

2008 YILI KIRIM-KONGO KANAMALI ATEŞİ OLGULARININ LABORATUVAR TANISINDA PCR VE ELISA-IgM SONUÇLARININ İRDELENMESİ

EVALUATION OF PCR AND ELISA-IgM RESULTS IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF CRIMEAN-CONGO HAEMORRHAGIC FEVER CASES IN 2008 IN TURKEY

Yavuz UYAR¹, Ahmet ÇARHAN¹, Nurhan ALBAYRAK¹, Ayşe Başak ALTAŞ¹

¹ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara. (yavuz_uyar@yahoo.com)

ÖZET

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), Afrika, Asya, Doğu Avrupa ve Orta Doğu'da görülebilen ölümcül seyirli zoonotik bir viral enfeksiyondur. *Bunyaviridae* ailesi, *Nairovirus* cinsi içinde yer alan KKKA virüsü (CCHFV), insanlara *Hyalomma* ve *Ixodid* türü kenelerin ısırmasıyla bulaşmakta, ancak kan ya da kanlı vücut sıvılarıyla temas da kişiden kişiye bulaşta rol oynamaktadır. KKKA, Türkiye'de 2002 yılından bu yana endemiler yapmaya başlamış ve önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Ülkemizde CCHFV enfeksiyonlarının özgül laboratuvar tanısı ve doğrulaması Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığında moleküler ve serolojik yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Bu amaçla, Türkiye'nin her bölgesinden KKKA şüpheli olgulardan alınan serum ve/veya plazma örnekleri "olası vaka bildirim formu" ile birlikte laboratuvarımıza gönderilmektedir. Laboratuvarımızda uygulanan algoritmaya göre, olası akut olgulardan gönderilen ilk kan örnekleri, öncelikle "in house" gerçek zamanlı (real time) revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelenmekte, negatif bulunan örnekler "in house" ELISA yöntemi ile CCHFV-IgM antikor pozitifliği açısından değerlendirilmektedir. Laboratuvarımızda 2008 yılında, 2855 KKKA ön tanılı hastaya ait 4634 örnek CCHFV yönünden araştırılmış ve hastaların 1315 (%46)'inde moleküler ve/veya serolojik yöntemlerle pozitiflik belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, laboratuvarımıza en az iki örneği gönderilmiş olan, bu örneklerden en az birisinde PCR ve/veya ELISA-IgM pozitifliği saptanan ve olası vaka formunda istenilen verileri tam olan 726 olguya ait sonuçların irdelenmesi ve pozitiflik saptanma oranlarının örneklerin alınma zamanına göre değerlendirilmesidir. Çalışmamızda, olguların %94.1 (683/726)'inin ilk serum örneğinde ELISA veya PCR yöntemlerinden en az birisi ile pozitif sonuç alınmıştır. Hastaların 567 (%78.1)'si PCR ile pozitif bulunmuş; PCR negatif saptanan 159 örneğin 116 (%72.9)'sında CCHFV-IgM pozitifliği belirlenmiştir. Test sonuçları, hastalarda semptomların başlama zamanı ile klinik örneklerin alınma zamanı arasındaki süreye göre değerlendirildiğinde; ilk klinik örneğin semptomların başlamasından sonraki ilk 5 günde alındığı olgularda PCR pozitifliğinin %83.4; 6-10. günlerde alındığı olgularda ise %67.5 olduğu görülmüştür. PCR pozitiflik oranının azaldığı 5. günden itibaren ise CCHFV-IgM pozitiflik oranı %95'e ulaşmıştır. Olası olgulara ait 10. günden sonra gönderilen 196 tekrar örneğinde PCR pozitifliği saptanmamış, 153 (%78) olguda ELISA-IgM pozitifliği tespit edilmiştir. Beklenildiği gibi ilk 5 güne ait örneklerde RT-PCR ile, 5. günden sonra ise

ELISA ile IgM pozitiflik saptama oranı yüksek bulunmuştur. Ayrıca, klinik semptomların başlaması ve örneklerin alınma tarihlerinin formlara düzenli olarak kaydedilmesinin, laboratuvar yönteminin seçimi ve verilerin değerlendirilmesine ve sonuçların hızlı ve güvenilir şekilde bildirilmesine yardımcı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Kırım-Kongo kanamalı ateşi, tanı, PCR, ELISA, Türkiye.

