAN Tetra Cell: Biorad, 165-8000

Akrilamid (C_3H_5NO): Merck, 800830

Bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$): Promega, V3143

Tris ($(HOCH_2)_3CNH_2$): Merck, K37266187 725

SDS ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$): Biorad, 161-0302

Amonyum persülfat/APS ($(NH_4)_2S_2O_8$): Applichem, A2941,0250

Tetramethylethylenediamine/TEMED($(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$): Merck, M1107320 100

%10 Çözdürme Jeli (10 ml için);

4 ml dH_2O

3.3 ml %30 akrilamid karışımı;

29 g Akrilamid

1 g Bisakrilamid

karıştırılıp $37^\circ C$ benmaride çözdürüldükten sonra 100 ml'ye dH_2O ile tamamlandı ve $0.45 \mu m$ filtreden koyu renkli şişeye süzülerek hazırlandı.

2.5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8)

0.1 ml %10 SDS

0.1 ml %10 amonyum persülfat

0.004 ml TEMED

%5 Yıgınlama Jeli (2 ml için):

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 APS

0.002 ml TEMED

BME (2-Mercaptoethanol): Biorad, 161-0710

Laemli Sample Buffer: Biorad, 161-0737

kullanılmadan önce 950 µl'ye 50 µl BME ilave edildi.

Glisin (C₂H₅NO₂): Merck, K40427490 940

1X Tris/Glisin Yürütme Tamponu:

25 mM Tris,

250 mM Glisin (pH 8.3),

%0.1 (w/v) SDS,

dH₂O ile 1 litreye tamamlanarak çözündürüldü.

Güç kaynağı: Biorad, 164-5052

4.9.1.2. Metot

Mini-PROTEAN Tetra Cell sistem kurulumu yapıldıktan sonra %10'luk her cam pleyt için 10 ml çözündürme jeli hazırlandı ve cam playtler arasından döküldü ve jelin üzerine pipet yardımıyla 1 ml dH₂O ilave edildi. 15 dk oda ısısında bekletildi.

Jelin üzerindeki dH₂O alınarak 2 ml %5'lik yığınlama jel solüsyonu çözdüme jelin üzerine eklendi. Tarak yerleştirilerek oda ısısında polimerize olması için bekletildi.

Jelde yürütülecek örnekler Laemli Sample Buffer ile 1:1 oranında karıştırılıp kaynar suda 5 dk süreyle denatüre edildi ve yükleninceye kadar buz kabında bekletildi.

Önceden hazırlanmış jelin bulunduğu cam pleyt jel yürütme tankına yerleştirildi.

1 litre Tris/Glisin yürütme tamponu cam pleytlerin arasına dolduruldu ve kalanı tankın içine boşaltıldı.

Taraklar çıkartıldıktan sonra örneklerden 30 µl kuyucuklara yüklendi.

Güç kaynağı tanka bağlandı ve 100 voltta 1.5 saat süreyle örnekler yürütüldü (109).

4.9.2. Coomassie Brilliant Blue ile Boyama

4.9.2.1. Materyal

Coomassie Brilliant Blue R-250: Biorad, 161-0436

Methanol (CH₃OH): Sigma, 34885

Glasiyel asetik asit (C₂H₄O₂): Merck, K40973456 014

Boya yıkama solüsyonu:

%40 methanol,

%50 dH₂O,

%10 glasiyel asetik asit

Çalkalayıcı: IKA KS260, 2980300

Jel görüntüleme cihazı: Vilber Lourmat, Quantum, ST41100

4.9.2.2. Metot

Proteinlerin yürütüldüğü jel Coomassie boya solüsyonuna alındı ve oda ısısında 90 rpm hızda çalkalayıcıda 4 saat süreyle boyandı.

Boya döküldü ve boya artıklarını uzaklaştırmak için jel boya yıkama solüsyonu ile 15 dk aralıklarla 3 kez çalkalayıcı üzerinde ve oda ısısında 1 saat süreyle yıkandı.

SDS jel son yıkama solüsyonunda bir gece bırakıldı.

Bantlar belirginleştikten sonra yıkama durduruldu ve dH₂O kabına alınarak jel görüntüleme cihazında fotoğraflandı (109).

4.10. Western Blot

4.10.1. Materyal

Transfer sistemi: Biorad, Mini Transblot, 170-3930

Transfer membran: Millipore, Immobilon-NY+, INYC00010

Transfer tampon :

3.3 g Tris,

14.4 g Glisin,

200 ml Methanol,

800 ml dH₂O karıştırılarak tampon solüsyonu hazırlandı.

Güç kaynağı: Biorad, 164-5052

Isıticılı manyetik karıştırıcı: Fisher Scientific 11-300-49SHP

Çalkalayıcı: IKA KS260, 2980300

Streç film: Fisher Sci, 15-610

Polisorbat 20/ Tween-20: Merck, S4662084 636

PBS: Amresco, E404-200 TABS

PBST-20 Yıkama Solüsyonu:

%0.1 Tween-20 içeren PBS

Bloklama solüsyonu:

%5 yağsız süt tozu içeren PBST-20

Poliklonal tavşan serumu: Viroloji ABD’da KKKAHV’ye karşı üretilen
hiperimmün tavşan serumu (110)

Goat Anti Rabbit HRP Serum: Southern Biotech, 4030-05

Görüntüleme substratı: Thermo Pierce, 32106

Görüntüleme kaseti: Fisher, FBCS 810

Görüntüleme filmi: Sigma, F5763

Görüntüleme solüsyonu: Sigma, P7042

Fiksasyon solüsyonu: Sigma, P7067

Western blot işleminde bütün inkübasyonlar 90 rpm’de çalkalayıcıda ve
oda ısısında yapıldı.

4.10.2. Metot

Proteinler membrana transfer edilmek üzere jelin büyüklüğünde membran
kesilerek aktif olan yüzeyi işaretlendi ve metanol içerisinde aktive edildi.

Transfer tampon içerisinde cam pleytlerden çıkartılan jel, süngerler ve
transfer kâğıtları ıslatıldı.

Transfer tampon içerisinde kasetin üzerine sırasıyla sünger, kurutma
kâğıdı, jel, membran, kurutma kâğıdı ve sünger yerleştirildikten sonra kasetin
kapağı kapatıldı.

Kaset transfer sistem aparatına yerleştirildikten sonra tank transfer tamponu ile dolduruldu ve içerisine buz aküsü ile manyetik karıştırıcı balık yerleştirildi.

Tank manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildikten sonra 100 rpm'de karıştırılmaya başlandı.

Güç kaynağı transfer sisteme bağlandıktan sonra 100 voltta 60 dk süreyle transfer işlemi yapıldı.

Transfer işlemi bittikten sonra membran kasetten alındı ve bloklama solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda 30 dk bloklandı.

Bloklama solüsyonu döküldü ve membran 3 kez 10 dk süreyle PBST-20 solüsyonu ile çalkalayıcıda yıkandı.

Yıkama solüsyonu döküldü ve KKKAH virüsüne karşı oluşturulan poliklonal tavşan serumu, 1/2000 oranında 10 ml bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılıp 1 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edildi.

Primer serum döküldü ve membran 10 dk süreyle 3 kez PBST-20 ile çalkalayıcıda yıkandı.

Konjugat olarak Goat Anti Rabbit HRP serum 1/2000 oranında 10 ml bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılıp membran üzerine döküldü ve oda ısısında 1 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edildi.

Konjugat döküldü ve membran 10 dk arayla 3 kez PBST-20 ile çalkalayıcıda yıkandı.

Membran üzerine görüntüleme substratı 1:1 oranında karıştırılarak yayıldı ve 5 dk süreyle bütün membranın üzerine yayılması sağlandı.

Membran, bu solüsyonlardan çıkartılıp üzerine streç film örtülerek görüntüleme kasetine yerleştirildi.

Karanlık odada, membran üzerine görüntüleme filmi örtüldü ve kasetin kapağı kapatılarak 45 sn bekletildi.

Film kasetten çıkartılıp önce 1 dk süreyle görüntüleme solüsyonunda bekletildi.

Film dH₂O kabında yıkandıktan sonra 1 dk fiksasyon solüsyonunda bekletildi.

Tekrar su kabında yıkandıktan sonra film karanlık odadan çıkartılarak ışık kaynağı üzerinde incelendi (109).

4.11. Lowry Testi

4.11.1. Materyal

10 mg/ml BSA (Sığır serum albümini): Promega, DM2411

Reagent A: Biorad Dc Protein Assay, 500-0113

Reagent B: Biorad Dc Protein Assay, 500-0114

Pleyt okuyucu: Bio Tek, ELx800

96 Kuyucuklu pleyt: Costar, 3585

4.11.2. Metot

Protein miktarlarının ölçülmesinde Lowry testi kullanıldı. Bu amaçla 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1 mg/ml BSA standartları hazırlandı.

96 kuyucuklu mikropleyte standartlar ve ölçülecek örneklerden 5 µl bırakıldı.

Standartlar ve test edilecek örneklere Reagent A'dan 25 µl, Reagent B'den 200 µl eklendi oda ısısında 15 dk inkübe edildi.

Kuyucuklardaki renk değişiklikleri standartlar ile karşılaştırılarak örneklerin protein miktarı kalitatif ve pleyt okuyucuda 650 nm dalga boyunda kantitatif olarak okundu.

Örneklerle standartlar karşılaştırılarak protein miktarları hesaplandı.

4.12. Aşı Gruplarının Oluşturulması, Adjuvanizasyon ve Aşılamalar

Hücre kültür tabanlı ve fare beyninden hazırlanan aşılarda antikor yanıt etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla 4-6 haftalık dişi BALB/c fareleri kullanıldı. Her iki aşı için 5 µg, 10 µg ve 20 µg aşı antijen doz grupları oluşturuldu.

Aşı üzerinde adjuvantın etkinliğinin belirlenmesi amacıyla hücre kültüründen elde edilen pürifiye inaktif aşı 10 µg dozda sabit tutularak alüminyum hidroksit (Thermo, 77161, Imject® Alum), Montanide (SEPPIC, Montanide ISA 720 VG), AS03 (GlaxoSmithKline, AS03 adjuvant emulsion) ile adjuvanize edildi. Deney kontrolü olarak adjuvantsız aşı grubu ve negatif kontrol grubu oluşturuldu.

Bütün gruplar 4-6 haftalık 6 adet dişi BALB/c farelerden oluşturuldu.

4.12.1. Alüminyum Hidroksit ile Adjuvanizasyon

Hazırlanan aşılarda 5 µg, 10 µg ve 20 µg olarak belirlenen dozlarda 200 µl PBS içerisinde sulandırıldı.

50 rpm hızda vortekste, 200 µl aşı bulunan tüplere damla damla 200 µl alüminyum hidroksit (Thermo, 77161, Imject® Alum) adjuvant 1:1 oranında ilave edildi.

Aşılar oda ısısında 30 dk vortekslenerek adjuvanize edildi.

4.12.2. Montanide ile Adjuvanizasyon

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 10 µg hücre kültür tabanlı inaktif aşı 7:3 oranında (280 µl Montanide + 120 µl PBS içerisinde 10 µg inaktif aşı) Montanide ISA 720 VG ile adjuvanize edildi. Adjuvant aşılarda bulunduğu tüplere damla damla ilave edildi. Toplam 400 µl adjuvanize aşı 3-5 dk süreyle oda ısısında vortekslenerek hazırlandı.

4.12.3. AS03 ile Adjuvanizasyon

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 10 µg hücre kültür tabanlı inaktif aşı 1:1 oranında (200 µl AS03 + 200 µl PBS içerisinde 10 µg aşı antijeni) AS03 ile adjuvanize edildi. Toplam 400 µl adjuvanize aşı 10-15 dk süreyle oda ısısında vortekslenerek hazırlandı.

4.12.4. Aşı Kontrol ve Deney Kontrol

Aşı kontrol grubu için 400 µl PBS içerisinde 10 µg hücre kültür tabanlı inaktif aşı 3-5 dk süreyle oda ısısında vortekslenerek hazırlandı.

Deney kontrol grubunun aşılmasında sadece 400 µl PBS kullanıldı.

4.13. İmmünizasyonlar

Adjuvanize edilen aşı doz grupları ve kontrol gruplar 400 µl miktarında insülin enjektörü yardımıyla farelerin abdomenin alt çeyrek bölgesinden 10°'lik açı ile karın içi boşluğa girildiğinden emin olduktan sonra yavaşça aşı enjekte edildi.

İmmünizasyonlar 0, 21 ve 42. günlerde olmak üzere üçer hafta arayla üç kez yapıldı.

4.13.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Kan Serumı Elde Edilmesi

Farelerden anestezi altında kan alındı. Bu amaçla 1/3 oranında %2 rompun (Bayer) ve 2/3 oranında %10 ketamin (Richterpharma) karıştırıldı. Enjektör kullanılarak kas içi yolla 200 µl ile anestezi gerçekleştirildi.

Gözün dış açısına hemotakrit tüp (Drummond Heparinized, 1-000-7500-HC) ile girilerek steril bir tüp içerisine 300-500 µl kan alındı.

Kan örnekleri oda ısısında 30 dk inkübe edildikten sonra 6000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüj edilerek oluşan serumlar steril tüplere alınarak işaretlenip -20°C'de saklandı.

Fareler kuyruklarından halka şeklinde boyanarak işaretlendi ve her bir fare bireysel olarak takip edilerek kaydedildi.

Fareler standart fare kafeslerinde ve 22°C sabit ısıda tutuldu. Farelerin beslenmeleri ad libitum olarak yapıldı.

4.14. İndirekt ELISA

4.14.1. Materyal

ELISA pleyti: Thermo, 473 768

Sodyum karbonat (Na_2CO_3): Merck, A8366892

Sodyum bikarbonat (NaHCO_3): Sigma, S5761

Polisorbat 20/ Tween-20: Merck, S4662084 636

PBS: Amresco, E404-200 TABS

Karbonat solüsyonu:

0.01 M Na_2CO_3

0.05 M NaHCO_3

%0.05 PBST (PBS Tween-20)

dH_2O içerisinde çözündürülerek pH 9.6' ya ayarlandıktan sonra 1L PBS solüsyonu içerisine 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlandı.

Yağsız süt tozu: Pınar Süt Tozu

HRP işaretli anti fare konjugat: Southern Biotech, 1010-05

Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$): Sigma, C0759

Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4): Sigma, S0876

3,3',5,5'-Tetramehtylbenzidine dihydrochloride/TMB: Sigma, T3405

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Sigma, H1009

Sülfirik asit (H_2SO_4): Merck, 100731

Substrat solüsyonu:

4 ml 0.1 M Sitrik asit

6 ml 0.2 M Sodyum fosfat dibazik

dH₂O içerisinde çözdürülerek hazırlandı. Solüsyonun içerisine bir adet TMB tablet ilave edilerek çözdürüldü. Son olarak 100 µl H₂O₂ eklenerek hazırlandı.

Durdurma solüsyonu: 0.2 N sülfirik asit

Pleyt okuyucu: Bio Tek, ELx800

4.14.2. Metot

Hücre kültürlerinde üretilerek elde edilen KKKAH antijeni 96 kuyucuklu ELISA pleytin kuyucuklarına karbonat solüsyonu (pH 9.6) ile her bir kuyucuğa 1µg olacak şekilde +4°C’de 16 saat bağlandı.

Kuyucuklar %0.05 PBST içerisinde %5 süt tozu ile hazırlanan bloklama solusyonu her kuyucuğa 100 µl geçildi ve 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

Kuyucuklar %0.05 PBST ile 1 kez yıkandıktan sonra test edilecek serumlar 1/50’den başlanarak log 2 tabanında bloklama solüsyonu ile sulandırılıp kuyucuklara 100 µl geçildi.

37°C’de 1 saat inkübasyonun sonunda %0.05 PBST ile 5 kez yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 1/5000 oranında sulandırılan HRP işaretli anti fare konjugat ilave edilerek 1 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda pleytler 5 kez %0.05 PBST ile yıkandı ve hazırlanan substrat solüsyonu her bir kuyucuğa 100 µl ilave edildi.

15 dk karanlık ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra durdurma solüsyonu ilave edilerek ELISA pleyt okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu (110).

4.15. Psödo-Plak Redüksiyon Nötralizasyon Testi

4.15.1. Materyal

24 Kuyucuklu pleyt: Costar, 3524

Trypsin-EDTA: Sigma, T4049

DMEM F-12 Ham: Sigma, D8900

FBS: Sigma, F2442

Antibiyotik: Sigma, A5955

Karboksi metil selüloz: Sigma, C9481

Benmari: Memmert SV 1422

Otoklav: Hirayama, HA-240MIV

Isıtıcılı manyetik karıştırıcı: Fisher Scientific, 11-300-49SHP

Hücre üretme vasatı: %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM F-12 Ham içerisinde hazırlandı.

Overlay vasatı: %2 oranında karboksi metil selüloz dH₂O içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 300°C ve 500 rpm hızda karıştırılarak çözündürülür. 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilerek steril edilir. İki kat yoğunlukta hazırlanan DMEM F-12 Ham ile 1:1 oranında %2 FBS ve %1 antibiyotik ilave edilerek homojenize edilerek hazırlandı.

4.15.2. Metot

Nötralizan titrelerin belirlenmesi için 2. immünizasyondan sonraki 2. hafta ve 3. immünizasyondan sonraki 2. haftaya ait serumlar kullanıldı. Negatif kontrol olarak da immünizasyondan önce alınan serumlar kullanıldı.

Serumlar 56°C benmaride 30 dk inaktive edildikten sonra log 4 tabanında 1/10'dan başlanarak 1/640'a kadar sulandırıldı. Sulandırma işlemleri DMEM F-12 Ham ile ve her sulandırmadan çift olmak üzere steril tüpler kullanılarak yapıldı.

