

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'NİN AKDENİZ (ANTALYA, MERSİN,
ADANA, OSMANİYE VE HATAY) VE
İÇ ANADOLU BÖLGELERİNDEKİ (KONYA,
AKSARAY, NİĞDE, KARAMAN) BAZI İLLERDE
YAŞAYAN *Apodemus* spp., *Microtus* spp.,
Rattus spp. ve *Talpa davidiana* TÜRLERİNDE
HANTAVİRUS VARLIĞININ VE
DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI**

CEYLAN POLAT

MİKROBİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970074

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'NİN AKDENİZ (ANTALYA, MERSİN,
ADANA, OSMANİYE VE HATAY) VE
İÇ ANADOLU BÖLGELERİNDEKİ (KONYA,
AKSARAY, NİĞDE, KARAMAN) BAZI İLLERDE
YAŞAYAN *Apodemus* spp., *Microtus* spp.,
Rattus spp. ve *Talpa davidiana* TÜRLERİNDE
HANTAVİRUS VARLIĞININ VE
DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI**

CEYLAN POLAT

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İ. Mehmet Ali Öktem

Bu araştırma, TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı
(1001) tarafından 214S276 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970074

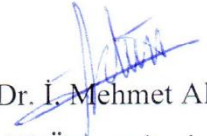
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora programı öğrencisi Ceylan POLAT "**Türkiye'nin Akdeniz (Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye ve Hatay) ve İç Anadolu Bölgelerindeki (Konya, Aksaray, Niğde, Karaman) bazı illerde yaşayan *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Rattus* spp. ve *Talpa davidiana* türlerinde Hantavirus Varlığının ve Dağılımının Araştırılması**" konulu Doktora tezini 1 Haziran 2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Y. Hakan ABACIOĞLU

İzmir Ekonomi Üniversitesi, Tıp Fakültesi

BAŞKAN

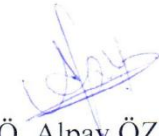


Prof. Dr. İ. Mehmet Ali ÖKTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

DANIŞMAN

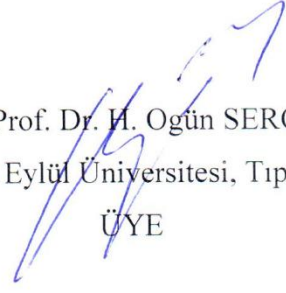
(OY KULLANMIYOR)



Doç. Dr. Ö. Alpay ÖZBEK

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

ÜYE



Prof. Dr. H. Oğün SERCAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

ÜYE



Prof. Dr. Mustafa SÖZEN

Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi

ÜYE



Doç. Dr. M. Kirami ÖLGEN

Ege Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi

ÜYE

Prof. Dr. Zeynep GÜLAY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Şöhret AYDEMİR

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1 Tarihçe.....	9
2.2 Sınıflandırma.....	10
2.3 Genom Organizasyonu.....	13
2.4 Yaşam Döngüsü	15
2.5 Konak ve Bulaş Yolları.....	18
2.6 Klinik.....	19
2.7 Patogenez	22
2.8 İmmünoloji.....	23
2.9 Epidemiyoloji.....	25
2.9.1 Türkiye’de <i>Orthohantavirus</i> Epidemiyolojisi	26
2.10 Laboratuvar Tanısı	28
2.10.1 Serolojik Tanı	28
2.10.2 Moleküler Tanı	29
2.11 Tedavi ve Korunma.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3. 1 Araştırmanın Tipi	31

3. 2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	31
3. 3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	31
3. 4 Çalışma Materyali	31
3. 5 Araştırmanın Değişkenleri	32
3. 6 Veri Toplama Araçları	33
3.6.1 Arazi Çalışmaları	36
3.6.2 Örnek Toplama	36
3.6.3 Laboratuvar Çalışmaları.....	37
3.6.3.1 Serolojik Tarama	37
3.6.3.1.1 "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA)	37
3.6.3.1.2 İmmunoblot.....	38
3.6.3.2 Moleküler Tarama	40
3.6.3.2.1 RNA/DNA İzolasyonu	40
3.6.3.2.1.1 Faz Seperasyonu	40
3.6.3.2.1.2 RNA İzolasyonu	40
3.6.3.2.1.3 DNA İzolasyonu	41
3.6.3.2.2 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	41
3.6.3.2.3 Pan-hanta L-segment Yuvalanmış PZT	42
3.6.3.2.4 <i>Microtus</i> Topluluklarının Mitokondriyal DNA (mtDNA) Soylarının Teşhisi.....	45
3.6.3.2.5 Agaroz Jel Elektforezi	46
3.6.3.2.6 Dizi Analizi	46
3. 7 Araştırma Planı ve Takvimi	47
3. 8 Verilerin Değerlendirilmesi	47
3. 9 Araştırmanın Sınırlılıkları	48
3. 10 Etik Kurul Onayı.....	48
4. BULGULAR.....	50