ABSTRACT

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a fatal zoonotic viral haemorrhagic infection described in Africa, Asia, Eastern Europe, and the Middle East. CCHF virus (CCHFV) classified in *Bunyaviridae* family and *Nairovirus* genus, is transmitted to humans by tick (*Hyalomma* and *Ixodid*) bites and human to human transmission may occur by direct contact with blood or other infected tissues. The disease became endemic and a public health problem since 2002 outbreak in Turkey. The specific laboratory diagnosis and confirmation of the disease is performed in Refik Saydam National Public Health Agency, by using molecular and serological methods. For this purpose serum and/or plasma samples from suspected CCHF patients are submitted to the reference laboratory with an official "possible case report form". According to the algorithm in our laboratory, the first samples which were sent from possible acute cases were searched initially by an in-house real time-polymerase chain reaction (PCR) method and those which were found negative with PCR, were then studied by in-house ELISA method in terms of CCHF-IgM antibodies. In 2008, a total of 4634 samples obtained from 2855 CCHF suspected patients have been examined for the positivity of CCHFV, and 1315 (46%) cases were found to be positive by molecular and/or serologic methods. The aim of this study was to evaluate the results of 726 cases whose at least 2 samples were sent to laboratory, with at least 1 positivity in at least 1 clinical sample with either PCR or IgM ELISA, or both, and with complete informations in possible case report form, during 2008 in Turkey. The positive results were also analyzed according to the starting date of the complaints and the date samples received in order to evaluate the positivity rates of molecular and serological methods with regard to the time. The first serum samples in 94.1% (683/726) of cases were found to be positive with PCR and/or ELISA-IgM methods. PCR positivity was found as 78.1% (567/726), while CCHFV-IgM positivity was detected in 116 (72.9%) in the remaining 159 PCR negative samples. In the first sera, PCR and ELISA results were evaluated in relation to the start of complaints and the date samples received. After the onset of symptoms, PCR positivity was determined as 83.4% in the samples taken in the first 5 days, and reduces to 67.5% in the samples between 6-10 days. The detection rate of CCHFV-IgM increases up to 95% when PCR positivity rate decreases after the 5th day. As expected, positivity is determined to be high by PCR in the first days, and ELISA-IgM after the 5th day. In conclusion, recording clinical data such as the onset of disease and the date of sample received ensure the accurate evaluation of the disease and the laboratory results are reliably accomplished in a short time.

Key words: Crimean-Congo haemorrhagic fever, diagnosis, ELISA, PCR, Turkey.

GİRİŞ

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA), *Bunyaviridae* ailesinden *Nairovirus* cinsi içinde tanımlanan "Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV)"un etken olduğu, kene ile bulaşan zoonotik bir hastalıktır¹⁻³. Ani başlangıçlı ateş ve vücudun çeşitli bölgelerinde kanamalar ile karakterize KKKA; Doğu Avrupa, Afrika ve Balkan ülkeleri, Rusya, Orta Asya Cumhuriyetleri, Türkiye, Çin ve Orta Doğu ülkelerinden rapor edilmiş olup dünyada giderek daha önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmektedir⁴⁻⁷. CCHFV, daha önceden komşu ülkelerde serolojik olarak gösterilmesine rağmen, ülkemizde ilk olgu 2002 yı-

linda Kelkit Vadisi'nde yer alan Tokat ilinde saptanmıştır⁸. KKKA halen Türkiye'de endemik ve sporadik olgular şeklinde görülmektedir^{9,10}.

Bulaşmadan sorumlu olan kenelerden en etkin olanı *Hyalomma* cinsi kenelerdir. Bunların dışında, 28'i *Ixodid*, 2'si *Argasid* olmak üzere 30 kene türünün daha rezervuar ve vektör olduğu bildirilmiştir. Hastalık, kenelerin ısırması veya hastalığın akut safhasında olan bir hasta ya da viremik hayvanların doku, vücut sıvıları veya kanı ile temas sonucu bulaşabilmektedir^{2,3}. Hastalığın kuluçka süresi; kene ısırması sonrası ortalama 1-3 gün, enfekte insan veya hayvan kanı ve vücut sıvıları ile temastan sonra ise ortalama 5-6 gündür. Hastaların idrar ve tükürüklerinde, kanlarındaki viral yüke eş değer oranlarda viral RNA varlığı gösterilmiştir¹¹. Kişiden kişiye bulaş sonucu nadiren hastanelerde nozokomiyal salgınlar da bildirilmiştir^{4,12}.