Sadece ilk sulandırma tüplerine 106.7 µl diğer tüplere ise 100 µl sulandırma solüsyonu konuldu. İlk tüpe 26.6 µl serum konularak vorteks edildi ve 33.3 µl serum ilk tüpten alınarak ikinci tüpe ilave edildi. Bu şekilde 4 nolu tüpe kadar seri sulandırım işlemi yapılarak son tüpten 33.3 µl atıldı. İlk tüp 1/5 son tüp ise 1/320 sulandırılmış oldu.

Sulandırmalar buz kabına alındı. Nötralizasyon testinde SW-13 hücrelerindeki titresi 1.5×10^5 PPFU/ml olarak belirlenen virüs kullanıldı.

Her tüpte 50 PPFU olacak şekilde virüs sulandırıldı ve her tüpe 100 µl geçilerek tüpler vortekslendi. Böylece bütün tüpler 0.2 ml virüs serum karışımı, ilk tüpte 1/10 son tüpte ise 1/640 sulandırım yapılmış oldu.

Negatif olan immünizasyon öncesi serumlar da aynı şekilde sulandırılıp virüs ilave edildi.

Sulandırmalar +4°C'de 16 saat nötralize edildi. Bir gün önceden 15×10^4 /ml sayıda SW-13 hücre geçilen 24 kuyucuklu pleytlere serum virüs karışımları her kuyucuğa 0.2 ml ve her sulandırmadan 2 adet olacak şekilde geçildi. Bir saat süreyle ve her 10 dk'da bir pleytler çevrilerek inkübe edildi.

Kuyucuklardaki inokülumlar alınarak overlay vasatı ilave edildi.

Testin 4. gününde oluşan nötralizan yanıtı belirlemek için psödo-plak titrasyon görüntüleme testine göre görüntülendi (84).

4.16. İstatistik ve Hesaplamalar

Nötralizasyon titrelerin hesaplanmasında %50 FRNT kullanıldı. Serum sulandırımalarında ve kontrol olarak kullanılan negatif serum sulandırımalarında oluşan plaklar sayıldı ve negatif serum sulandırımalarındaki plakların %50'sine ve daha azına tekabül eden sulandırımlar nötralizan titre olarak hesaplandı.

İndirekt ELISA grafiği oluşturulmasında gruplara ait ELISA titrelerin ortalama değerleri kullanıldı. Nötralizan antikor titre grafiklerin belirlenmesinde gruplara ait nötralizan antikor titrelerin, standart hata ile ortalama değerleri kullanıldı.

İstatistikler ve grafikler GraphPad Prism 5.01 paket programı ile oluşturuldu.

5. BULGULAR

5.1. Psödo-Plak Testi

Fare beyni aşısı ve hücre kültür tabanlı inaktif aşı antijeni üretiminde 3. pasaj Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşu kullanıldı. Bu amaçla virüsün titresinin belirlenmesi için psödo-plak testi yapıldı.

Virüs titresini hesaplanırken sayılabilecek derecedeki en düşük sulandırmalar sayılarak ortalamaları alındı. Şekil 12-A'da Vero E6 hücre kültüründe yapılan psödo-plak testinde pleytte sayılabilecek en düşük dilüsyonların 10^{-4} ile 10^{-5} nolu dilüsyonlar olduğu görülmektedir.

10^{-4} nolu sulandırımındaki kuyucuklar sayıldığında ortalama 9.25 plak,

10^{-5} nolu sulandırımındaki kuyucuklarda ise ortalama 1 adet plak sayıldı.

Titre hesaplanmasında kullanılan formülde;

$$\text{PPFU/ml} = \frac{\text{sayılan odak ortalaması}}{(\text{inokülüm miktarı}) \times (\text{dilüsyon oranı})}$$

değerler yerleştirildiğinde

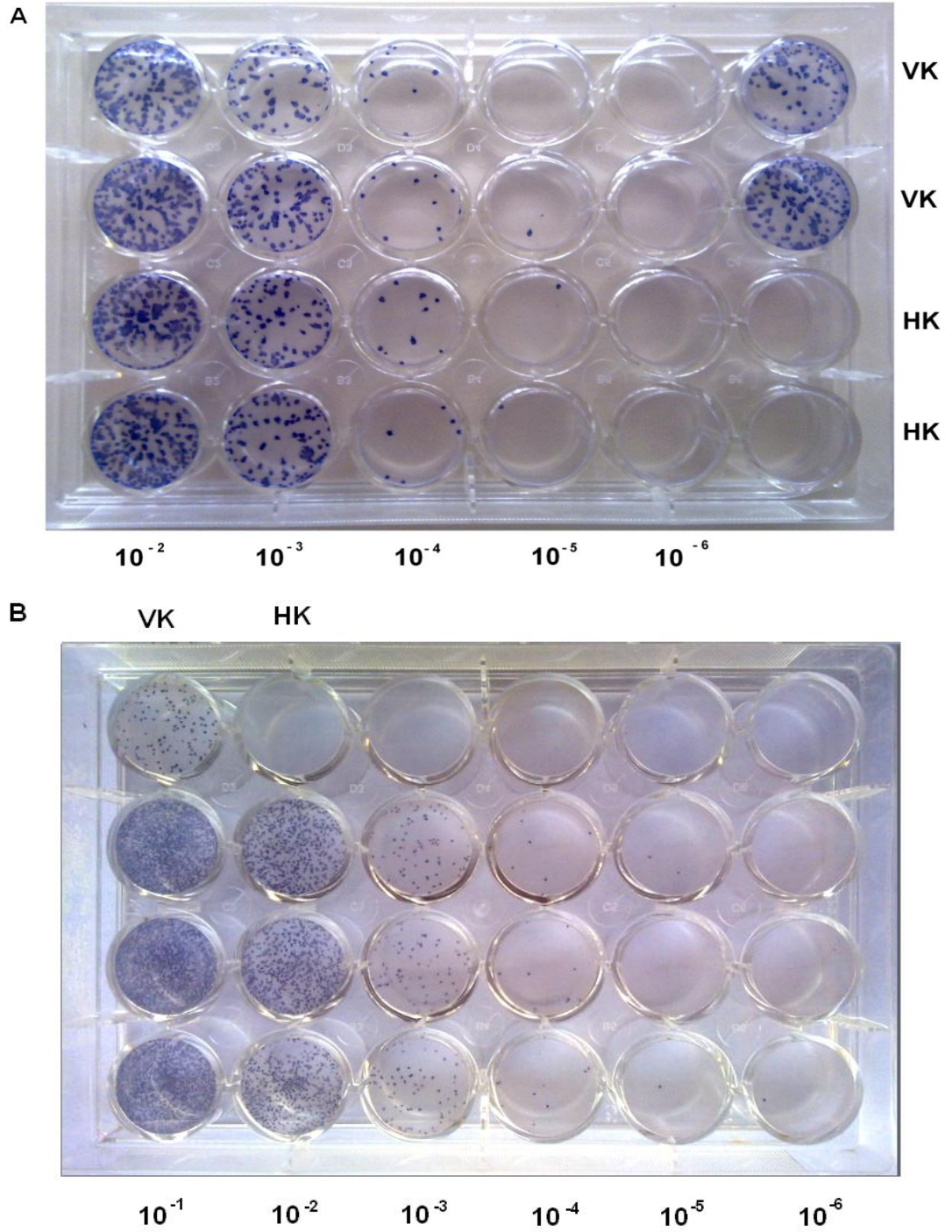
10^{-4} nolu sulandırım için $9.25 / 0.2 \times 10^{-4} = 4.6 \times 10^5$ ve

10^{-5} nolu sulandırım için $1 / 0.2 \times 10^{-5} = 5 \times 10^5$ olarak bulundu.

Her iki sulandırım değerlerinin de ortalaması alındığında 3 nolu Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun titresini 4.8×10^5 PPFU/ml olarak bulundu.

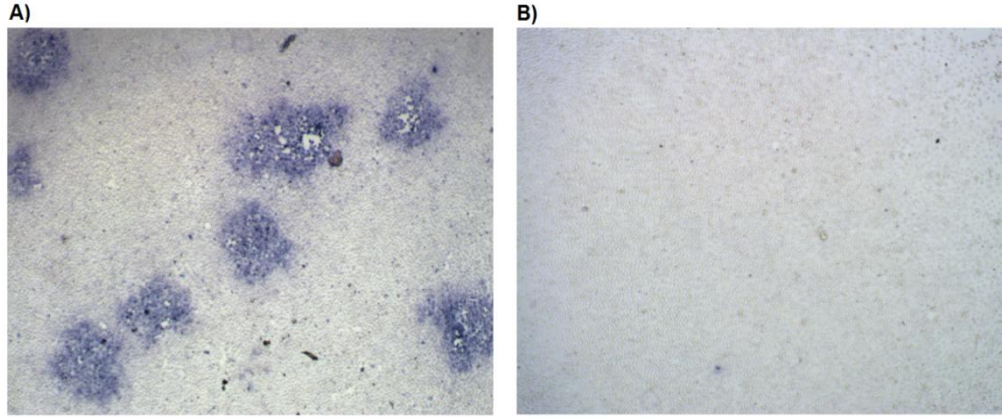
Oluşan plaklar negatif hücre kontroller ile mikroskopik olarak da karşılaştırıldı.

Aynı şekilde yapılan hesaplamayla SW-13 hücrelerde 3 nolu Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun titresini 4.5×10^5 PPFU/ml olarak hesaplandı (Şekil 12-B).



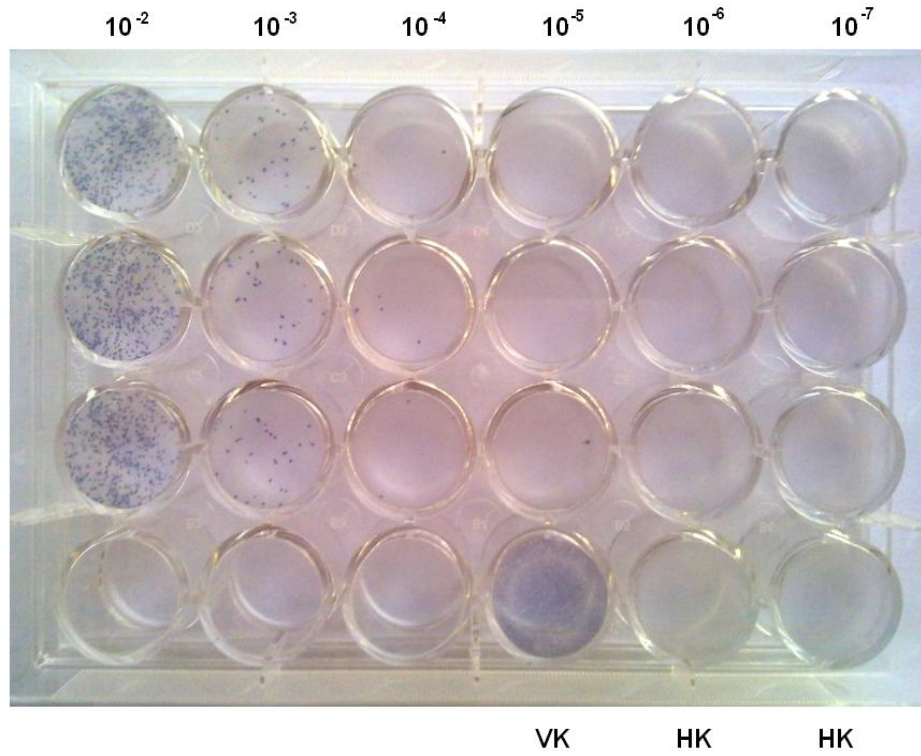
Şekil 12. Fare beyninden izole edilen 3. pasaj Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun Vero E6 (A) ve SW-13 (B) hücrelerinde psödo plak testi ile görüntülenmesi (VK: Virüs kontrol, HK: Hücre kontrol)

Psödo-plak testinde görüntüleme sonrası hem makroskobik (Şekil 12) hem de mikroskopik olarak virüs kontroller ile hücre kontroller karşılaştırıldığında viral üremelerin olduğu hücreler yoğun bir şekilde boya alırken hücre kontrollerde plak benzeri boyanmalara rastlanmadı (Şekil 13).



Şekil 13. 3. pasaj Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun Vero E6 hücrelerinde psödo-plak testinde görüntülendikten sonra oluşan plakların mikroskopik görüntüsü (A: Virüs kontrol, B: Hücre kontrol, 4X10 büyütme).

Vero E6 hücrelerinde 0.01 MOI ile enfeksiyon yapıldıktan sonra 5.günde elde edilen P0 virüs pasajının SW-13 hücrelerdeki titresini 1.5×10^5 PPFU/ml olarak hesaplandı (Şekil 14).



Şekil 14. SW-13 hücrelerinde Vero E6 hücre kültür Po virüs titresinin görünümü (VK: Virüs kontrol, HK: Hücre kontrol)

Vero E6 hücre kültürlerinde MOI 0.01 ile ekimi yapılan 3. pasaj Turkey-Kelkit06 suşunun günlere göre titre artışı ve azalışı plak testi yapılarak, enfektif viral antijen miktarları belirlendi (Grafik 1, Tablo1).



Grafik 1. Fare beyni 3. pasaj Turkey-Kelkit06 virüs suşunun Vero E6 hücre kültürlerinde enfeksiyon sonrası enfektif viral antijen titresinin günlere göre değişimi

Bu sonuçlara göre en yüksek enfektif viral titreye 2. günde ulaşıldığı ve 3. günden itibaren azaldığı görüldü (Tablo 1). Böylece hem viral titreler hem de parçalanmış hücre oranlarına bakılarak enfeksiyondan sonraki 5. günde enfekte hücreler -80°C'ye kaldırıldı.

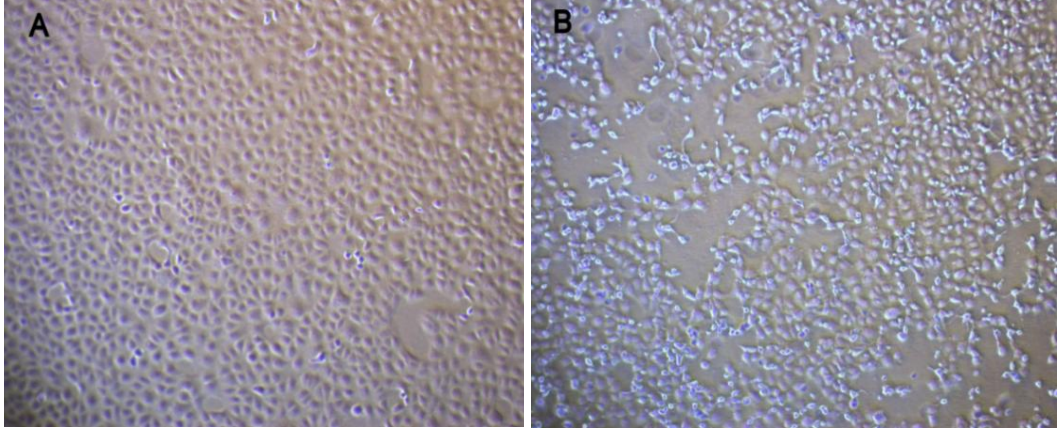
Tablo 1. Fare beyni 3. pasaj Turkey-Kelkit06 virüs suşunun Vero E6 hücre kültürlerinde enfeksiyon sonrası enfektif viral antijen miktarları.

Günler	Virüs Titresi (PPFU/ml)
1	2.6×10^6
2	2.3×10^7
3	9.5×10^6
4	6.5×10^5
5	4.0×10^4
6	1.1×10^4

5.2. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığına Karşı Aşı Geliştirme Çalışmaları

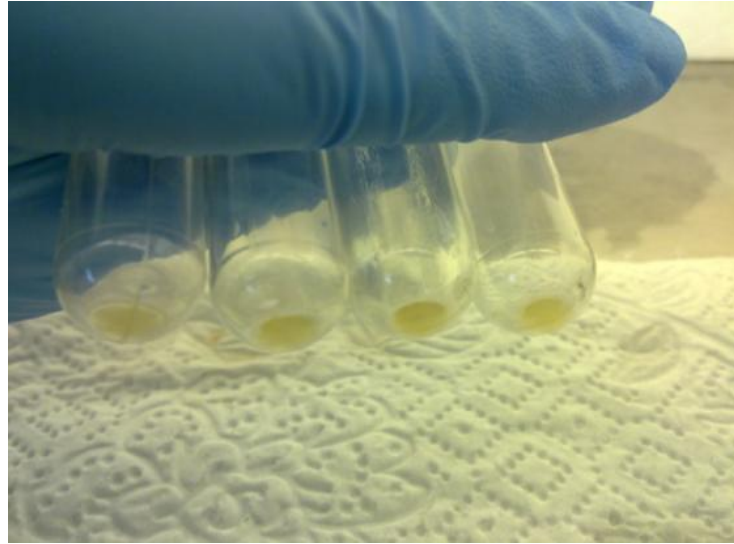
5.2.1. Hücre Kültür Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı

175 cm² flasklarda üretilen Vero E6 hücreleri 0.01 MOI miktarında KKKAH Turkey-Kelkit06 suşu ile enfekte edildikten sonraki 5. günde hücrelerin parçalanmaya başladığı görüldü (Şekil 15).