4.1 Örnek Grubu.....	50
4.2 Serolojik Tarama.....	56
4.2.1 ELISA	56
4.2.2 İmmunoblot.....	57
4.3 Moleküler Tarama.....	57
4.3.1 Pan-hanta L-segment Yuvalanmış PZT	57
4.3.2 <i>Microtus</i> Topluluklarının mtDNA Soylarının Teşhisi.....	58
5. TARTIŞMA.....	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR	74
8. EKLER.....	89

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bilinen <i>Orthohantavirus</i> türleri	10
Tablo 2. Klinik önemi olan <i>Orthohantavirus</i> türleri.....	20
Tablo 3. RSKA dönemleri, süreleri ve belirtileri.....	21
Tablo 4. HPS dönemleri, süreleri ve belirtileri	22
Tablo 5. Çalışma sırasında kullanılan cihaz, kimyasal ve sarf malzemelere ait bilgiler	33
Tablo 6. Pan-hantavirus L-segment taramasında kullanılan öncüller.....	42
Tablo 7. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 1. tepkimesinde kullanılan malzemelerin, konsantrasyonları ve hacimleri	42
Tablo 8. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 1. tepkimesindeki amplifikasyon koşulları	43
Tablo 9. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 2. tepkimesinde kullanılan malzemelerin, konsantrasyonları ve hacimleri	44
Tablo 10. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 2. tepkimesindeki amplifikasyon koşulları	44
Tablo 11. <i>Microtus</i> topluluklarının mtDNA soylarının teşhisinde kullanılan, <i>sitokrom-b</i> genine özgül öncül dizileri	45
Tablo 12. <i>Sitokrom-b</i> PZT'de kullanılan malzemelerin, konsantrasyonları ve hacimleri.....	45
Tablo 13. <i>Sitokrom-b</i> PZT amplifikasyon koşulları	46
Tablo 14. Araştırma planı ve takvimi	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Akdeniz Havzası'nda bulunan buzul dönem sığınakları	6
Şekil 2. Küçük memeli türlerinin Anadolu'ya giriş kapıları ve Anadolu sığınakları	7
Şekil 3. Türkiye'nin görülen bitki örtüsü tipleri	7
Şekil 4. <i>Orthohantavirus</i> virion yapısı ve bileşimi	13
Şekil 5. <i>Orthohantavirus</i> genom yapısı.....	14
Şekil 6. <i>Orthohantavirus</i> genom segmentlerinin "panhandle" yapısı	15
Şekil 7. <i>Orthohantavirus</i> yaşam döngüsü	17
Şekil 8. RSKA ve HPS olgularının ülkelere göre yıllık insidansı.....	26
Şekil 9. Türkiye'de RSKA olguları ile insanlarda ve kemiricilerde serolojik ve moleküler yöntemler ile <i>Orthohantavirus</i> varlığının bildirildiği iller	27
Şekil 10. Arazi çalışması yapılan iller.....	32
Şekil 11. <i>Orthohantavirus</i> türlerine göre oluşan IgG yanıtının immunoblot şeritlerindeki görünümü.....	38
Şekil 12. Örneklerin toplandığı lokaliteler ve türlere göre dağılımı	50
Şekil 13. Yakalanan örneklerin yıllara göre sayıları ve toplam sayıları	51
Şekil 14. Örneklerin yıllara göre dağılımı	52
Şekil 15. <i>Apodemus mystacinus</i> 'un ventral, lateral ve dorsal görünümü.....	52
Şekil 16. Arazi çalışması sonucunda <i>Apodemus</i> türlerinin yakalandığı lokaliteler.	53
Şekil 17. <i>Microtus guentheri</i> 'nin ventral, lateral ve dorsal görünümü	53
Şekil 18. Arazi çalışması sonucunda <i>Microtus</i> türlerinin yakalandığı lokaliteler.....	54
Şekil 19. Arazi çalışması sonucunda <i>Chionomys nivalis</i> örneklerinin yakalandığı lokaliteler.	54
Şekil 20. <i>Rattus norvegicus</i> 'un dorsal ve ventral görünümü	55
Şekil 21. Arazi çalışması sonucunda <i>Rattus</i> türlerinin yakalandığı lokaliteler.....	55