Dünyada KKKA olgularında bildirilen mortalite oranı %5-30 arasında değişmekte olup, bu değişkenliğin hızlı ve doğru tanıyla erken ve uygun destek tedavisi ile doğru- dan ilişkili olduğu düşünülmektedir¹⁻³. Ülkemizde 2002-2008 yılları arasında; yıllar ba- zında olası ve konfirme olgu sayıları artmakla birlikte, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 3135 olgu ve 155 ölüm rapor edilmiş ve mortalite oranı %4-6.2 olarak belirlenmiş- tir^{13,14}.

KKKA hastalığı T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2003 yılından itibaren bildirim zorun- lu hastalıklar listesine alınmıştır. Epidemiyolojik risk faktörleri, klinik belirtiler ve laboratu- var bulguları KKKA ile uyumlu olan olgular "olası olgu" olarak bildirilmektedir (Tablo I).

Tablo I. KKKA Olası Olgu Tanımı*

1. Epidemiyolojik risk faktörleri	• Kene tutunma veya kene ile temas öyküsü • Hayvan çiftliklerinde çalışmak veya hayvan yetiştiricisi olmak • KKKA tanısı alan olguyla veya hastanın vücut sıvılarıyla yakın temas • Laboratuvar çalışanı olmak
2. Klinik belirtiler	• Ateş • Kanama • Akut dönemde baş ağrısı • Kas ağrısı/eklem ağrısı • Letarji • Bulantı/kusma • Karın ağrısı/ishal
3. Laboratuvar bulguları	• Trombositopeni (trombosit < 150.000/mm³) • Lökopeni (beyaz küre < 4000/mm³) • Alanin aminotransferaz artışı • Aspartat aminotransferaz artışı • Laktat dehidrogenaz artışı • Kreatin fosfokinaz artışı

* 9 no'lu kaynaktan alınmıştır.

KKKA: Kırım-Kongo kanamalı ateşi.

Enfeksiyonun özgül laboratuvar tanısı ise, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) Viroloji Laboratuvarında, kan veya vücut sıvısı örneklerinde viral nükleik asidin gerçek zamanlı (real time) revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gösterilmesi ve/veya ELISA ile anti-CCHFV IgM pozitifliğinin ya da IgG serokonversiyonunun saptanması ile yapılmaktadır.

Bu çalışmada, 2008 yılı içinde RSHMB Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarına gönderilen olası KKKA olgularına ait sonuçların değerlendirilmesi ve pozitif olguların laboratuvar tanısı açısından irdelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

2008 yılında “olası vaka bildirim formu” ile birlikte laboratuvarımıza KKKA ön tanılı 2855 hastaya ait 4634 örnek ulaştırıldı. Laboratuvarımızda uygulanan algoritmaya göre, KKKA şüpheli hastaya ait gelen ilk kan örneğinde önce RT-PCR ile inceleme yapılmakta, negatif bulunan örneklerde IgM ELISA testi çalışılmaktadır. Daha sonra aynı hastaya ait 2. bir örnek gönderilirse, bu kez önce ELISA ile IgM varlığı araştırılmakta, gerekli durumlarda RT-PCR testi çalışılmaktadır. Hastalarda, şikayetlerin başlamasından 10 gün sonra gönderilen örneklerde ise, istem dahilinde anti-CCHFV IgG antikoruna bakılmaktadır.

Bu çalışmada, laboratuvarımıza en az 2 örneği gönderilmiş olan, bu örneklerden en az birisinde RT-PCR ve/veya ELISA-IgM pozitifliği saptanan ve olası olgu formunda istenilen verileri tam olan 726 olguya ait sonuçlar irdelendi.

Klinik örneklerde CCHFV varlığının saptanması amacıyla tek aşamalı enzim karışımı (Invitrogen Superscript Platinum III, ABD) kullanılarak “in-house” RT-PCR yöntemi, Taq-Man bazlı olarak Yapar ve arkadaşlarının¹⁷ daha önce tanımladığı şekilde gerçek zamanlı PCR (Stratagene 3005, İtalya) cihazında gerçekleştirildi.