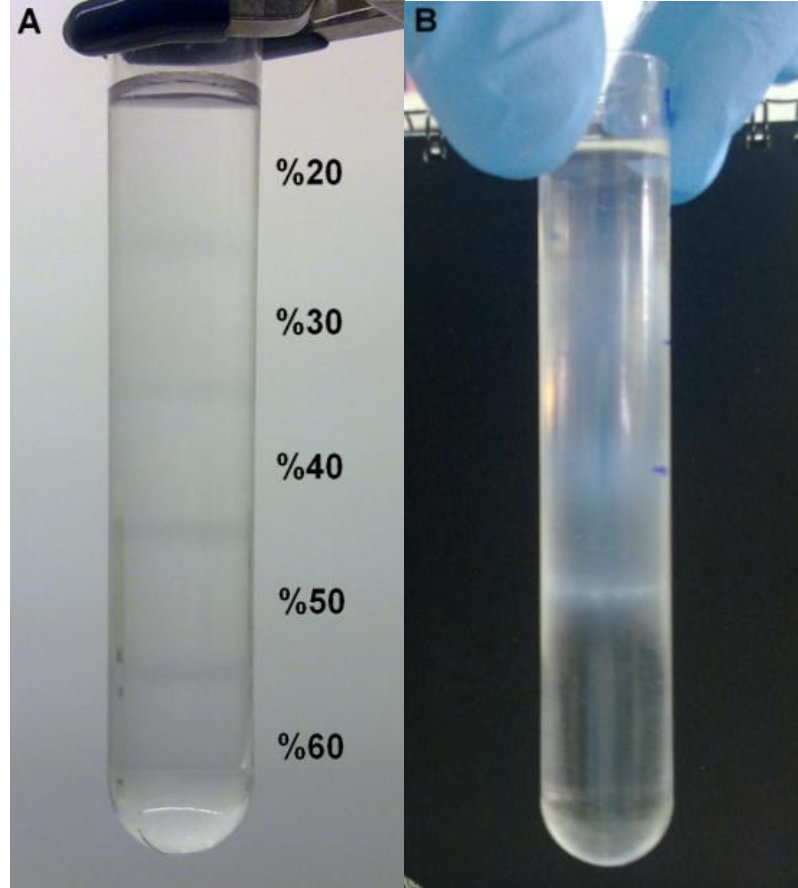
Şekil 15. Normal enfekte olmayan Vero E6 hücreleri (A) ve KKKAH Turkey-Kelkit06 suşu ile enfeksiyonun 5. gününde Vero E6 hücrelerinin (B) görünümü (10X10 büyütme)

Enfeksiyonun 5. gününde alınan üst sıvı PEG8000 ile çöktürülüp (Şekil 16) konsantre edildikten sonra Lowry testi ile protein miktarı ölçüldü. Bir adet 175 cm² flastan ortalama 50 - 75 µg arasında protein elde edildiği hesaplandı.



Şekil 16. PEG8000 ile çöktürme sonrasında ultrasantrifügasyon ile konsantre edilen protein peletlerin görünümü

Virüs pürifikasyonu amacıyla SW 41 ultrasantrifüj tüplerine sırasıyla 2 ml %60, %50, %40, %30 ve %20'lik sükröz dansite gradiyent tabakaları hazırlandı (Şekil 17-A). 1 ml TEN (Tris/EDTA/NaCl) tampon sölüsyonunda çözdürülen peletler gradiyentlerin üzerine tabaka halinde ilave edilerek ultrasantrifügasyon yapıldı (Şekil 17-B).



Şekil 17. Virüs pürifikasyonu için hazırlanan sükröz tabakaları (A) ve ultrasantrifügasyon sonrası tüplerin görünümü (B)

5.2.2. Fare Beyni Tabanlı Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı

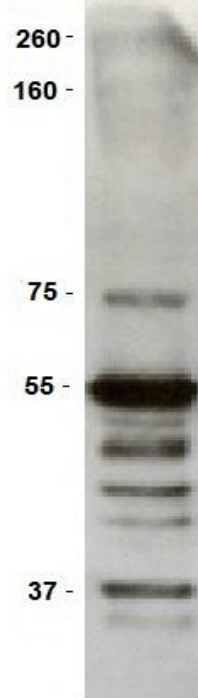
Yeni doğmuş 2-3 günlük fare yavrularına intraserebral olarak 20-30 µl KKKAH Turkey-Kelkit06 virüs suşu ile inökülasyon yapıldıktan 6 gün sonra fare yavruları agoni halindeyken alınan beyin numuneleri homojenize edildi ve üst sıvı

PEG8000 ile çöktürölüp konsantre edildikten sonra Lowry testi yapıldı. Bir adet fare beyninden ortalama 100 µg protein elde edildiği belirlendi.

5.3. Virüs Pürifikasyonu

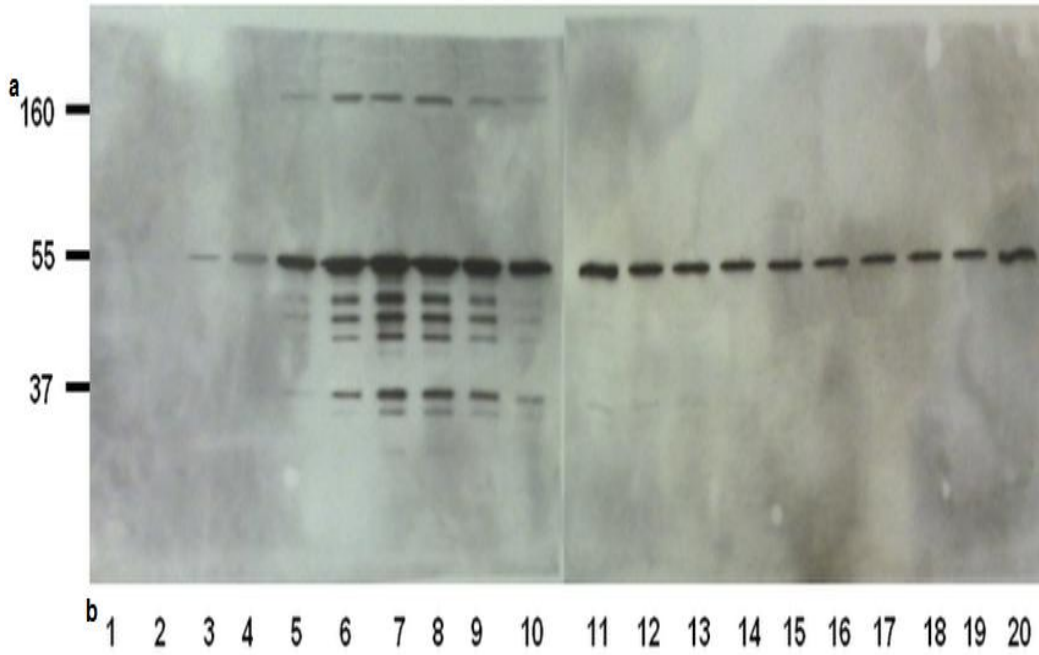
5.3.1. Western Blot ve SDS-PAGE

KKKAH virüsüne ait spesifik viral proteinlerin gösterilmesi amacıyla Western blot testi ile KKKAH virüsüne karşı yapılmış olan poliklonal tavşan serumları kullanıldı (Şekil 18). Görüntüleme sonrası KKKAH virüsüne ait olan 160 kDa büyüklüğünde prekürsör Gn, 75 kDa büyüklüğünde Gc, 55 kDa büyüklüğünde NP ve 37 kDa büyüklüğünde Gn proteinleri görüntülendi. Böylece KKKAH virüsüne ait spesifik proteinlerin varlığı Western blot deneyi ile teyit edildi.



Şekil 18. KKKAH virüsüne spesifik viral proteinlerin ve büyüklüklerinin Western blot testi ile görüntülenmesi (37 kDa Gn, 55 kDa NP, 75 kDa Gc, prekürsör Gn 160 kDa)

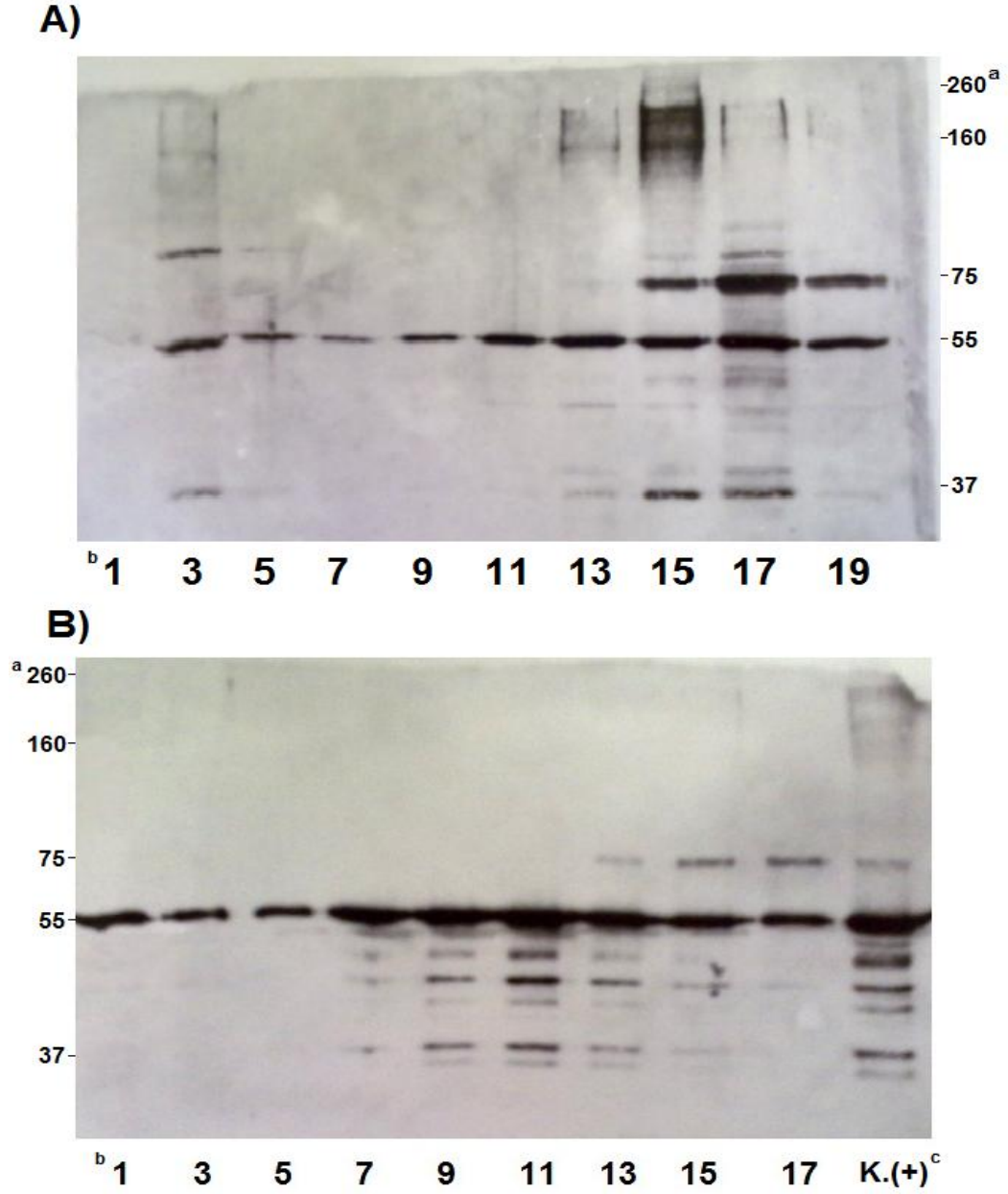
Hücre kültürlerinden çöktürülerek süzkroz dansite gradiyent ultrasantrifügasyon yapılan virüse ait proteinlerin, en yoğun olarak 5 ile 10 no'lu fraksiyonlar arasında olduğu Western blot ile görüntüledi (Şekil 19). Bu fraksiyonlar birleştirildikten sonra Lowry testi ile pürifiye protein miktarları belirlendi. Yaklaşık olarak bir adet 175 cm² flasktan 5-7.5 µg pürifiye virüs elde edildi.



Şekil 19. Fraksiyon kollektör ile 0.5 ml toplanan süzkroz fraksiyonların Western blot ile görüntülenmesi (^a protein ağırlığı (kDa), ^b ultrasantrifüj sonrası fraksiyon kollektör ile ayrılan fraksiyon numaralarını göstermektedir)

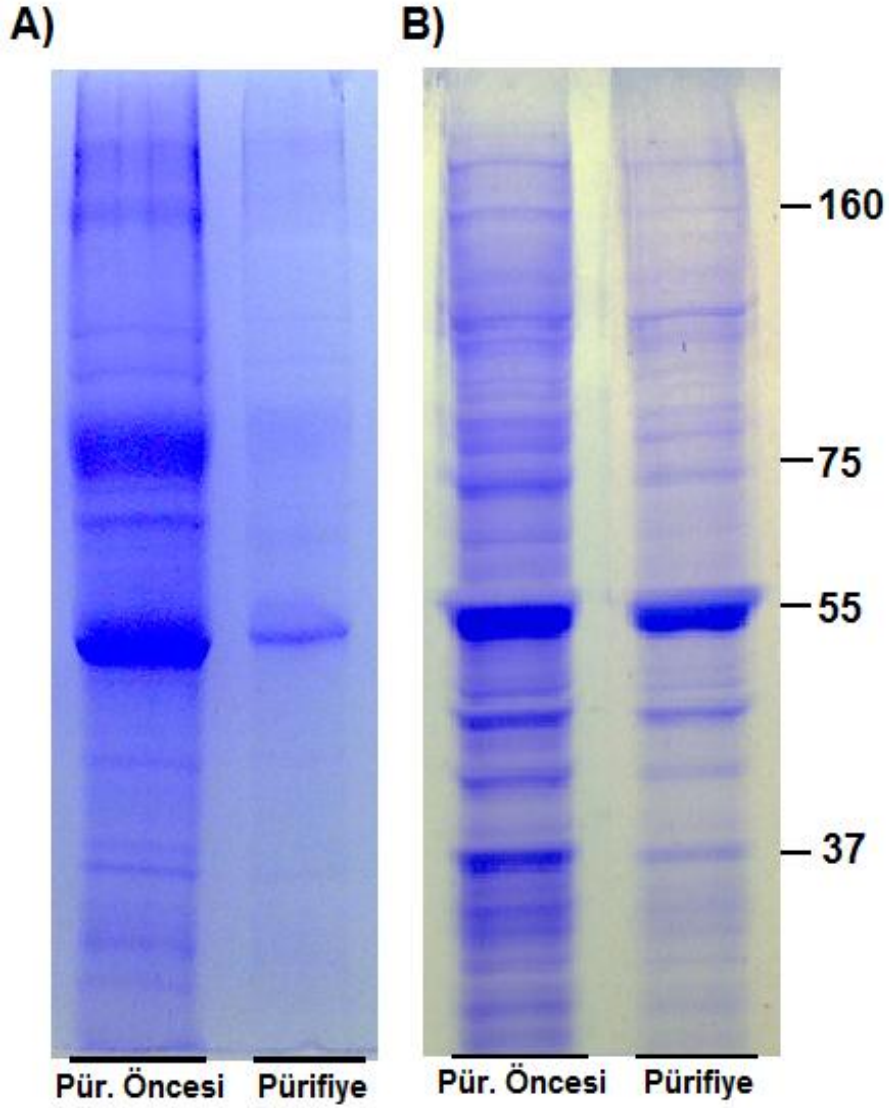
Fare beyinlerinden üretilip protamin sülfat uygulanan proteinler süzkroz dansite gradiyent ultrasantrifügasyonla fraksiyonlara ayrıldı. Viral proteinlerin, Western blot ile en yoğun olarak 7 ile 13 nolu fraksiyonlar arasında dağıldığı gösterildi (Şekil 20).

Sükroz dansite gradiyent ultrasantrifügasyon sonrası pozitif olarak belirlenen fraksiyonlar birleştirilip pürifiye edildikten sonra Lowry testi ile bir fare beyninden ortalama 50 µg pürifiye virüs elde edildi.



Şekil 20. Fare beyni aşısı antijenlerinin PEG çöktürme sonrası (A) ve protamin sülfat uygulandıktan sonraki (B) sükroz tabakalarından fraksiyonlara ayrıldıktan sonra yapılan Western blot görüntüleri (^a Protein büyüklükleri (kDa), ^b ultrasantrifüj sonrası fraksiyon kollektör ile ayrılan fraksiyon numaraları, ^c K.(+): pozitif kontrol)

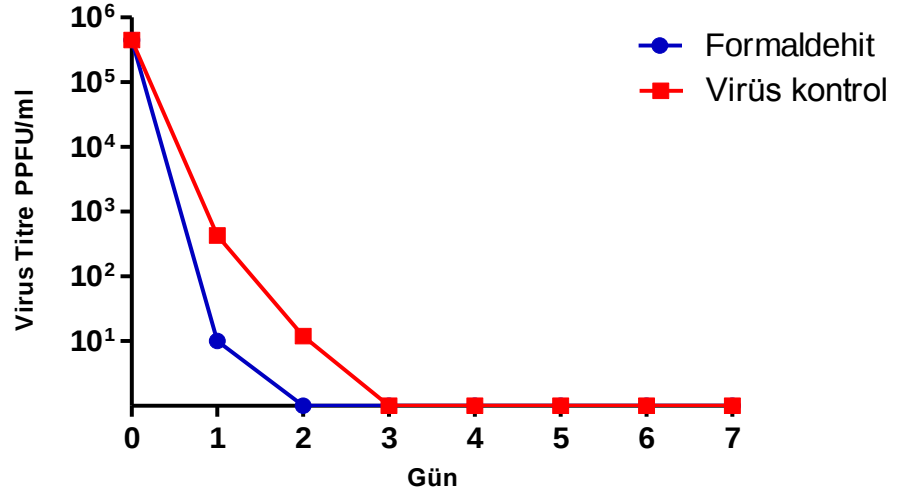
Virüs inaktivasyonu yapıp diyaliz işlemi yapıldıktan sonra hem hücresel proteinlerin uzaklaştırıldığını göstermek hem de viral proteinlerin pürifiye edildiğini görmek amacıyla SDS jel boyama yapıldı. Her iki aşı antijenlerinin büyük oranda pürifiye edildiği SDS jel boyama sonrası görüldü (Şekil 21).