Şekil 22. Kemirici serumlarının çalışıldığı ELISA testine ait plak görüntüsü.....	56
Şekil 23. Seronegatif kemirici serumlarının çalışıldığı immunoblot striplerinin görünümü ...	57
Şekil 24. Örneklere ait yuvalanmış PZT ürünlerinin %1,5'luk agaroz jelde 110 voltta 50 dakika yürütülmüş görüntüsü	58
Şekil 25. <i>Microtus</i> türlerine ait <i>sitokrom-b</i> geni PZT ürünlerinin %1,5'luk agaroz jelde 110 voltta 50 dakika yürütülmüş görüntüsü	59
Şekil 26. <i>Microtus</i> mtDNA soylarının dağılımı	59
Şekil 27. DOBV Dobrava suşunun taşıyıcısı olan <i>Apodemus flavicollis</i> 'in Türkiye'deki yayılım alanları	61
Şekil 28. DOBV Saaremaa suşunun taşıyıcısı olan <i>Apodemus agrarius</i> 'un Türkiye'deki yayılım alanları	61
Şekil 29. PUUV taşıyıcısı olan <i>Myodes glareolus</i> 'un Türkiye'deki yayılım alanları.....	62
Şekil 30. SEOV taşıyıcısı olan <i>Rattus rattus</i> 'un Türkiye'deki yayılım alanları	62
Şekil 31. SEOV taşıyıcısı olan <i>Rattus norvegicus</i> 'un Türkiye'deki yayılım alanları	63
Şekil 32. TULV taşıyıcısı olan <i>Microtus arvalis</i> 'in Türkiye'deki yayılım alanları	63
Şekil 33. Çalışma kapsamında örneklem yapılan lokaliteler ve 2017 yılında bildirilen <i>Orthohantavirus</i> olguları	67
Şekil 34. Türkiye'nin yıllık yağış değişkenliği haritası	68

KISALTMALAR

AP	Alkalen fosfataz enzimi
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit
DOBV	Dobrava-Belgrade orthohantavirus
cDNA	Komplementer DNA
cRNA	Komplementer RNA
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ER	Endoplazmik retikulum
GPC	Glikoprotein öncüsü
GPS	Küresel yer belirleme sistemi
HLA	İnsan lökosit antijeni
HPS	Hantavirus pulmoner sendrom
HRP	“Horseradish” peroksidaz enzimi
HTNV	Hantaan orthohantavirus
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₂SO₄	Sülfirik asit
IFN	İnterferon
IgA	İmmunglobulin A
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IFA	İndirekt immunofloresans testi
IL	İnterlökin
Kb	Kilobaz

M	Molar
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
mRNA	Haberci ("messenger") RNA
N	Nükleokapsid
NBT/BCIP	Nitrobluetetrazoliumklorid/ 5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat
NK	Doğal öldürücü hücre
OD	Optik dansite
ORF	Açık okuma bölgesi
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PUUV	Puumala orthohantavirus
PZT	Polimeraz zincir tepkimesi
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	Ribonükleik asit
RSKA	Renal sendromlu kanamalı ateş
SEOV	Seoul orthohantavirus
SNV	Sin Nombre orthohantavirus
TAE	Tris asetat-EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TNF	Tümör nekrozis faktör
TULV	Tula virus
U	Ünite
UV	Ultraviyole ışın
VEGF	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
vRNA	Viral RNA

TEŞEKKÜR

Eğitim sürecim boyunca gelişmemde büyük emeği olan ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde beni destekleyen danışman hocam Prof. Dr. İ. Mehmet Ali Öktem başta olmak üzere tecrübeleriyle bu çalışmaya farklı bakış açıları kazandıran Prof. Dr. Mustafa Sözen ve Doç. Dr. Kirami Ölgen'e, laboratuvar çalışmalarına katkı sağlayan Dr. Ş.Orçun Kalkan, Öğr. Gör. Sercan Irmak ve Mert Erdin'e, saha çalışmalarına katkı sağlayan Ortaç Çetintaş, Dr. Öğr. Üyesi Faruk Çolak, Kürşat Kenan Kalkan, Dr. Muhsin Çoğal ve ve ayrıca yetişmemde emeği geçen diğer tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni destekleyen ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme sonsuz şükranlarımla...

Ceylan POLAT

Türkiye'nin Akdeniz (Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye ve Hatay) ve İç Anadolu Bölgelerindeki (Konya, Aksaray, Niğde, Karaman) Bazı illerde Yaşayan *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Rattus* spp. ve *Talpa davidiana* Türlerinde Hantavirüs Varlığının ve Dağılımının Araştırılması

Ceylan POLAT

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
e-posta: ceylan_polat@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Orthohantavirüsler, renal sendromlu kanamalı ateş ve hantavirüs pulmoner sendrom gibi klinik tablolar oluşturmaları nedeniyle tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. *Orthohantavirus* enfeksiyonlarında virüse karşı etkili bir antiviral ajanın bulunmaması nedeniyle, enfeksiyondan korunma önem taşımaktadır. Saha çalışmaları, kemirici populasyonlarında enfeksiyonun takibinin sağlanması, alandaki *Orthohantavirus* prevalansının belirlenmesi ve olası salgın bölgelerinin öngörülebilmesi konusunda önemli veriler sağlamaktadır.