Anti-CCHFV IgM ELISA testi, CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, ABD)’den sağlanan antijen ve reaktifler kullanılarak, tanımlandığı şekilde “in-house” sandviç ELISA yöntemiyle çalışıldı. ELISA mikropiplakları 405-410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulduktan sonra ve “cut-off” değerleri hesaplandı ve sonuçlar değerlendirildi.

BULGULAR

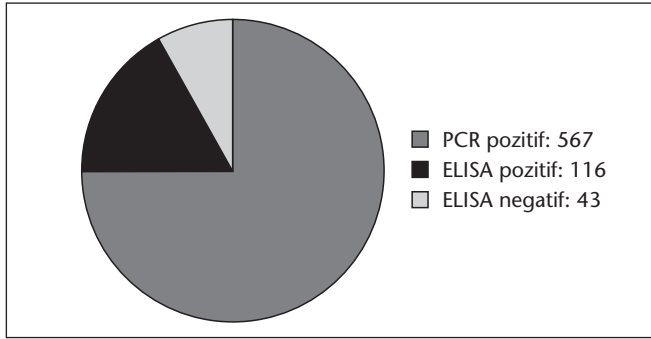
Çalışmamızda, 2855 olası KKKA olgusunun 1315 (%46)’inde moleküler veya serolojik yöntemlerden en az birisi ile CCHFV pozitifliği saptanmıştır. İrdelenmeye alınan 726 pozitif olgudan 683 (%94.1)’ünün ilk serum örneğinde ELISA veya RT-PCR yöntemlerinden en az birisi ile pozitif sonuç alınmıştır. Hastaların 567 (%78.1)’si RT-PCR ile pozitif bulunmuş; PCR negatif saptanan 159 örneğin 116 (%72.9)’sında CCHFV-IgM pozitifliği belirlenmiştir (Tablo II) (Şekil 1).

Hastalarda, semptomların başlama zamanı ile klinik örneklerin alınma zamanı arasındaki süreye göre test sonuçları irdelendiğinde; ilk klinik örneğin semptomların başlamasından sonraki ilk 5 günde alındığı olgularda RT-PCR pozitifliğinin %83.4; 6-10.

Tablo II. KKKA Olası Olgularına Ait İlk Serum Örneklerinde Saptanan RT-PCR ve ELISA Sonuçlarının, Şikayetlerin Başlama Zamanı ile Örneğin Alınma Zamanı Arasındaki Süreye Göre Dağılımı

Günler	RT-PCR			ELISA		
	Pozitif	Negatif	Pozitiflik oranı (%)	Pozitif	Negatif	Pozitiflik oranı (%)
0. gün	29	3	90.6	0	3	0
1. gün	71	16	81.6	9	7	56.2
2. gün	107	17	86.2	7	10	41.1
3. gün	101	20	83.4	9	11	45.0
4. gün	73	17	81.1	14	3	82.3
5. gün	57	14	80.2	12	2	85.7
6. gün	27	13	67.5	13	0	100.0
7. gün	38	16	70.3	15	1	93.7
8. gün	14	15	48.2	14	1	93.3
9. gün	9	6	60.0	6	0	100.0
10. gün ve üzeri	41	22	65.0	17	5	77.2
Toplam	567	159	78.1	116	43	72.9

KKKA: Kırım-Kongo kanamalı ateşi, RT-PCR: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu.

**Şekil 1.** Kırım-Kongo kanamalı ateşi olası olgularına ait "ilk örneklerde", RT-PCR ve ELISA-IgM sonuçlarına göre pozitif hastaların dağılımı.

günlerde alındığı olgularda ise %67.5 olduğu görülmüştür. PCR pozitiflik oranının azaldığı 5. günden itibaren ise CCHFV-IgM pozitiflik oranının %95'e ulaştığı dikkati çekmiştir (Tablo II).

Olası olgulara ait 10. günden sonra gönderilen 196 tekrar örneğinde RT-PCR pozitifliği saptanmamış, 153 (%78) olguda ELISA-IgM pozitifliği tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

KKKA, Türkiye’de 2002 yılında tespit edilen ilk olgudan bugüne kadar endemik ve sporadik olarak giderek artan oranda görülmeye devam etmiştir^{8,14}. Ülkemizdeki olguların %95’i İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesinin kuzeyinde, mart ve ekim ayları arasında görülmüştür. 2002-2007 yılları arasındaki pozitif olguların %70’inde kene ile temas, %30’unda evcil hayvanlarla temas öyküsü mevcut olup, 3 olguda ise nozokomiyal bulaş ortaya çıkmıştır. Türkiye’deki bu olgularda ölüm oranı %5 olarak tespit edilmiştir^{1,9,14}.