Şekil 21. Fare beyni aşısı için hazırlanan ve pürifiye edilen aşı antijenleri (A) ile hücre kültür tabanlı inaktif aşı için hazırlanan ve pürifiye edilen aşı antijenlerinin (B) pürifikasyon öncesi ve pürifikasyon sonrası SDS jel boyama görüntüleri (160 kDa Prekürsör Gn, 75kDa Gc, 55kDa NP, 37kDa Gn)

5.4. Virüs İnaktivasyonu

Hem hücre kültüründen hem de fare beyninden üretilerek pürifiye edilen KKKAH Turkey-Kelkit06 virüs suşunun inaktivasyonu amacıyla %0.05 formaldehit konsantrasyonunda ve oda ısısında ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) bir hafta boyunca inkübe edildi. Her 24 saatte bir örnekler alınarak psödo-plak testi ile virüs titreleri belirlendi. Formaldehit ilave edildikten 2 gün sonra virüsün tamamen inaktif edildiği gösterildi. Formaldehit kullanılmayan kontrol grubunun ise oda sıcaklığında 3. gün sonunda inaktive olduğu belirlendi (Grafik 2).



Grafik 2. KKKAH virüsünün formaldehit ve oda ısısındaki inaktivasyonu. 4.5×10^5 PPFU/ml titredeki virüs ve formaldehit ilave edilen virüsün bir hafta boyunca $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra virüs titreleri ölçüldü

Formaldehidin nötralize edilmesi için %3.75 sodyum bisülfattan 1:100 oranında inaktive edilen virüse ilave edildi. Formaldehit ve sodyum bisülfatın uzaklaştırılması amacıyla karışım 20.000 MWCO diyaliz kasetine aktararak PBS içerisinde diyaliz edildi. Diyaliz edilen karışımlar kasetlerden alınarak biraraya

getirildi ve homojenize edildi. Son olarak 0.22 µm şırınga filtre ile steril edilerek Lowry testi ile protein miktarı ölçüldü ve kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

5.5. İmmünizasyonlar

Hücre kültür tabanlı ve fare beyninden hazırlanan aşılardan antikor yanıt etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla 4-6 haftalık dişi BALB/c fareleri kullanıldı. Her iki aşı için 5 µg, 10 µg ve 20 µg aşı antijen doz grupları ve kontrol grupları oluşturuldu. Her bir gruba 6 adet BALB/c fare dahil edildi.

PBS içerisinde 5, 10 ve 20 µg dozlarda aşı antijenleri hazırlandıktan sonra alüminyum hidroksit adjuvant (Imject® Alum) ile 1:1 oranında adjuvanizasyon yapıldı. Kontrol gruplarının immünizasyonlarında sadece PBS kullanıldı.

Fareler intraperitoneal yolla 0, 21 ve 42. günlerde olmak üzere üç hafta arayla üç kez immünize edildi. Aşılamaya öncesi ve sonrası dahil olmak üzere anestezi altında farelerden intraorbital yolla haftalık olarak kan örnekleri alınarak antikor yanıtların belirlenmesi amacıyla serumlar elde edildi.

Aşı üzerinde adjuvantın etkinliğinin belirlenmesi amacıyla hücre kültüründen elde edilen pürifiye inaktif aşı 10 µg dozda sabit tutularak Montanide (SEPPIC, Montanide ISA 720) ve AS03 (GlaxoSmithKline, AS03 adjuvant emulsion) ile adjuvanize edildi. Deney kontrolü olarak adjuvantsız 10 µg dozda hücre kültür tabanlı aşı grubu ve sadece PBS kontrol grubu oluşturuldu.

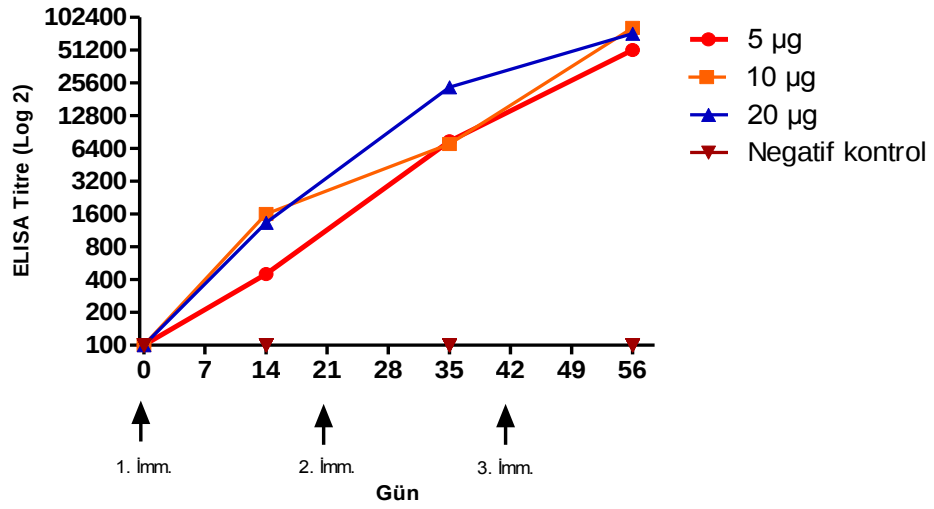
5.5.1. Fare Beyni ve Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Aşısı ile İmmünizasyon Sonrası Oluşan ELISA Titreleleri

Fare beyni ve hücre kültür tabanlı inaktif KKKAH aşıları alüminyum hidroksit ile adjuvanize edildikten sonra immünize edilen farelerde IgG antikor yanıtın belirlenmesi amacıyla immünizasyonlardan 2 hafta sonra alınan serumlara indirekt ELISA yapıldı.

Oluşturulan 3 farklı doz grubunda hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan immünizasyonlarda, gruplardaki tüm farelerde antikor yanıt oluştuğu gözlemlendi. Her doz grubu için ortalama titreler belirlendi (Tablo 2, Grafik 3). Aynı şekilde inaktif fare beyni aşısı ile yapılan farklı doz ve immünizasyon sonuçlarında bütün hayvanlarda antikor yanıt oluştuğu gözlemlendi (Tablo 2, Grafik 4).

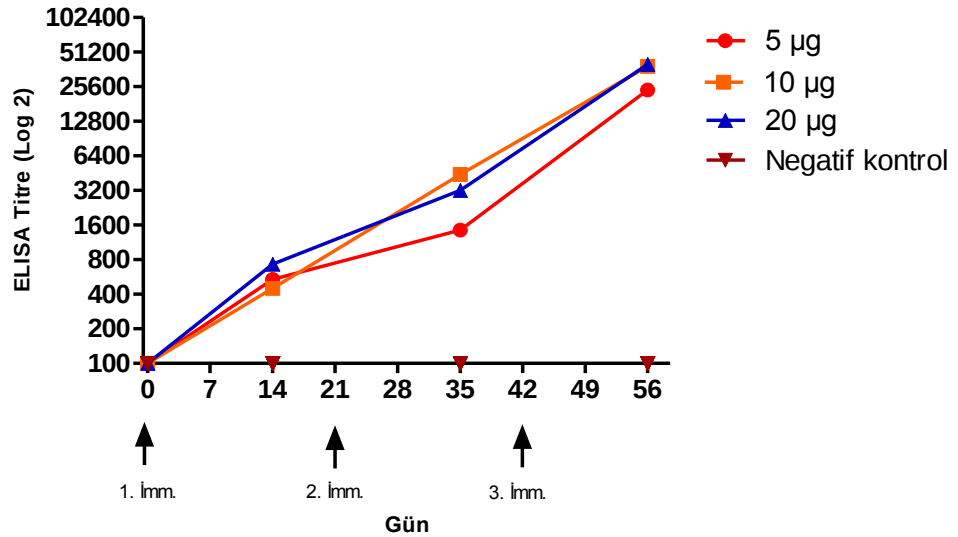
Hücre kültür tabanlı inaktif KKKAH aşısı ile immünizasyon sonrası oluşan ortalama IgG titrelerin her 3 doz grubunda da fare beyninden hazırlanan KKKAH aşısına göre çok daha yüksek olduğu belirlendi (Tablo 2).

Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşı



Grafik 3. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile üç farklı dozda yapılan immünizasyonlara ait indirekt ELISA IgG antikor titre yanıtları (Grafik, gruplardaki ELISA serum sulandırımındaki ortalama antikor titreler alınarak oluşturulmuştur)

Fare Beyni Tabanlı İnaktif Aşısı



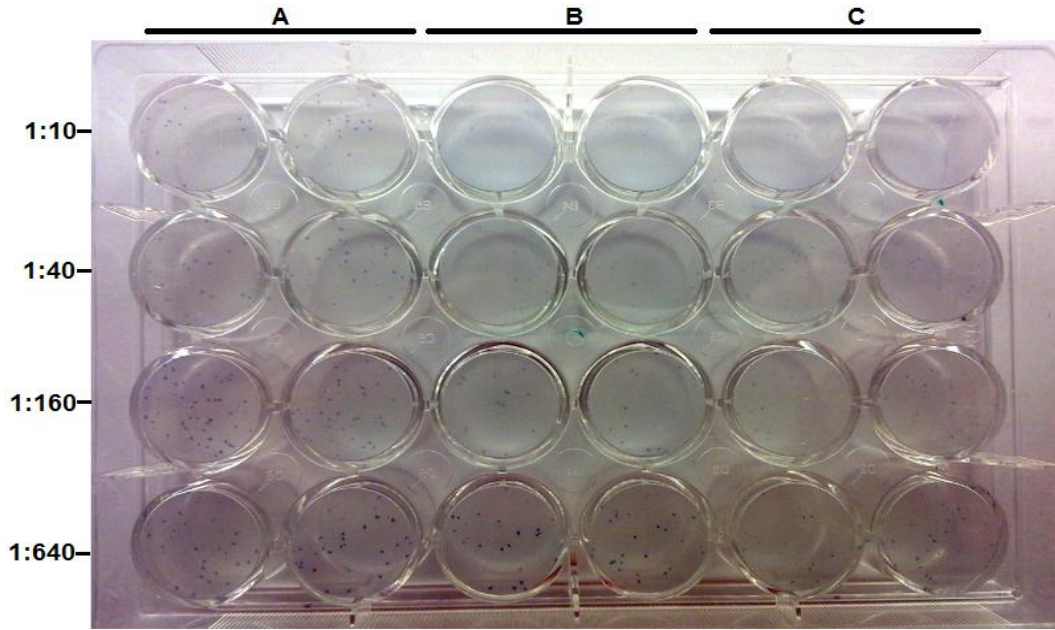
Grafik 4. Fare beyni tabanlı inaktif aşı ile üç farklı dozda yapılan immünizasyonlara ait indirekt ELISA IgG antikor titre yanıtları (Grafik, gruplardaki ELISA serum sulandırımındaki ortalama antikor titreler alınarak oluşturulmuştur)

Tablo 2. Fare beyni ve hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan doz gruplarında üç immünizasyon sonrası elde edilen serumlara ait indirekt ELISA IgG antikor yanıtları

Fare Beyni ve Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşı Gruplarına Ait Ortalama ELISA Değerleri									
Gruplar	1. immünizasyon			2. immünizasyon			3. immünizasyon		
	20 µg	10 µg	5 µg	20 µg	10 µg	5 µg	20 µg	10 µg	5 µg
Fare Beyni Tabanlı İnaktif Aşı	1:733	1:450	1:540	1:3200	1:4400	1:1450	1:40133	1:38400	1:24000
Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşı	1:1333	1:1600	1:450	1:23466	1:7040	1:7467	1:81920	1:72533	1:51200
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5.5.2. Fare Beyni ve Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşıların Nötralizasyon Titreleri

İnaktif fare beyni ve hücre kültür tabanlı inaktif aşının nötralizan etkinliklerinin ölçülmesi amacıyla psödo-plak redüksiyon nötralizasyon testi (PPRNT) yapıldı. Bu amaçla SW-13 hücre kültürlerinde titresi bilinen virüs 50 PPFU ile sabit tutuldu. Herbir immünizasyondan 2 hafta sonra alınan kan serumları Log 4 tabanında sulandırılarak 50 PPFU virüs ile inkübe edildi ve daha sonra SW-13 hücreleri ile inkübe edildi (Şekil 22).



Şekil 22. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile 20 µg dozda yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait 24 kuyucuklu pleytte Log4 ile yapılan nötralizasyon testi (PPRNT) (A: Negatif kontrol, B: 2. immünizasyon 2. hafta 1:160 nötralizan, C: 3. immünizasyon 2.hafta 1:640 nötralizan)

Deney sonunda serumların PPRNT₅₀ titreleri hesaplandı. Her iki aşı ile yapılan birinci immünizasyonlarda titrelerin sınırda pozitif veya negatif olduğu görüldü. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ve fare beyninden hazırlanan aşılar ile

yapılan 2. ve 3. immünizasyon sonrası nötralizan antikor titrelerinin doza bağlı olarak arttığı belirlendi. Her iki aşı için de 5 µg doz grubunun nötralizan antikorları indüklemek için yetersiz olduğu saptandı (Tablo 3, Tablo 4, Grafik 5).

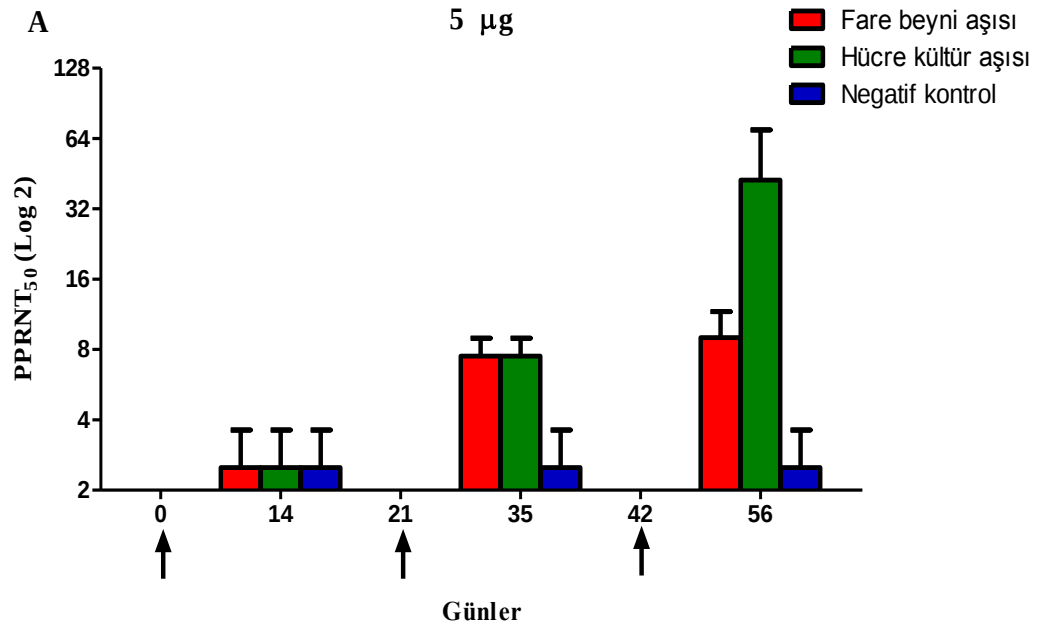
Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan üçüncü immünizasyon sonunda nötralizan antikor seviyeleri PPRNT₅₀ 1:5-1:500 arasında iken fare beyni aşısı ile yapılan immünizasyonda PPRNT₅₀ 1:5-1:160 arasında olduğu belirlendi (Tablo 3, Tablo 4, Grafik 5). Bu sonuçlar, hücre kültür tabanlı inaktif aşının nötralizan antikorların oluşmasını fare beyni ile yapılan aşıya göre daha çok indüklediğini göstermektedir.

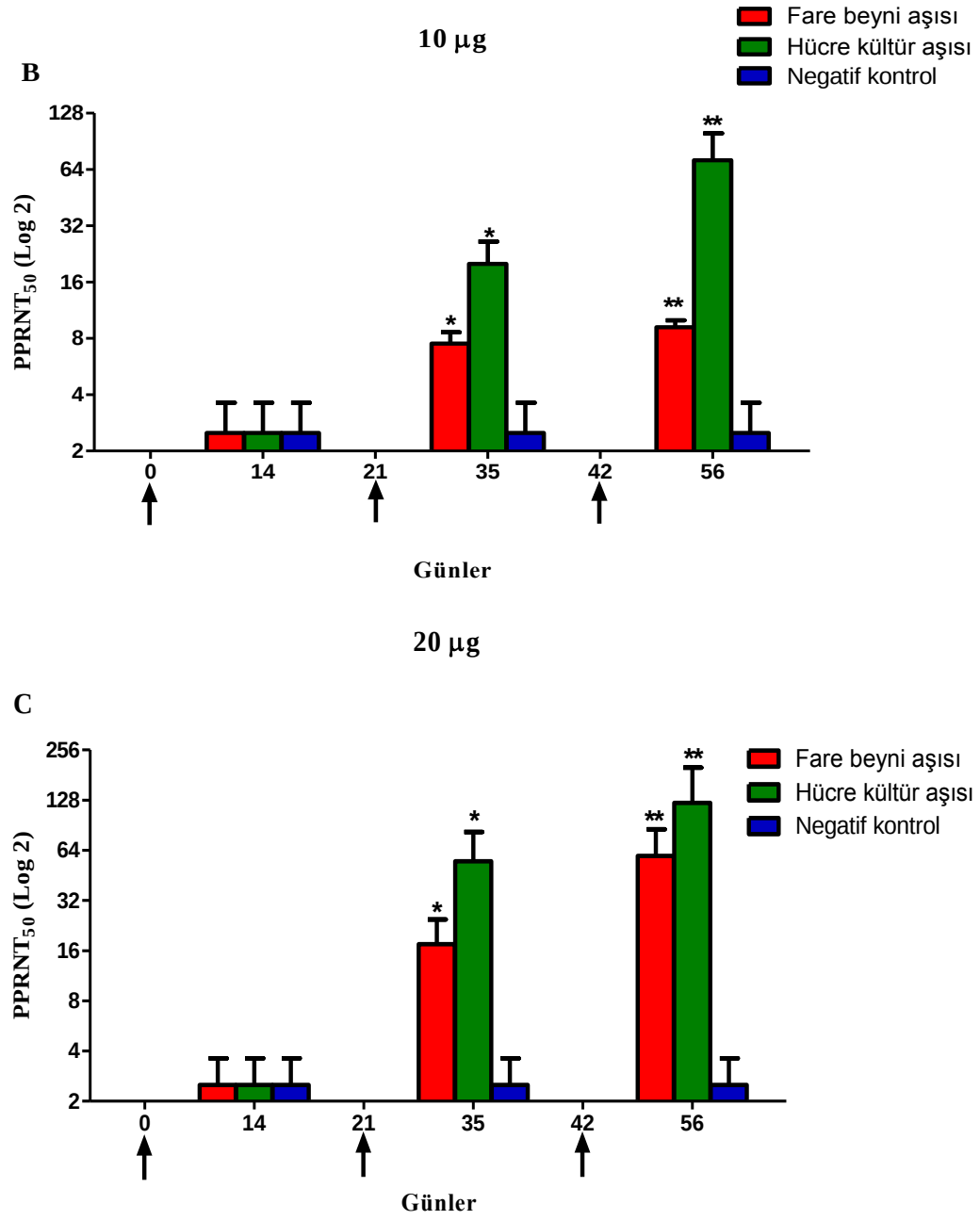
Tablo 3. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait nötralizan antikor titreler (PPRNT₅₀).

Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşı (PPRNT ₅₀)						
Fare No	2. immünizasyon			3. immünizasyon		
	20 µg	10 µg	5 µg	20 µg	10 µg	5 µg
1	1:160	1:10	1:10	1:500	1:40	1:120
2	1:120	1:40	1:10	1:120	1:160	1:40
3	1:20	1:40	1:5	1:40	1:160	1:5
4	1:5	1:10	1:5	1:20	1:40	1:5
5	1:20	1:10	-	1:40	1:10	-
6	1:5	1:10	-	1:20	1:20	-

Tablo 4. Fare beyni tabanlı inaktif aşı ile yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait nötralizan titreler (PPRNT₅₀).

Fare Beyni Tabanlı İnaktif Aşı (PPRNT ₅₀)						
Fare No	2. immünizasyon			3. immünizasyon		
	20 µg	10 µg	5 µg	20 µg	10 µg	5 µg
1	1:10	1:10	1:5	1:40	1:10	1:5
2	1:40	1:10	1:5	1:160	1:10	1:5
3	1:40	1:10	1:10	1:120	1:10	1:16
4	1:5	1:5	1:10	1:20	1:5	1:10
5	1:5	1:5	-	1:5	1:10	-
6	1:5	1:5	-	1:10	1:10	-





Grafik 5. Fare beyni aşısı ve hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile 5 µg (A), 10 µg (B) ve 20 µg (C) dozlarda yapılan immünizasyonlara ait aşı gruplarındaki nötralizan antikor titreleri (PPRNT₅₀) (Ok ile işaretli günler sırasıyla birinci, ikinci ve üçüncü immünizasyon günlerini göstermektedir, gruplar arası fark Kruskal-Wallis, grupların negatif kontroller ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. *P≤0.05, **P≤0.01)

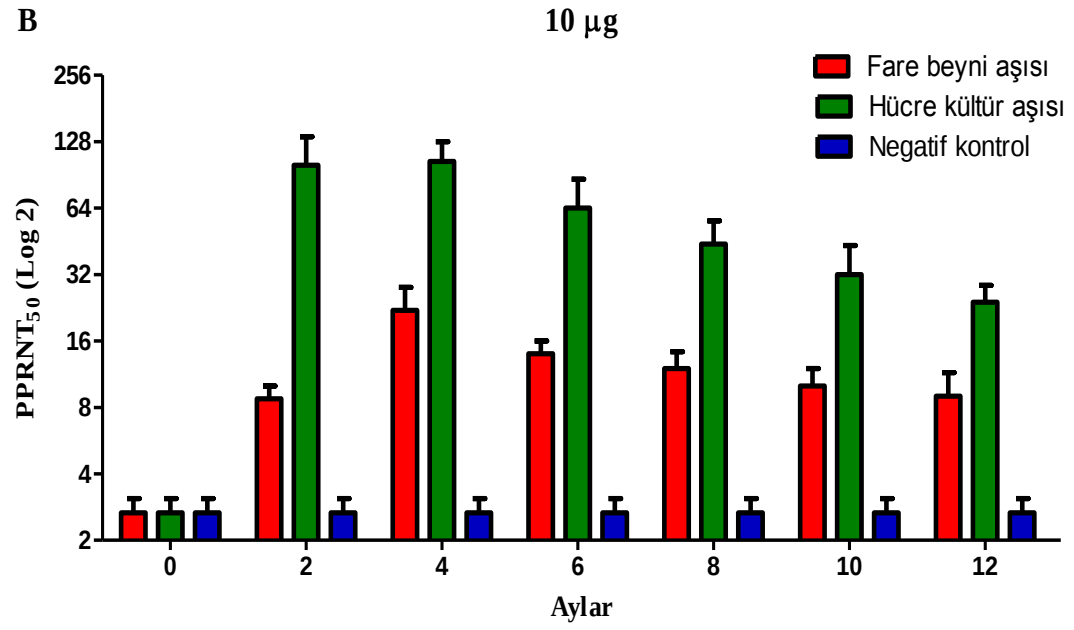
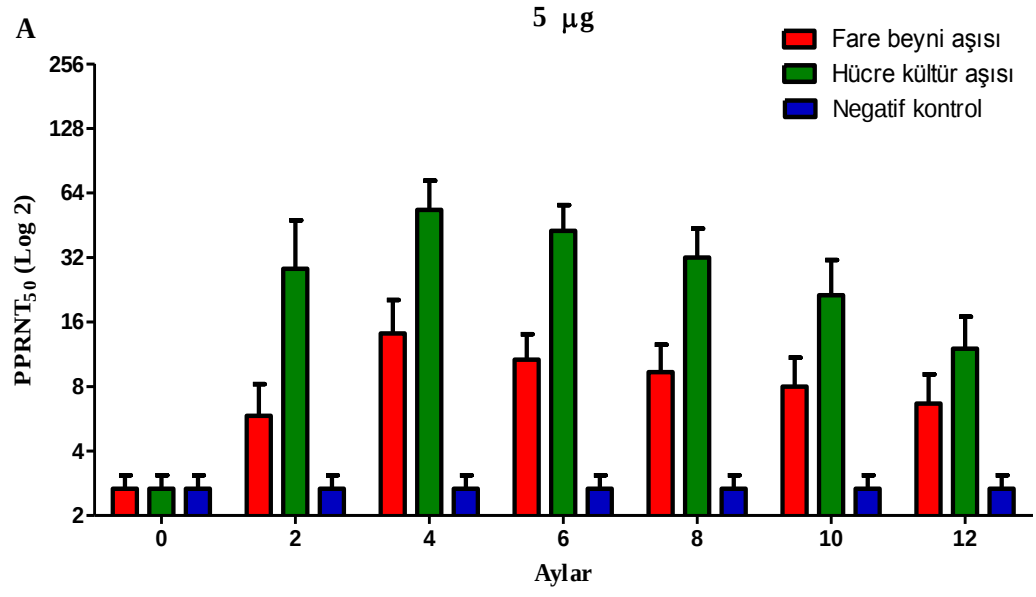
5.5.3. Uzun Süreli İmmün Yanıtların Değerlendirilmesi

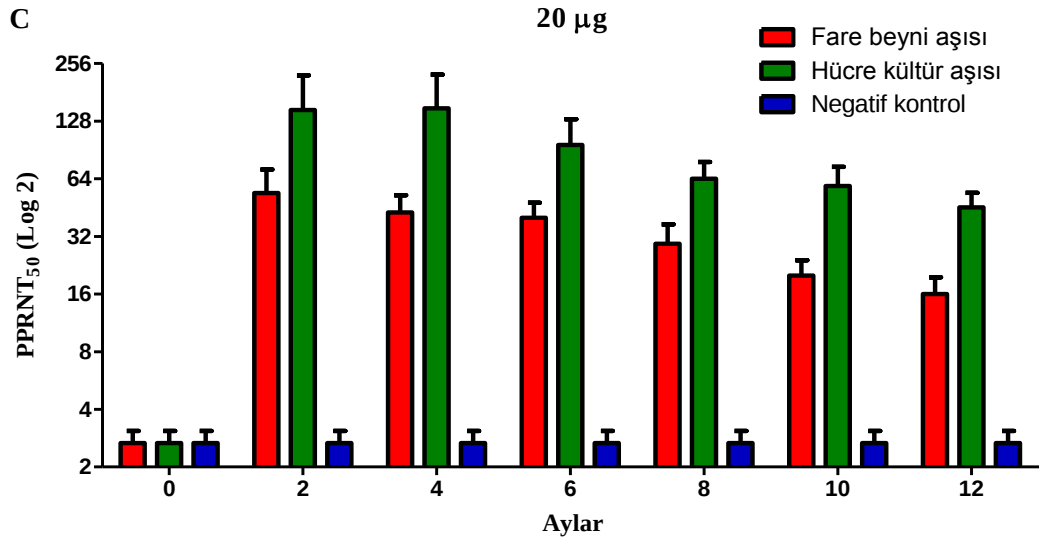
Fare beyni ve hücre kültür tabanlı inaktif aşılardan uzun süreli immün yanıtlarının değerlendirilmesi amacıyla bir yıl boyunca iki ay aralıklarla alınan serumlar PPRNT ile nötralizan antikor titreleri (Grafik 6) ve ELISA ile IgG (Grafik 7) titreleri yönünden test edildi.

Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan 5 µg, 10 µg ve 20 µg doz gruplarında en yüksek nötralizan antikor seviyeleri 4. ayda sırasıyla 1:53, 1:104 ve 1:149 olarak ölçüldü. Aşılamalardan sonraki 12. aya kadar nötralizan antikor seviyeleri ölçüldüğünde, titrelerin azalarak devam ettiği ve 5 µg, 10 µg, 20 µg doz gruplarında 12. ayda nötralizan antikor seviyelerinin sırasıyla 1:12, 1:24 ve 1:45 olduğu belirlendi (Grafik 6).

Fare beyni aşısı ile hazırlanarak yapılan aşılamalarda 5 µg ve 10 µg doz aşılamalarında en yüksek nötralizan antikor seviyeleri 4. ayda sırasıyla 1:14 ve 1:22 olarak ölçülürken 20 µg doz grubunda ise en yüksek nötralizan antikor seviyesi 2. ayda ve 1:54 olarak ölçüldü. Aşılamalardan sonraki 12. aya kadar nötralizan antikor seviyeleri ölçüldüğünde, titrelerin azalarak devam ettiği ve 5 µg, 10 µg, 20 µg doz gruplarında 12. ayda nötralizan antikor seviyelerinin sırasıyla 1:6, 1:9 ve 1:16 olduğu belirlendi (Grafik 6).

Nötralizan antikor sonuçları değerlendirildiğinde her iki aşıda doza bağlı nötralizan antikor yanıtlar oluştuğu ve hücre kültür tabanlı inaktif aşının fare beyni aşısından 2 ile 5 kata kadar daha yüksek nötralizan antikor oluşturduğu görüldü.





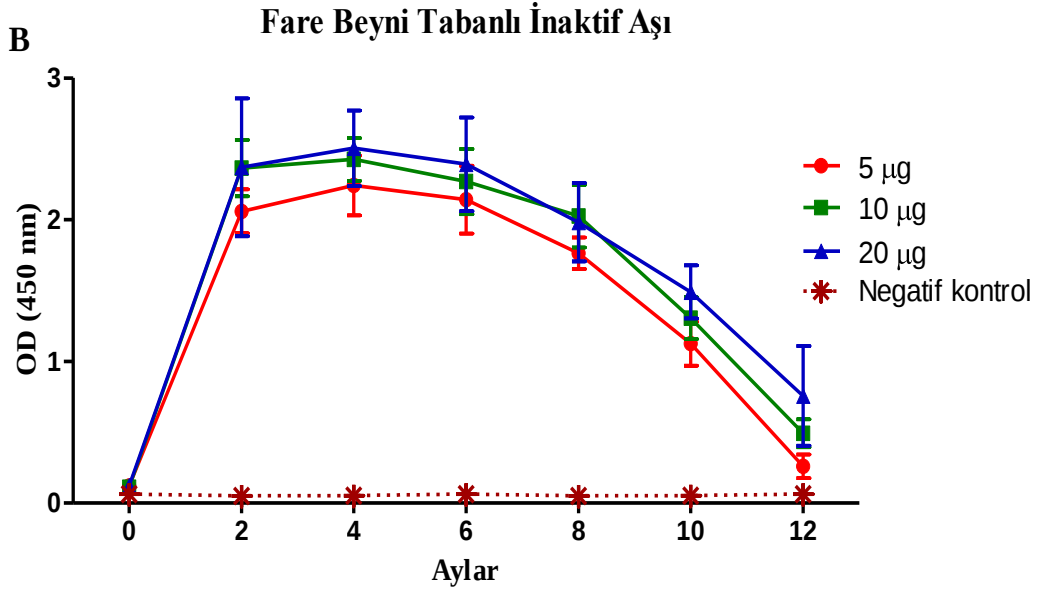
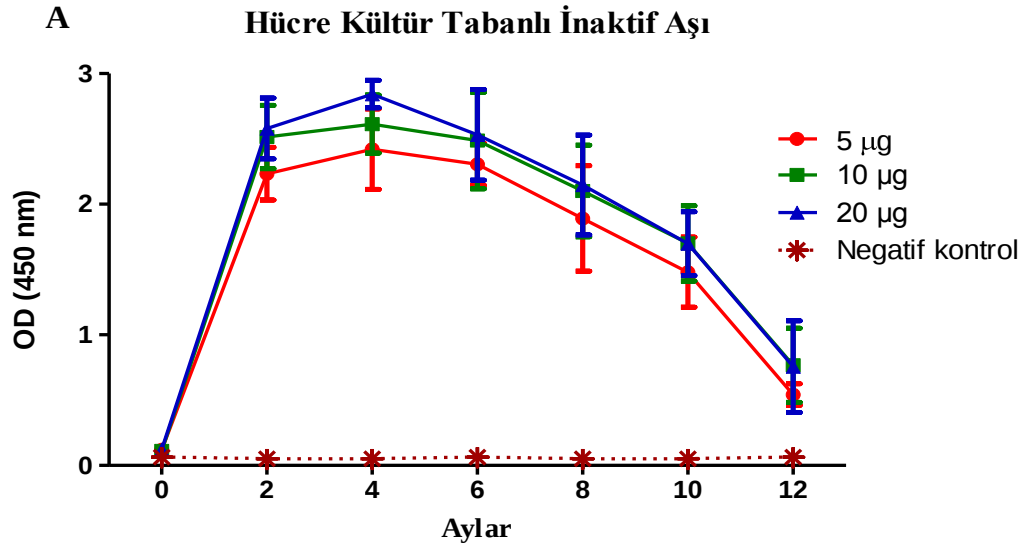
Grafik 6. Fare beyni aşısı ve hücre kültür tabanlı inaktif aşılar ile 5 µg (A), 10 µg (B) ve 20 µg (C) dozlarda yapılan immünizasyonlara ait aşı gruplarındaki 2 ay aralıklarla bir yıllık nötralizan antikor titreleri (PPRNT₅₀)

Aşıların IgG antikor yanıtları değerlendirildiğinde, her iki aşı da benzer şekilde 4. ayda en yüksek antikor seviyelerine çıkarken 12. aya kadar antikor yanıtlar azalarak devam ettiği belirlendi (Grafik 7).

Fare beyni ile hazırlanarak yapılan aşılamalarda alınan örnekler ELISA ile IgG yönünden test edildiğinde bütün doz gruplarındaki farelerde bireysel antikor yanıtlar oluştuğu ve ilk immünizasyondan sonra IgG titrelerinin 1:540-1:733 arasında olduğu görüldü. En yüksek IgG antikor yanıtları 4. ayda belirlendi. 5 µg, 10 µg ve 20 µg doz gruplarında ise ortalama IgG yanıtlar sırasıyla 1:128000, 1:140800 ve 1:170667 olarak ölçüldü. Antikor yanıtın 4. aydan 12. aya kadar azalarak devam ettiği belirlendi. Tüm doz gruplarında 12. ayda ölçülen antikor yanıtlar ortalama 1:200-1:500 arasında saptandı.

Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile aşılanan fare serumlarında ELISA ile IgG antikor yanıtlar değerlendirildiğinde fare beyni aşısı ile benzer şekilde ilk immünizasyon sonrasında IgG yanıtların tüm gruplarda oluştuğu gözlemlendi. Tüm doz gruplarında ilk immünizasyondaki IgG yanıtları 1:450-1:1333 arasında ölçüldü. En yüksek IgG antikor yanıtları 4. ayda saptandı. 5 µg, 10 µg ve 20 µg doz gruplarında ise ortalama IgG yanıtları sırasıyla 1:170667, 1:245760, 1:273067 olarak ölçüldü. Benzer şekilde IgG antikor yanıtlar 6. aydan 12. aya kadar azalarak devam etmektedir. Tüm doz gruplarında 12. ayda en son ölçülen antikor yanıtlar ortalama 1:533-1:700 arasında saptandı.