CCHFV enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilecek metotlar arasında ELISA ile antikor tayini, virus izolasyonu ve antijen saptanması ve moleküler yöntemlerle viral RNA tespiti yer almaktadır. Hastalığın 5-6. gününden itibaren serumda IgM ve IgG antikorları ELISA ile saptanabilir düzeylere ulaşmaktadır². Serumda tek başına IgM varlığı veya IgG antikor düzeyinde akut ve konvalesan faz serum örnekleri arasında 4 katlık titre artışı olması hastalık tanısını koydurmaktadır. IgM antikor varlığı 4 aya kadar kanda saptanabilirken, IgG pozitifliği 5 yıla kadar devam edebilir. Ölümcül seyreden olgularda ve genellikle hastalığın ilk birkaç gününde saptanabilir düzeyde antikor yanıtı gelişmeyebilmekte ve bu dönemde tanı, kan veya doku örneklerinden PCR, virus izolasyonu ve antijen tespiti ile konulabilmektedir^{2,15-20}.

KKKA şüpheli olgulara ait klinik örneklerde çalışma yapabilmek için laboratuvarlarda özel ekipmanlar ve yüksek güvenlik düzeylerinin sağlanması gerekmektedir. Virus izolasyonu, kan veya doku örneklerinden hastalığın ilk 5 gününde LLC-MK2, Vero, BHK-21 ve SW-13 hücre serilerinde yapılabilmeyle birlikte, biyogüvenlik düzeyi-4 laboratuvarı gerektirdiğinden ülkemizin de içinde yer aldığı birçok endemik ülkede bu yöntem uygulanmamaktadır¹⁹. Viral antijen tespiti ise, kan ve doku örneklerinde direkt immüno floresan antikor veya ELISA yöntemiyle yapılabilir^{15,17,18,20}.

Son yıllarda, viral kanamalı ateş hastalıklarının moleküler tanısında viral genomun saptanması amacıyla nükleik asit amplifikasyon teknikleri oldukça yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Viremi dönemi oldukça kısa olan KKKA olgularda, hastalığın başlangıcında henüz özgül antikorlar gelişmediğinden tanı için nükleik asit amplifikasyon teknikleri özellikle gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi tercih edilmektedir²¹. Dizi analizi teknikleri ile CCHFV’nin geniş bir genetik çeşitlilik gösterdiği ortaya konulmuştur. Ancak, Avrupa suşları (Güney-Doğu Rusya suşları ile benzer) aralarındaki genetik farklılıkların az olması nedeniyle, -Yunan suşu olan AP92 hariç- aynı grupta yer almaktadır. Türkiye’de izole edilen suşlar ise Güney-Batı Rusya ve Kosova suşları ile yakın ilişkilidir^{2,22,23}.

Ülkemizde KKKA hastalığının özgül laboratuvar tanısı Sağlık Bakanlığı RSHMB, Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı tarafından moleküler ve serolojik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. 2008 yılında olası vaka bildirim formu ile birlikte laboratuvarımıza örnekleri gönderilen KKKA ön tanılı 2855 hastanın yarısına yakınında (%46) moleküler veya serolojik yöntemlerden en az birisi ile CCHFV pozitifliği saptanmıştır. Bunlar arasından sonuçları irdelemeye alınan 726 olgunun %78.1’inde gerçek zamanlı RT-PCR ile pozitiflik bulunmuş; PCR negatif örneklerin %72.9’unda ise CCHFV-IgM poziti-