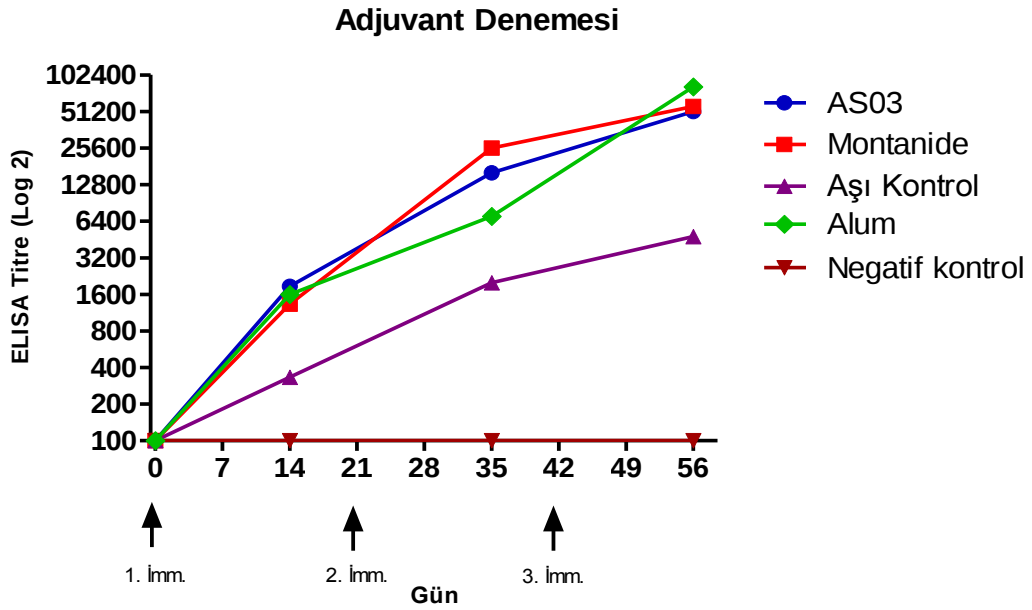
Sonuç olarak ELISA IgG titreler değerlendirildiğinde nötralizan antikor yanıtlarla benzer şekilde doza bağlı titre artışı olduğu ve her iki grupta en yüksek IgG antikor yanıtın 20 µg doz gruplarında olduğu görüldü. Ancak, hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan immünizasyonlarda fare beyni aşısı ile yapılan immünizasyonlara göre daha yüksek IgG antikor yanıtlar oluştuğu belirlendi.



Grafik 7. İndirekt ELISA testi ile bir yıl boyunca iki ay aralıklarla ölçülen aşı ve doz gruplarına ait IgG antikor yanıtların OD değerlerinin gösterilmesi (A: Hücre kültür tabanlı inaktif aşı, B: Fare beyini tabanlı inaktif aşı)

5.5.4. Farklı Adjuvantlarla Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşının Adjuvanize Edilmesi ve ELISA Titreleleri

Hücre kültür tabanlı inaktif aşının fare beyindeki hazırlanan aşıya göre daha iyi immün yanıtın oluştuğu saptanmasından sonra hücre kültür tabanlı inaktif aşının farklı adjuvantlarla denenerek immün yanıt üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla, 10 µg aşı antijeni içeren hücre kültür tabanlı inaktif aşısı Alum, Montanide ve AS03 ile adjuvanize edilerek oluşturulan 3 grup yanında sadece 10 µg aşı antijeni verilen (adjuvantsız) grup ve kontrol grubu da kullanıldı. İmmünizasyonlar, 3'er hafta ara ile 3 kez BABLB/c farelerine intraperitoneal yolla yapıldı. Her bir immünizasyondan 2 hafta sonra alınan kan örnekleri indirekt ELISA ile test edildi.



Grafik 8. AS03, Montanide, Alum ve Aşı Kontrol (adjuvantsız) gruplarına ait 10 µg doz ile yapılan üç immünizasyon sonrası IgG antikor titre artışları (Grafik, gruplardaki ELISA serum sulandırımındaki ortalama antikor titreler alınarak oluşturulmuştur)

Tüm gruplardaki farelerde bireysel olarak IgG antikor yanıt elde edilirken en yüksek titrelerin adjuvantlar ile birlikte yapılan immünizasyonlarda olduğu gözlemlendi. Üçüncü immünizasyon sonrası en yüksek IgG titreleri Alum adjuvantı kullanılan grupta saptandı. Adjuvant olarak Montanide kullanılan grupta IgG titreleri AS03 adjuvant grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi. Beklendiği gibi adjuvanize edilmeyen aşı grubu ile diğer gruplar arasında her üç immünizasyonda 10 kat kadar farklılık olduğu saptandı (Grafik 8, Tablo 5).

Tablo 5. Farklı adjuvantlar ve adjuvant kullanılmadan 10 µg dozlarla yapılan üç immünizasyon sonrası ikinci haftalara ait ortalama IgG ELISA titreleri

Adjuvant Gruplarına Ait Ortalama ELISA Değerleri			
Gruplar	1. immünizasyon	2. immünizasyon	3. immünizasyon
AS03	1:1867	1:16000	1:51200
Montanide	1:1333	1:25600	1:56320
Alum	1:1600	1:7040	1:81920
Aşı kontrol	1:333	1:2000	1:4800
Negatif kontrol	0	0	0

5.5.5. Farklı Adjuvantlarla Hücre Kültür Tabanlı İnaktif Aşının Adjuvanize Edilmesi ve Nötralizasyon Titreleri

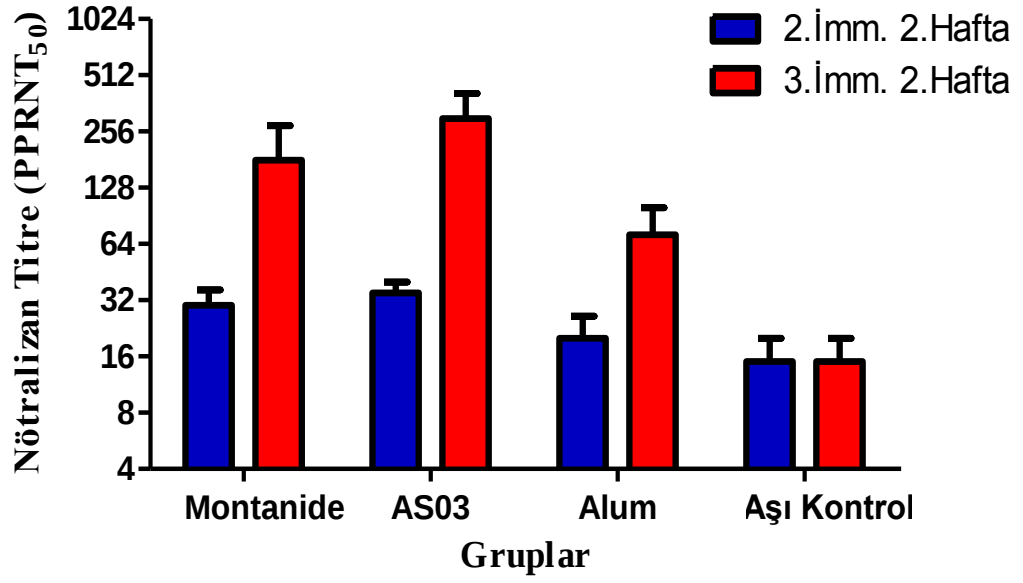
Montanide, AS03, Alum ve sadece 10 µg aşı antijeni grupların hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan immünizasyonları sonucunda oluşan nötralizan antikor etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla PPRNT yapıldı (Tablo 6, Grafik 9).

Her dört grupta da birinci immünizasyon sonucunda nötralizan titrelerin sınırdan pozitif veya negatif olduğu görüldü. İkinci immünizasyonlarda ise tüm gruplarda 1:10-1:40 arasında olan nötralizan antikorlar; üçüncü immünizasyonlarda ortalama olarak AS03 grubunda 1:300, Montanide grubunda 1:180, Alum grubunda 1:70 sadece aşı antijeni içeren grupta ise 1:15 olarak hesaplandı (Tablo 6, Grafik 9).

Tablo 6. Farklı adjuvantlarla ve adjuvantsız (aşı kontrol) 10 µg dozla yapılan 2. ve 3. immünizasyonlara ait nötralizan antikor titreler

Adjuvant Denemesi (PPRNT ₅₀)								
Fare No	2. immünizasyon				3. immünizasyon			
	Montanide	AS03	Alum	Aşı Kontrol	Montanide	AS03	Alum	Aşı Kontrol
1	1:10	1:40	1:10	1:10	1:40	1:40	1:40	1:10
2	1:40	1:40	1:40	1:10	1:640	1:640	1:160	1:10
3	1:40	1:40	1:40	1:10	1:40	1:160	1:160	1:10
4	1:40	1:40	1:10	1:40	1:160	1:640	1:40	1:40
5	1:10	1:40	1:10	1:10	1:40	1:160	1:10	1:10
6	1:40	1:10	1:10	1:10	1:160	1:160	1:20	1:10

Adjuvant Denemesi



Grafik 9. Montanide, AS03, Alum ve aşı kontrol (adjuvantsız) gruplarına ait 10 µg doz ile yapılan 2. ve 3. immünizasyon sonrası nötralizan antikor titre seviyeleri

6. TARTIŞMA

Enfeksiyöz hastalıklar, günümüzde halk sağlığı açısından en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden olmaya devam etmektedirler. Viral hemorajik hastalıklar birçok ülkede olduğu gibi son yıllarda ülkemizde de görülmekte, hem toplum genelini hem de halk sağlığı çalışanlarını tehdit etmektedir. Önemli viral hemorajik hastalığa neden olan bazı virüsler (Lassa, Marburg, Ebola, Dengue, Hanta ve Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı virüsleri vb.) bir enfeksiyon ajanı olarak toplum sağlığını tehdit ederken aynı zamanda biyolojik silah olarak kullanılma potansiyelinde olmaları nedeniyle ayrı bir önem atfedilmesine neden olmaktadır (111). Kırım-Kongo kanamalı ateş hastalığı virüsü, Dengue virüsünden sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ve viral hemorajiye neden olan bir virüstür (1).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığının spesifik bir tedavisi yoktur, olgularda yalnızca destek tedavisi uygulanmaktadır. Maalesef KKKAH'ye karşı koruyucu bir aşı da mevcut değildir. Klinik olarak ülkemizdeki ilk vakalar 2002 yılında görülmüştür. Takip eden yıllar KKKAH vaka sayısı artışını beraberinde getirmiş olup virüsün epidemiyolojisi, genetik farklılıkları ve insidensi hakkında az sayıda bilgi mevcuttur. Ülkemizde 2002-2013 yılları arasında 8000'den fazla KKKAH teşhisi konulmuş vaka bildirilmiş olup mortalite oranının %5 civarında olduğu belirtilmiştir. Ülkemiz KKKAH yönünden dünyadaki en büyük salgınları yaşamakta ve hastalık giderek daha geniş bir coğrafyaya yayılma eğilimi göstermektedir (11, 47, 112).

Bu çalışmanın amacı, spesifik bir tedavisi ve koruyucu aşısı olmayan KKKAH'ye karşı hücre kültür tabanlı inaktif aşı geliştirilmesidir. Günümüzde

FDA tarafından onaylı hücre kültür üretimine dayalı çok sayıda inaktif aşı bulunmaktadır. Poliovirus aşısı IPOL®, Japon ensefalit aşısı IXARIO®, kuduz Aşısı RabAvert®, hepatitis A aşısı HAVRIX® bunlardan bazılarıdır. IXARIO® ve IPOL® aşıları Vero hücre kültürlerde üretilmektedir. Aynı zamanda IXARIO®, IPOL® ve HAVRIX® formalin ile inaktive edilmekte IXARIO® ve Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent gibi bazı aşılar ise sükröz dansite gradiyent ultrantrifügasyon metot ile pürifiye edilerek hazırlanmaktadır. Yine IXARIO® ve HAVRIX® aşıları alüminyum hidroksit ile adjuvanize edilmektedir (113).

Gelişen aşı teknolojisiyle, günümüzde kullanım alanı bulan birçok aşı platformu (attenüe, inaktif, subunit, toksoid, polisakkarid, DNA aşıları vb.) oluşmuş ve Bunyaviruslara karşı aşı çalışmaları özellikle son yıllarda artış göstermiştir. Günümüzde KKKAH'ye karşı FDA tarafından onaylı etkili ve güvenilir bir aşı geliştirilememiştir. Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı gibi yüksek patojeniteye sahip, zoonotik önemi bulunan viral hastalıklara karşı aşı geliştirmek için gelişmiş biyogüvenlikli laboratuvarlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bir hayvan modeli olmayışı da KKKAH'ye karşı tedavi ve aşı geliştirilmesini zorlaştırmıştır (47, 92).

İnaktif aşılar, virüslerin enfektiviteleri ortadan kaldırıldığı için güvenilirdirler. İnaktivasyon işleminde genellikle formaldehit tercih edilmektedir. Formaldehitin viral ve bakteriyel aşılarda hazırlanmasında kullanımı çok uzun ve güvenilir bir geçmişe sahiptir. Virüsün inaktivasyonunun yanı sıra aşıda olabilecek istenmeyen bakterilerin inaktivasyonu ve toksinlerin detoksifiye edilmesinde de etkili olmaktadır (114). Formalinin çeşitli yollardan özellikle aktivasyon açısından önemli protein bölgelerine reverzibl bağlanarak irreverzibl

inaktivasyon şekillendirdiği, başka bir teori de virüsleri ısıya hiç olmadığından daha hassas hale getirerek etki ettiği düşünülmektedir (115). İnaktif aşılar, ayrıca dondurma işlemi gerektirmezler, kolay saklanabilir ve transport edilebilir özelliktedirler. Genellikle humoral immüniteyi özellikle de nötralizan antikor yanıtı dahi iyi uyardıkları bilinmektedir. Bazen yeterli seviyelerde immün yanıt oluşturmaları da tekrar doz ve çeşitli adjuvantlar ile birlikte bu sorun ortadan kaldırılabilmektedir. İnsan sağlığı için aşılar da kullanılan ve güvenilir olduğu kabul edilen adjuvantlar genellikle alüminyum hidroksit ve çeşitli alüminyum tuzlarının karışımlarından oluşmakta ve FDA tarafından onaylanan çoğu aşıda bu tip adjuvantlar kullanılmaktadır. Bu tür bileşikler aşısındaki antijenlere bağlanarak enjeksiyon bölgesinde yavaş salınmalarını sağlarlar. Ayrıca enjekte edilen bölgede, immün yanıtın uyarılmaya başlanacağı lenf nodüllerine dağılmalarına yardımcı olurlar. Antijenlerin yavaş salınmaları ve lenf nodüllerine dağılmasıyla antijene spesifik güçlü bir antikor yanıt meydana gelir. Alum adjuvantlar aynı zamanda makrofaj gibi hücrelerce alınarak antijenlerin lenfositlere sunulmalarında etkili olmaktadır (114).

Vero hücre kültürleri 1962 yılında normal yetişkin bir Afrika yeşil maymunu böbreğinden elde edilmiştir ve uzun yıllardan beri virüs, aşı, ilaç, biyokimyasal testler ve laboratuvar tekniklerinde kullanılmaktadır. Tümörojenite ve onkojenite testleri ile bakteriyel, mantar ve viral kontaminasyonlar açısından da steril olduğu belirtilmiştir. Halen de birçok aşının kolay üretilmesi ve pürifiye edilebilmesi açısından tercih edilmektedir (116, 117, 118).

Bunyaviridae ailesine mensup diğer genuslarda da inaktif hücre kültür aşılarının etkinliği çalışılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Vero hücre kültürlerinde

retilerek sükroz dansite gradiyent ultrasantrifügasyon metotla pürifiye edilen Hantavirüs suu formaldehit ile inaktive edilerek alüminyum hidroksit ile adjuvanize hale getirildikten sonra BALB/c farelerde aının etkinliği Kore’de lisanslanan fare beyinlerinden üretilen inaktif Hantavax adlı aı ile karılatırılmı ve renal sendromlu hemorajik ateş (HFRS)’e karşı etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucuna göre 5 µg gibi çok düşük dozlarda bile Hantavax aısının en yüksek 40 µg olan dozundan bile daha yüksek nötralizan antikor yanıt oluşturduğu gösterilmiştir. Eprvasyon yapıldığında düşük dozlarda dalak ve akciğerde viral replikasyonun Hantavax ile immünize farelerde nlenemezken inaktif hücre kültür aının hiçbir dozunda viral replikasyon oluşmadığı bildirilmiştir (119). Benzer ekilde Rift Vadisi humması (RVF) hastalığına karşı geliştirilen NDBR 103 ve TSI-GSD 200 adlı aılar hücre kültür formalin inaktif aılardan bir kağı olup hem laboratuvar hayvanlarında hem de gönüllü insanlar üzerinde koruyucu antikor yanıt oluşturdukları bildirilmiştir (119, 120).

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığına karşı aı alımaları, Sovyet Poliyomiyelit ve Viral Ensefalit Enstitüsü araştırmacıları tarafından yavru fare ve rat beyinlerinden geliştirilen deneysel bir aı çalışmasıyla balamıtır. Beyin homojenatları formaldehit ve ısı ile inaktive edilip aının etkinliği komplement fiksasyon (CF) test ile belirlenmiştir. İlk deneysel immünojenite çalışmaları yeni doğan ratlarda 7 gün aralıklarla intraperitoneal olarak yapıldığı ve antikor yanıtı oluştuğu bildirilmiştir. Az sayıdaki gönüllü insanlar üzerinde yapılan denemelerde önemli yan etkilere rastlanmadığı bildirilmiştir. Geliştirilen aı 1970 yılında Sovyetler Birliği Sağlık Bakanlığı tarafından onaylandıktan sonra yaklaşık 2000 kadar sağlıklı insanda uygulandığı bildirilmiştir.  kez yapılan aılama

sonrasında toplanan serumlar CF, agar jel difüzyon ve presipitasyon teknikleri ile test edilip üçüncü immünizasyondan bir ay sonra %5.7 ve daha düşük antikor oluştuğu, serumların %42'sinin antikor pozitif olduğu bildirilmiştir. Nötralizan antikorların üçüncü immünizasyondan sonra 1 ile 4 hafta içerisinde oluştuğu ancak, 3-6 ay sonra titrenin azaldığı kaydedilmiştir. Yaklaşık 1500 kişi 1971 yılında tekrar aşılanmış ve 1 ay ile 6 ay içerisinde antikor yanıtın artışı görüldüğü ancak, aşının koruyucu etkisini gösteren çalışmalara rastlanmamıştır. Sovyet aşısı 1974 yılında Bulgaristan'da lisanslanarak endemik bölgelerdeki askeri ve sağlık çalışanları ile tarım çalışanlarında kullanıldığı bildirilmiştir. Son zamanlarda Bulgaristan'da yapılan 22 yıllık değerlendirme çalışmasında 1953 ile 1974 yılları arasında 1105 olan vaka sayısı 1975 ile 1996 yılları arasında 279'a kadar düşerek yaklaşık 4 kat azalmış olduğuna dikkat çekilmiştir. Ayrıca 1997'den 2011 yılına kadar her yıl 20'den az vaka kaydedilmiştir. Ancak, ne var ki aşılanan bireylerde hastalık oluşup oluşmadığına dair veriler bildirilmemiştir. Bu durum, aşının hastalığa karşı etkili olduğunu ya da olmadığını göstermemektedir. Bu 22 yıllık uzun bir dönem içerisindeki azalışta; insanların davranışları, koruyucu önlemlerin alınması, mevsimsel değişiklikler, virüs ve vektörlerin epidemiyolojik ve ekolojik şartlarındaki değişikliklerin de etkili olması mümkündür (14, 92, 121, 122). Mevcut verilerin Rusça olarak sunulması, kontrollerinin olmaması ve aşının koruyucu etkisine dair verilerin bulunmaması nedeniyle bu çalışmayla elde edilen verilerin, bu konuda ilk aşı olan ve sadece Bulgaristan'da kullanılan aşı ile ilgili verilerin tartışılması maalesef mümkün olmamaktadır.

Bu çalışmayla, spesifik bir tedavisi ve koruyucu aşısı olmayan KKKAH'ye karşı Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşunun Vero E6 hücre hattında ve fare

beyninde olmak üzere iki farklı sistemde üretilmesi, konsantre edilmesi, inaktivasyonu ve pürifikasyonu yapılarak aşı antijenleri elde edilmiştir (Şekil 21). Daha sonra farklı dozlardaki (5 µg, 10 µg ve 20 µg) aşı antijeni içeren aşılar 3'er hafta ara ile 3 kez intraperitoneal olarak BALB/c farelerine verilmiştir. Uzun süreli takip edilen fare gruplarında (aşılardan sonraki 12 ay) gerek ELISA gerekse de nötralizan antikor titreleri karşılaştırıldığında hücre kültür tabanlı aşının yeni doğan fare yavrularının beyinde üretilerek hazırlanan aşıya göre daha yüksek IgG titrelerine ve nötralizan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Grafik 6, Grafik 7).

Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs suşu hücre kültür sisteminde plak oluşturmamaktadır. Bu çalışmada, plak oluşturmayan Turkey-Kelkit06 KKKAH virüs titresinin belirlenmesi amacıyla psödo-plak testi ve nötralizasyon titrelerinin belirlenmesi amacıyla psödo-plak redüksiyon nötralizasyon testi (PPRNT) geliştirilmiştir. Geliştirilen bu testler, immüno Floresan tabanlı testlerle karşılaştırıldığında elde edilen titreler bakımından önemli farkların bulunmadığı hatta PPRNT'nin daha hassas olduğu gösterilmiştir (7, 84). Ayrıca bu tekniklerde oluşan plaklar, hem daha uzun süreli kalabilmekte hem de Floresan mikroskoba gerek kalmadan çıplak gözle veya ışık mikroskopuyla görüntülenebilmektedir. Bu çalışmadaki virüs titre hesaplamalarında immüno Floresan testlerine göre daha avantajlı olan psödo-plak testi ve nötralizan titrelerin belirlenmesinde PPRNT testleri kullanıldı (7, 84).

Fare beyni aşısı ile aşılanan farelere ait serumlar ELISA ile IgG yönünden test edildiğinde tüm gruplardaki farelerde antikor yanıtlar olduğu ve en yüksek IgG antikor yanıtların 4. ayda olduğu saptanmıştır. Doz gruplarında (5 µg, 10 µg

ve 20 µg) ortalama IgG yanıtlar sırasıyla 1:128000, 1:140800 ve 1:170667 olarak belirlenmiş ve IgG titreleri 6. aydan 12. aya kadar azalma trendi göstermiştir. Tüm doz gruplarında 12. ayda en son ölçülen antikor yanıtlar ortalama 1:200-1:500 arasındadır (Grafik 7). Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile aşılanan farelere ait serumlarda ELISA ile IgG antikor yanıtlar değerlendirildiğinde fare beyni aşısı ile benzer şekilde ilk immünizasyon sonrasında IgG yanıtların bütün gruplarda olduğu gözlenmiştir (Grafik 3). Tüm doz gruplarında ilk immünizasyondaki IgG yanıtlar 1:450-1:1333 arasında ölçülmüştür (Tablo 2). En yüksek IgG antikor yanıtlara 4. ayda rastlanmıştır. Tüm doz gruplarında ise ortalama IgG yanıtlar sırasıyla 1:170667, 1:245760, 1:273067 olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde IgG antikor yanıtlar 6. aydan 12. aya kadar azalarak devam etmektedir. Bütün doz gruplarında 12. ayda en son ölçülen antikor yanıtlar ortalama 1:533-1:700 arasındadır (Grafik 7). Bu sonuçlar, hücre kültür tabanlı aşının IgG titrelerinin fare beyninden hazırlanan aşıya karşı oluşan IgG titrelerine göre çok daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Beklendiği gibi her iki aşı grubunda da titrelerin doza bağlı olarak yükselmiş olduğu tespit edilmiştir. Ghiasi ve ark. ürettikleri Gn ve Gc glikoproteinlerini sentez eden transjenik tütün bitkisi ile yaptıkları çalışmada, deneyin pozitif kontrolü olarak Bul-Bio tarafından temin ettikleri fare beyni aşısını kullanmışlardır. BALB/c fareler, 2 hafta aralıklarla deri altı yolla 4 kez immünize edilmiş ve IgG titresi en yüksek 1:524288 nolu serum dilüsyonuna kadar pozitiflik saptayabilmişlerdir (107). Ancak, bu çalışmada geliştirilen hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile 3 hafta aralıklarla, intraperitoneal yolla ve 3 kez immünize edildiği halde 1:273067 IgG titre belirlendi. Bu yanıt Ghiasi ve ark. elde ettikleri IgG titre ile karşılaştırıldığında yaklaşık iki kat düşük olmasının

nedeni olarak aşının immünizasyon sayısı, uygulanış yolları ve aşısındaki antijen miktarının farklı olmasından ileri geldiği düşünülmüştür. Bunlara ilaveten Ghiasi ve ark. yaptıkları çalışmada uzun süreli immün yanıtlar değerlendirilmemiş ve nötralizan antikor yanıtlar bildirilmemiştir (107). Bulgaristan'da gönüllü insanlar üzerinde yapılan bir aşı çalışmasında düzenli olarak ve iki yıl arayla yapılan aşılamada önemli derecede antikor yanıt oluştuğu bildirilmiştir. Komplement fiksasyon testi ile aşılama öncesi 1:2 ve 1:16 arasında olan titreler tekrar doz aşı yapıldıktan sonra 2 ile 4 kat kadar artış gösterdiği belirtilmiştir. Üçüncü aşılama öncesine kadar ELISA ile antikor yanıtlar test edildiğinde, ya sınırda pozitif ya da çok zayıf pozitiflik gösterdiği belirtilirken, 3. aşılama sonrasında hem CF hem de ELISA ile önemli derecede antikor yanıt oluştuğu bildirilmiştir (105).

Aşılama sonrası oluşan nötralizan antikor yanıtlar PPRNT ile ölçüldüğünde birinci immünizasyonda hem hücre kültür tabanlı inaktif aşı hem de fare beyni aşısında bütün doz gruplarında negatif kontroller arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Titreler sınırda pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ancak, ikinci aşılama sonrasında önemli derecede nötralizan antikor yanıtların oluştuğu görülmüştür (Tablo 3, Tablo 4, Grafik 5). Fare beyni aşısında nötralizan antikorlar sadece 20 µg doz grubunda 2. ayda en yüksek seviyelere (1:5-1:128) ulaştığı ve 12. aya kadar azalarak (1:8-1:32) devam ettiği görülmüştür. Hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile immünize edilen farelerde ise en yüksek seviyelere aynı şekilde 20 µg doz grubunda rastlanmıştır. Ancak, fare beyni aşısından farklı olarak en yüksek 4. ayda ve yaklaşık dört kat daha yüksek (1:16-1:512) nötralizan antikor yanıt oluştuğu görülmüştür. Hücre kültür tabanlı inaktif aşının tüm doz gruplarında nötralizan antikorlar 12. aya kadar azalarak devam ettiği ve fare beyni

aşısından iki kat daha yüksek (1:16-1:64) olduğu belirlenmiştir (Grafik 6). Bu sonuçlar, hücre kültür tabanlı aşının nötralizasyon titrelerinin fare beyninden hazırlanan aşıya karşı oluşan nötralizasyon titrelerine göre çok daha yüksek olduğunu ve her iki aşı grubunda da nötralizasyon titrelerin doza bağlı olarak yükselmiş olduğunu göstermektedir. K. Spik ve ark. KKKAH'ye karşı dizayn ettikleri DNA aşısı ile BALB/c fareleri üç kez gen tabancasıyla immunize etmişlerdir. Çalışmada kullanılan farelerin sadece yarısında nötralizan titrelerin geliştiği bildirilmiştir. Oluşan en yüksek nötralizan antikor yanıtların 1:160'a yakın olduğu belirtilmiştir (106). Bu çalışmada geliştirilen hücre kültür tabanlı inaktif aşının, nötralizan antikor yanıtları ise üç immunizasyon sonrası 1:640'a yakın olduğu ve K. Spik ve ark. dizayn ettikleri DNA aşısından, yaklaşık 4 kat daha yüksek nötralizan antikor yanıt oluşturduğu görülmüştür. Her ne kadar KKKAH ile ilgili aşı ve nötralizan antikor titre çalışmaları yok denecek kadar az olsa da hücre kültür tabanlı inaktif aşının, nötralizan antikor yanıtının üç immunizasyon sonrası 1:640'a kadar yükselmesi etkin bir şekilde aşının nötralizan antikorları oluşturduğunu göstermektedir.

Hücre kültür tabanlı olarak geliştirilen KKKAH aşısının fare beyninden hazırlanan aşıya göre daha immünojenik olduğu belirlenmiş olup ayrıca bu çalışmada, geliştirilen hücre kültür tabanlı inaktif aşının 10 µg sabit dozda farklı adjuvantlar ile (Alum, AS03 ve Montanide) immunizasyonları yapılarak adjuvantların IgG titreleri ve nötralizasyon titreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Genel anlamda, adjuvant gruplarındaki IgG titreleri, adjuvant kullanılmayan gruptan 4 ile 17 kata kadar varan titre artışları göstermektedir. ELISA sonuçlarına göre Alum adjuvant grubu üçüncü immunizasyondan sonra diğer adjuvant

gruplarına göre daha iyi IgG yanıt oluşturmaktadır (Grafik 8, Tablo 5). Ancak, nötralizan antikor yanıtlar karşılaştırıldığında üçüncü immünizasyonlarda ortalama PPRNT₅₀ titreleri AS03 grubunda 1:300, Montanide grubunda 1:180, Alum grubunda 1:70, adjuvant kullanılmayan grupta ise 1:10 olarak belirlenmiştir (Tablo 6, Grafik 9). Yapılan bu çalışmada en yüksek nötralizan antikor titresini uyaran AS03 adjuvantı, su bazlı yağlı emülsiyon bir adjuvanttır ve immün sistemi çok güçlü bir şekilde uyardığı bilinmektedir. Ayrıca Avrupa ülkelerinde lisanslanan pandemik grip aşılarında (Pandemrix) adjuvant olarak kullanılmaktadır. AS03 ile adjuvanize aşılar ile immünize bireylerde narkolepsi gibi sendromlar çok sık görülse de bunun henüz adjuvanttan kaynaklandığı gösterilememiştir (123, 124). Hücre kültür tabanlı olarak geliştirilen KKKAH aşısında nötralizan titreyi güçlü bir şekilde uyaran diğer bir adjuvant olup Montanide ise yağlı bir adjuvanttır ve enjeksiyon bölgesinde hücresel hasarlar meydana getirerek hücresel sinyal salınımına neden olurlar. Böylece adjuvant etkinliklerini arttırırlar. Adjuvant olarak Montanide kullanımının bazı çalışmalarda istenmeyen lokal reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Bazı klinik çalışmalarda kullanımına devam edilse de insan aşılarında kullanımına henüz izin verilmemiştir (125, 126, 127). Alum grubunda ELISA ile yüksek seviyede IgG yanıtlar alınırken nötralizan antikor titreler diğer iki adjuvanta kıyasla düşük çıkmaktadır. Bu duruma adjuvantların hücresel ve humoral immün yanıtları birbirlerinden farklı şekillerde uyarması neden olduğu düşünülmektedir. Alum, insan aşılarında sık kullanılan ve FDA tarafından kullanımına izin verilen bir adjuvanttır. Antijen sunan hücreler (APC)'in depo etkileri ve aktivasyonunu

sağlayarak T hücrelerini çok güçlü bir şekilde uyarır. Böylece hem güçlü hem de uzun süreli bir immün yanıt oluşturmaktadır (125, 128, 129).

Sonuç olarak bu çalışmada, IgG titreler ve nötralizan antikor yanıtları benzer şekilde doza bağlı titre artışı göstermektedir. Her iki aşıda da en yüksek IgG antikor yanıtın 20 µg doz gruplarında olduğu görülmüştür. Ancak, hücre kültür tabanlı inaktif aşı ile yapılan immünizasyonlarda fare beyni aşısı ile yapılan immünizasyonlara göre daha yüksek IgG antikor yanıtlar oluşmaktadır. Her ne kadar IgG antikor yanıtlara, birinci immünizasyonlarda rastlansa da nötralizan antikorların oluşması için tek doz aşı yeterli olmamakta en az iki immünizasyonun gerekli olduğu görülmektedir. Bu duruma inaktif aşılar da çok sık rastlanmaktadır. Ancak, ilave üçüncü bir doz daha yapıldığında nötralizan titreler önemli derecede artmakta ve bir yıl boyunca azalarak devam etmektedir. Bu çalışmada geliştirilen hücre kültür tabanlı inaktif aşı ve fare beyni aşısı karşılaştırıldığında hem IgG yanıt hem de nötralizan antikor yanıtlar arasında iki ile dört kat arasında fark olduğu görülmektedir. Fare beyni aşısının hazırlanmasında farklı olarak fare beyni proteinlerinin uzaklaştırılması için protamin sülfat kullanıldı. Protamin sülfatın proteinlerin doğal konformasyonlarında bazı değişikliklere neden olabileceği böylece oluşan antikor yanıtlar arasındaki farklılıkların bu durumdan ileri gelebileceği, benzer bir aşı çalışmasında da ileri sürülmüştür (130).

Yapılan bu çalışmada KKKAH'ye karşı hem hücre kültür tabanlı inaktif aşı hem de fare beyni aşısı geliştirilmiştir. Aşılar Turkey-Kelkit06 KKKAHV suşu kullanılarak Vero E6 hücre kültürlerinden ve yavru fare beyinlerinden üretilerek hazırlanmıştır. Virüs çöktürme ve konsantre işlemleri yapıldıktan sonra süzkroz dansite gradiyent ultrasantifügasyon ile pürifiye edilen virüsler formalin ile

inaktive edilmiştir. Farklı dozlarda ve farklı adjuvantlar ile birlikte aşılar BALB/c farelerde test edilerek ELISA ve nötralizan antikor titreleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmayla, ilk kez KKKAH'ye karşı hücre kültür tabanlı inaktif bir aşı geliştirilmiş ve bazı immünolojik parametreleri karakterize edilmiştir.

Deneysel hayvan modeli olmayışı geliştirilen aşının gerçek etkinliğinin belirlenmesini güçleştirmektedir. Ancak, son yıllarda geliştirilen IFNAR^{-/-} ve STAT-1 KO fare modelleri ile aşının koruyucu etkinliğinin tam manasıyla ortaya konması gerekmektedir. Günümüzde KKKAH'ye karşı FDA tarafından onaylı etkili ve güvenilir bir aşı bulunmamaktadır. Şimdilik KKKAH'ye karşı kullanılan tek aşı Bulgaristan'da BulBio-NCIPD Ltd. tarafından üretilmektedir. Ancak, aşının etkinliği tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca fare beyinlerinden üretilmesinden dolayı myelin bazlı proteinler tarafından otoimmün ve alerjik reaksiyonları tetikleme riskleri bulunmaktadır.

Son zamanlarda ülkemizde artan KKKAH vaka sayıları ve spesifik bir tedavisi olmayışı dikkate alındığında insan sağlığında kullanıma uygun güvenli aşılar ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada geliştirilen hücre kültür tabanlı inaktif KKKAH aşısının deneysel çalışma sonuçlarına göre KKKAH'ye karşı koruyucu ve etkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber, geliştirilen KKKAH aşısının IFNAR^{-/-} veya STAT-1 KO gibi fare modelleri üzerinde koruyuculuk yönünden detaylı çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006; 6(4): 203-214.
2. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2004; 64(3): 145-160.
3. Ergonul O. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol* 2012; 2 (2): 215-220.
4. US Department of health and human services, National Institutes of Health. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. NIAID Biodefense Research Agenda for Category B and C Priority Pathogens. NIH Publication No. 03-5315: 2003.
5. Gale P, Estrada-Peña A, Martinez M, et al. The feasibility of developing a risk assessment for the impact of climate change on the emergence of Crimean- Congo haemorrhagic fever in livestock in Europe. *J Appl Microbiol* 2010; 108(6): 1859-1870.
6. Nabeth P, Cheikh DO, Lo B, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(12): 2143-2149.
7. Berber E, Canakoglu N, Yoruk MD, et al. Application of the pseudo-plaque assay for detection and titration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol Methods* 2013; 187(1): 26-31.
8. Ergonul O. Treatment of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 2008; 78(1): 125-131.
9. Maltezou HC, Papa A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: epidemiological trends and controversies in treatment. *BMC Med* 2011; 9(1): 131.
10. Tonbak S, Aktas M, Ozdarendeli A, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Genetic Analysis and Tick Survey in Turkey. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11): 4120-4124.
11. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, et al. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res* 2013; 98(2): 248-260.
12. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu, Ankara: TTB yayınları 2010.
13. Chinikar S, Mirahmadi R, Moradi M, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF). In: Lorenzo-Morales J (Editor). *Zoonosis*. Chapter 11. ISBN: 978-953-51-0479-7, InTech. 2012; 193-212.
14. Morikawa S, Saijo M, Kurane I. Recent progress in molecular biology of Crimean–Congo hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30(5): 375-389.
15. Hoogstraal H, Kaiser MN, Traylor MA, et al. Ticks (Ixodidae) on Birds Migrating from Europe and Asia to Africa. *Bull World Health Organ* 1961; 24(2): 197-212.