tifliği belirlenmiştir (Şekil 1). Semptomların başlama tarihi ile örneklerinin alınma tarihi arasındaki süre göz önüne alındığında, semptomların başlamasından sonraki ilk 5 günde RT-PCR pozitifliği %83.4 olarak saptanırken, bu oranın sonraki 5 günde azaldığı (%67.5) ve ELISA ile IgM antikorlarının saptanma oranının arttığı (%95) tespit edilmiştir. Dolayısıyla, şüpheli KKKA olguları için kullanılan tanı algoritmasında, 0-5. günlerde hasta örneklerinde PCR ile pozitiflik saptanma olasılığının, 5. günden sonra ise ELISA-IgM saptanma olasılığının yüksek olduğunun göz önünde tutulması uygun olacaktır. Sonuç olarak, şikayetlerin başlaması ve örneklerin alım tarihlerinin olası vaka bildirim formuna özenli ve dikkatli bir şekilde kaydedilmesi, verilerin doğru değerlendirilmesi açısından daha sağlıklı bilgi edinmemizi sağlayacak; sonuçların kısa zamanda ve güvenilir şekilde bildirilmesine yardımcı olacaktır.

TEŞEKKÜR

T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğüne ve İl Sağlık Müdürlüklerine gösterdikleri iş birliği için ve testlerin çalışılmasında gösterdikleri gayretlerinden dolayı RSHMB Viroloji Referans ve Araştırma Laboratuvarı teknik personeline teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Epidemiology of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus: Turkey, Russian Federation, Bulgaria, Greece, Albania, Kosovo. www.who.org. 11 August 2008.
2. Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 203-14.
3. Whitehouse CA. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Antivir Res* 2004; 64: 145-60.
4. Suleiman MN, Muscat-Baron JM, Harries JA, et al. Congo-Crimean haemorrhagic fever in Dubai. An outbreak at the Rashid Hospital. *Lancet* 1980; 2: 939-41.
5. Swanepoel RA, Shepherd J, Leman PA, et al. Epidemiologic and clinical features of Crimean-Congo haemorrhagic fever in southern Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 120-32.
6. Papa A, Bozovi B, Pavlidou V, Papadimitriou E, Pelemis M, Antoniadis A. Genetic detection and isolation of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus Kosovo, Yugoslavia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 852-4.
7. Ergonul O, Celikbas A, Dokuzoguz B, Eren S, Baykam N, Esener H. Characteristics of patients with Crimean-Congo haemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 284-7.
8. Gozalan A, Esen B, Fitzner J, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever cases in Turkey. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 332-6.
9. Yilmaz GR, Buzgan T, Torunoglu MA, et al. A preliminary report on Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey, March-June 2008. *Euro Surveill* 2008; 14: 13(33). pii: 18953.
10. Ertugrul B, Uyar Y, Yavas K, et al. An outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever in western Anatolia, Turkey. *Int J Infect Dis* 2009; 13: e431-6. Epub 2009 May 5.
11. Bodur H, Akıncı E, Ongürü P, et al. Detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus genome in saliva and urine. *Int J Infect Dis* 2009 Aug 3 [Epub ahead of print].
12. Van Eeden PJ, Joubert JR, Van de Wal BW, King JB, De kock A, Groenewald JH. A nosocomial outbreak of Crimean-Congo haemorrhagic fever at Tygerberg Hospital. Part 1. Clinical features. *S Afr Med J* 1985; 68: 711-7.
13. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, 2002-2008 Yılları Vaka Sayıları. <http://www.saglik.gov.tr/KKKA/>, Erişim tarihi: 25.08.2009.

14. Yılmaz GR, Buzgan T, Irmak H, et al. The epidemiology of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey, 2002-2007. *Int J Infect Dis* 2009; 13: 380-6.
15. Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Arch Iran Med* 2007; 10: 204-14.
16. Zeller H. Laboratory diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever, pp: 233-43. *Crimean-Congo Haemorrhagic Fever, A Global Perspective*. 2007. Springer, Netherlands.
17. Yapar M, Aydoğan H, Pahsa A, et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 358-62.
18. Saijo M, Tang Q, Shimay B, et al. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo haemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *J Med Virol* 2005; 77: 83-8.
19. Shepherd AJ, Swanepoel R, Leman PA, Shepherd SP. Comparison of methods for isolation and titration of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 654-6.
20. Saijo M, Qing T, Niikura M, et al. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 372-5.
21. Chinikar S, Mirahmadi R, Mazaheri V, Nabeth P, Saron MF. A survey of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Iran. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9 (Suppl 1): 81.
22. Karti SS, Odabasi Z, Korten V, et al. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1379-84.
23. Chinikar S, Goya MM, Shirzadi MR, et al. Surveillance and laboratory detection system of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Iran. *Transbound Emerg Dis* 2008; 55: 200-4.