16. Korolev MB, Donets MA, Rubin SG, et al. Morphology and morphogenesis of Crimean Hemorrhagic Fever Virus. *Arch Virol* 1976; 50(1-2): 169-172.
17. Casals J. Antigenic Similarity between the Virus Causing Crimean Hemorrhagic Fever and Congo Virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 131(1): 233-236.
18. Hoogstraal H. The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa. *J Med Entomol* 1979; 15(4): 307-417.
19. Vatansever Z, Uzun R, Estrada-Pena A. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. In: Ergonul O, Whitehouse CA (Editors). *A Global Perspective. Section III Crimean-Congo Hemorrhagic Fever*. 1st Edition, Netherlands: Springer 2007; 59-74.
20. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(8): 1379-1384.
21. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 1st Edition, San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.
22. Elliott RM. Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med* 1997; 3(9): 572-577.
23. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. The high genetic variation of viruses of the genus *Nairovirus* reflects the diversity of their predominant tick hosts. 2004; 318(1): 10-16.
24. Murphy FA, Harrison AK, Whitfield SG. Bunyaviridae: Morphologic and Morphogenetic Similarities of Bunyamwera Serologic Supergroup Viruses and Several Other Arthropod-Borne Viruses. *Intervirology* 1973; 1(4): 297-316.
25. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol* 2006; 80(17): 8834-8842.
26. Ozdarendeli A, Aydin K, Tonbak S, et al. Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains in Turkey. *Arch Virol* 2008; 153(1): 37-44.
27. Ozdarendeli A, Canakoglu N, Berber E, et al. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. *Virus Res* 2010; 147(2): 288-293.
28. Donets MA, Chumakov MP, Korolev MB, et al. Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever. *Intervirology* 1977; 8(5): 294-308.
29. Ellis DS, Southee T, Lloyd G, et al. Congo/Crimean haemorrhagic fever virus from Iraq 1979: I. Morphology in BHK21 cells. *Arch Virol* 1981; 70(3): 189-198.
30. Jelinkova A, Benda R, Novak M. Electron microscopic demonstration of Crimean hemorrhagic fever virus in CV-1 cells. *Acta Virol* 1975; 19(5): 369-373.

31. Appannanavar SB, Mishra B. An Update on Crimean Congo Hemorrhagic Fever. *J Glob Infect Dis* 2011; 3(3): 285-292.
32. Yen YC, Kong LX, Lee L, et al. Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34(6):1179-1182.
33. Miller BR. Arboviruses. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHV. (Editors). *Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. Section III. Exotic Virus Infections* 1st Edition, San Diego: Academic Press 2009: 24.
34. Swiss Institute of Bioinformatics. "Bunyaviridae".
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html 29.03.2013.
35. Whitehouse CA. Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus and Other Nairoviruses. In: Mahy BWC, Regenmortel MHV. (Editors). *Encyclopedia of Virology. 3rd Edition*, San Diego: Academic Press 2008: 596-603.
36. Schmaljohn CS, Hooper JW. Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. (Editor). *Fields Virology (Two Volumes). 4th Edition*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 2(2).
37. Duh D, Nichol ST, Khristova ML, et al. The complete genome sequence of a Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus isolated from an endemic region in Kosovo. *Virol J* 2008; 5:(7).
38. Honig JE, Osborne JC, Nichol ST. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus genome L RNA segment and encoded protein. *Virology* 2004; 321(1): 29-35.
39. Sanchez AJ, Vincent MJ, Nichol ST. Characterization of the Glycoproteins of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Virol* 2002; 76(14): 7263-7275.
40. Bergeron E, Albariño CG, Khristova ML, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Encoded Ovarian Tumor Protease Activity Is Dispensable for Virus RNA Polymerase Function. *J Virol* 2010; 84(1): 216-226.
41. Bergeron E, Vincent MJ, Nichol ST. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Processing by the Endoprotease SKI-1/S1P Is Critical for Virus Infectivity. *J Virol* 2007; 81(23): 13271-13276.
42. Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Glycoprotein Precursor Is Cleaved by Furin-Like and SKI-1 Proteases To Generate a Novel 38-Kilodalton Glycoprotein. *J Virol* 2006; 80(1): 514-525.
43. Vincent MJ, Sanchez AJ, Erickson BR, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol* 2003; 77(16): 8640-8649.

44. Bowen RA. Veterinary and Zoonotic Viruses. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ. (Editors). Fenner's Veterinary Virology. Part II, Chapter 22. Bunyaviridae 4th Edition, San Diego: Academic Press 2010: 371-383.
45. Bouloy M, Flick R. Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Res* 2009; 84(2): 101-118.
46. Altamura LA, Bertolotti-Ciarlet A, Teigler J, et al. Identification of a Novel C-Terminal Cleavage of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus PreGN That Leads to Generation of an NSM Protein. *J Virol* 2007; 81(12): 6632-6642.
47. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res* 2013; 100(1): 159-189.
48. Schmaljohn CS, Hooper JW. Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM. (Editors). *Fundamental Virology*. Chapter 25 4th Edition, Philadelphia: Lippincott & Wilkins Desktop Division 2001: 771-792.
49. Wang YI, Dutta S, Karlberg H, et al. Structure of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein: Superhelical Homo-Oligomers and the Role of Caspase-3 Cleavage. *J Virol* 2012; 86(22): 12294-12303.
50. Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK, et al. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(2): 664-669.
51. Xiao X, Feng Y, Zhu Z, et al. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 411(2): 253-258.
52. Simon M, Johansson CJ, Lundkvist Å, et al. Microtubule-dependent and microtubule-independent steps in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus replication cycle. *Virology* 2009; 385(2): 313-322.
53. Connolly-Andersen AM, Magnusson KE, Mirazimi A. Basolateral Entry and Release of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Polarized MDCK-1 Cells. *J Virol* 2007; 81(5): 2158-2164.
54. 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(1):210-215.
55. Schmaljohn CS, Patterson JL. Bunyaviridae and Their Replication. Fields BN, Knipe DM. (Editors). *Virology*. Part II, Chapter 41. Replication of Bunyaviridae 2nd Edition, New York: Raven Press 1990: 1175-1194.

56. Schmaljohn CS, Hooper JW. Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM. (Editors). Fields Virology Vol 1. 4th Edition, Philadelphia: Lippincott 2001: 1581-1602.
57. Haferkamp S, Fernando L, Schwarz TF, et al. Intracellular localization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus glycoproteins. *Virol J* 2005; 2(24): 42.
58. Andersson I, Simon M, Lundkvist Å, et al. Role of actin filaments in targeting of Crimean Congo hemorrhagic fever virus nucleocapsid protein to perinuclear regions of mammalian cells. *J Med Virol* 2004; 72(1): 83-93.
59. Bereczky S, Lindegren G, Karlberg H, et al. Crimean–Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol* 2010; 91(6): 1473-1477.
60. Bente DA, Alimonti JB, Shieh WJ, et al. Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in a STAT-1 Knockout Mouse Model. *J Virol* 2010; 84(21): 11089-11100.
61. Ergonul O, Tuncbilek S, Baykam N, et al. Evaluation of Serum Levels of Interleukin (IL)-6, IL-10, and Tumor Necrosis Factor- α in Patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 2006; 193(7): 941-944.
62. Peters CJ, Zaki SR. Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med* 2002; 30(5): 268-273.
63. Aleksandrowicz P, Wolf K, Falzarano D, et al. Viral haemorrhagic fever and vascular alterations. *Hamostaseologie* 2008; 28(1-2): 77-84.
64. Ergonul O. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi. *ANKEM Derg* 2009; 23(2): 234-240.
65. Kraus AA, Mirazimi A. Molecular Biology and Pathogenesis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Future Virol* 2010; 5(4): 469-479.
66. Connolly-Andersen AM, Moll G, Andersson C, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Activates Endothelial Cells. *J Virol* 2011; 85(15): 7766–7774.
67. Bodur H, Akıncı E, Öngürü P, et al. Evidence of vascular endothelial damage in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Int J Infect Dis* 2010; 148(8): e704-e707.
68. 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 Counter Proliferation and Technologies Defense Intelligence Agency: 2003.
69. World Health Organization, Department of Pandemic and Epidemic Diseases. Global Alert and Response (GAR). “Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF)” http://www.who.int/csr/disease/crimean_congoHF/en/ 29.03.2013.

70. Bell-Sakyi L, Kohl A, Bente DA, et al. Tick Cell Lines for Study of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus and Other Arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12(9): 769-781.
71. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). "Tick maps". <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET-maps-tick-species.aspx> 11.12.2013.
72. Wall RJ, Shani M. Are animal models as good as we think? *Theriogenology* 2008; 69(1): 2-9.
73. Jamila B, Hasan RS, Sarwaric AR, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: experience at a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99(8): 577-584.
74. Cevik MA, Bodur H, Gülderen E, et al. Clinical and laboratory features of Crimean-Congo hemorrhagic fever: predictors of fatality. *Int J Infect Dis* 2008; 12(4): 374-379.
75. Drosten C, Kümmerer BM, Schmitz H, et al. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res* 2003; 57(1): 61-87.
76. Mehravaran A, Moradi M, Telmadarraiy Z, et al. Molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus in ticks from southeastern Iran. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4(1): 35-38.
77. Duh D, Saksida D, Petrovec M, et al. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. *J Virol Methods* 2006; 133(2): 175-179.
78. Atkinson B, Chamberlain J, Logue CH, et al. Development of a Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12(9): 786-793.
79. Shepherd AJ, Swanepoel R, Gill DE. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and reversed passive hemagglutination for detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antigen. *J Clin Microbiol* 1988; 26(2): 347-353.
80. Saijo M, Qing T, Niikura M, et al. Recombinant Nucleoprotein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin G Antibodies to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Clin. Microbiol* May 2002; 40(5): 1587-1591.
81. Qing T, Saijo M, Zhang Y, et al. A Patient with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Serologically Diagnosed by Recombinant Nucleoprotein-Based Antibody Detection Systems. *Clin and Vac Immunol* 2003; 10(3): 489-491.
82. Saijo M, Qing T, Shimayi B, et al. Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Using a Novel Monoclonal Antibody. *J Med Virol* 2005; 77(1): 83-88.

83. Burt FJ, Leman PA, Abbott C, et al. Serodiagnosis of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever. *Epidemiol and Infect* 1994; 113(03): 551-562.
84. Canakoglu N, Berber E, Ertek M, et al. Pseudo-plaque Reduction Neutralization Test (PPRNT) for the Measurement of Neutralizing Antibodies to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Virology* 2013; 10(1): 6.
85. Yilmaz R, Kundak AA, Ozer S, et al. Successful treatment of severe Crimean-Congo hemorrhagic fever with supportive measures without ribavirin and hypothermia. *J Clin Virol* 2009; 44(2): 181-182.
86. Watts DM, Ussery MA, Nash D, et al. Inhibition of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Viral Infectivity Yields in vitro by Ribavirin. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41(5): 581-585.
87. Leysen P, De Clercq E, Neyts J. Molecular Strategies to Inhibit the Replication of RNA Viruses. *Antiviral Res* 2008; 78(1): 9-25.
88. Helen S, Randall G, Donald M, et al. . Mechanism of Action of Ribavirin in the Treatment of Chronic Hepatitis C. *Gastro & Hepatol* 2007; 3(3): 218-225.
89. Tam RC, Lau JY, Hong Z. Mechanisms of Action of Ribavirin in Antiviral Therapies. *Antivir Chem & Chemother* 2002; 12(5): 261-272.
90. Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular Mechanisms of Action of Ribavirin. *Clin Infect Dis* 1990; 12(6): 1139-1146.
91. Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of Action of Ribavirin Against Distinct Viruses. *Rev Med Virol* 2005; 16(1): 37-48.
92. Keshtkar-Jahromi M, Kuhn JH, Christova I, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: Current and Future Prospects of Vaccines and Therapies. *Antivir Res* 2011; 90(2): 85-92.
93. Khan JA, Rehman S, Fisher-Hoch SP, et al. Crimean Congo-Haemorrhagic Fever Treated with Oral Ribavirin. *The Lancet* 1995; 346(8973): 472-475.
94. Koksall I, Yılmaz G, Aksoy F, et al. The Efficacy of Ribavirin in the Treatment of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Eastern Black Sea region in Turkey. *J Clin Virol* 2010; 47(1):65-68.
95. Ergönül Ö, Çelikbaş A, Dokuzoğuz B, et al. Characteristics of Patients with Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in a Recent Outbreak in Turkey and Impact of Oral Ribavirin Therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2): 284-287.
96. Ergonul O, Celikbas A, Baykam N, et al. Analysis of Risk-Factors Among Patients with Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus Infection: Severity Criteria Revisited. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(6): 551-554.

97. Kubar A, Haciomeroglu M, Ozkul A, et al. Prompt Administration of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus Hyperimmunoglobulin in Patients Diagnosed with CCHF and Viral Load Monitorization by Reverse Transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64(5): 439-443.
98. 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): 6152-6161.
99. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 2011; 1(6): 519-525.
100. Andersson I, Lundkvist Å, Haller O, et al. Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *J Med Virol* 2006; 78(2): 216-222.
101. Andersson I, Bladh L, Mousavi-Jazi M, et al. Human MxA Protein Inhibits the Replication of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *J Virol* 2004; 78(8): 4323-4329.
102. Weber F, Mirazimi A. Interferon and cytokine responses to Crimean Congo hemorrhagic fever virus; an emerging and neglected viral zoonosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19(5-6): 395-404.
103. Kalvatchev K, Christova I. Current State Of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever In Bulgaria. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2012; 26(4): 3079-3085.
104. Papa A, Papadimitriou E, Christova I. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strain. *Scand J Infect Dis* 2011; 43(3): 225-229.
105. Mousavi-Jazi M, Karlberg H, Papa A, et al. Healthy individuals' immune response to the Bulgarian Crimean-Congo hemorrhagic fever virus vaccine. *Vaccine* 2012; 30(44): 6225-6229.
106. Spik K, Shurtleff A, McElroy AK, et al. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine* 2006; 24(21): 4657-4666.
107. Ghiasi SM, Salmanian AH, Chinikar S, et al. Mice Orally Immunized with a Transgenic Plant Expressing the Glycoprotein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18(12): 2031-2037.
108. Srivastava AK, Putnak JR, Lee SH, et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. *Vaccine* 2001; 19(31): 4557-4565.
109. Russell DW, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

110. Çanakoğlu N. Kırım Kongo Hemorajik Ateşi Virüsü Enfeksiyonuna Karşı Serolojik Teşhis Yöntemleri Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012.
111. Moran GJ, Talan DA, Abrahamian FM. Biological Terrorism. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22(1): 145-187.
112. Bodur H, Akinci E, Ascioğlu S, et al. Subclinical infections with Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(4): 640-642.
113. US Food and Drug Administration. "Complete List of Vaccines Licensed for Immunization and Distribution in the US".
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/ApprovedProducts/ucm093833.htm>
15.09.2013.
114. US Department of health and human services, National Institutes of Health. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Understanding vaccines what they are how they are work, NIH Publication No. 08-4219: 2008.
115. Woese C. Thermal Inactivation of Animal Viruses. *Ann N Y Acad Sci* 1960; 83(4): 741-75.
116. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, et al. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(5): 607-618.
117. Montagnon BJ, Vincent-Falquet JC, Saluzzo JF. Experience with vero cells at Pasteur Merieux Connaught. *Dev Biol Stand* 1998; 98: 137-140.
118. Sheets R. History and Characterization of the Vero Cell Line. Report for the Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee. 2000.
119. Ikegami T, Ikegami T, Makino S. Rift Valley Fever Vaccines. *Vaccine* 2009; 27(4): D69–D72.
120. Pittman PR, Liu CT, Cannon TL, et al. Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience. *Vaccine* 1999; 18(1-2): 181-189.
121. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA. Antibody Response in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Clin Infect Dis* 1989; 11(4): 801-806.
122. Papa A, Christova I, Papadimitriou E, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Bulgaria. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(8): 1465-1467.
123. Nohynek H, Jokinen J, Partinen M, et al. AS03 Adjuvanted AH1N1 Vaccine Associated with an Abrupt Increase in the Incidence of Childhood Narcolepsy in Finland. *PLoS One* 2012; 7(3): e33536.
124. Montomoli E, Piccirella S, Khadang B, et al. Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10(7): 1053-1061.

125. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity* 2010; 33(4): 492-503.
126. Salvador A, Igarua M, Hernández RM, et al. An Overview on the Field of Micro- and Nanotechnologies for Synthetic Peptide-Based Vaccines. *J Drug Deliv* 2011; 181646.
127. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009; 30(1): 23-32.
128. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(4): 287-293.
129. Exley C, Siesjö P, Eriksson H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol* 2010; 31(3): 103-109.
130. Choi Y, Ahn CJ, Seong KM, et al. Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine* 2003; 21(17-18): 1867–1873.

8. ÖZGEÇMİŞ

12.07.1986 yılında Trabzon'un Akçaabat ilçesinde doğdum. İlk, orta ve Lise eğitimimi Çayırbağı'nda tamamladım. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitimine başladım. 2008 yılında Veteriner Hekim olarak mezun olduktan sonra 2009 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladım. Doktora eğitimime halen aynı Anabilim Dalı'nda devam etmekteyim.