Akdeniz ve İç Anadolu Bölgeleri'nin, Akdeniz Havzası'nda bulunan bazı buzul dönem sığınaklarını barındırması, farklı vejetasyon tiplerinin görülmesi ve bazı endemik türlerin yayılım alanları olması nedeniyle bu bölgelerde olası yeni *Orthohantavirus* türlerinin görülebileceği düşünülmüştür. Ayrıca Akdeniz ve İç Anadolu Bölgeleri'ndeki kemirici populasyonları bilinen *Orthohantavirus* türlerinin varlığı açısından şimdiye kadar taranmamıştır.

Bu çalışma ile Akdeniz ve İç Anadolu'nun Akdeniz'e komşu bölgelerindeki *Orthohantavirus* prevalansının, kemirici populasyonları arasında dolaşmakta olan *Orthohantavirus* tür/türlerinin ve taşıyıcı kemirici türlerinin saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Konya, Aksaray, Niğde ve Karaman illerinde Nisan 2015- Kasım 2017 tarihleri arasında yapılan saha çalışmaları ile *Orthohantavirus* taşıyıcısı olarak bilinen *Apodemus* spp., *Microtus* spp. ve *Rattus* spp.

türlerinden kemiriciler yakalandı. Örneklem, saha temsiliyeti göz önünde bulundurularak yapıldı. Yakalanan kemiricilere ait serum ve doku örnekleri, *Orthohantavirus* enfeksiyonları açısından serolojik ve moleküler yöntemler ile tarandı.

Bulgular: Hedef türlerden 429 kemirici yakalandı. Bu kemiricilere ait akciğer dokuları *Orthohantavirus* varlığı açısından PZT ile tarandı ve virüse rastlanmadı. Kemiricilerden 175 tanesine ait serum örnekleri orthohantavirüse karşı antikor varlığı açısından ELISA ve immüno blot yöntemleri ile tarandı ve hiçbir kemiricide seropozitiflik saptanmadı.

Sonuç: Çalışma kapsamında, uzun süreli ve mevsimlere göre dağılmış şekilde örneklem yapılmasına rağmen *Orthohantavirus* varlığına rastlanmadı. Türkiye'nin güneyinde yer alan buzul dönem sığınaklarının bulunduğu yerler ve bitki örtüsü ile *Orthohantavirus* varlığı arasında doğrudan bir bağlantı da tespit edilemedi. Türkiye'nin kuzeyi ile güneyi arasında coğrafi bariyerlerin bulunması ve virüsün doğadaki canlılığını etkileyen iklim özelliklerinin iki bölge arasında farklılık göstermesi, virüsün Türkiye'nin güney bölgelerinde saptanamaması ile ilişkilendirildi.

Anahtar Sözcükler: *Orthohantavirus*, kemirici, Türkiye

Investigation of Hantavirus Existence and Distribution in *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Rattus* spp. and *Talpa davidiana* Species in Some Provinces in Mediterranean (Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye and Hatay) and Central Anatolia (Konya, Aksaray, Niğde, Karaman) Regions of Turkey

Ceylan POLAT, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences,
Department of Microbiology and Clinical Microbiology
e-mail: ceylan_polat@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: Orthohantaviruses causes hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome which are major public health problems all over the world. Prevention from the infection is important, because of the lack of effective antiviral agents against *Orthohantavirus* infections. Therefore field works offer important data about the monitoring of the infection in rodent populations, the determination of *Orthohantavirus* prevalence and the prediction of possible outbreak regions.

Possible new *Orthohantavirus* species could be detected in the Mediterranean and Central Anatolia Regions due to the presence of some glacial period shelters in the Mediterranean Basin, the appearance of different vegetation types and the distribution of some endemic species. Mediterranean and Central Anatolia Regions are not screened in terms of *Orthohantavirus* infections until now.

This study aimed to determine *Orthohantavirus* prevalence, *Orthohantavirus* species circulating in rodent populations and carrier rodent species in Mediterranean region and some provinces of Central Anatolia which neighboring with Mediterranean region.

Method: *Apodemus* spp., *Microtus* spp. and *Rattus* spp. rodents known as *Orthohantavirus* carriers were trapped with the field works in Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Konya, Aksaray, Niğde ve Karaman provinces between April 2015 and November 2017. Sampling was done considering the field representation. The serum and tissue samples of

trapped rodents were screened for *Orthohantavirus* infections with serological and molecular methods.

Results: 429 rodents were trapped from the target species. Lung tissue samples collected from the trapped rodents were screened by PCR for the presence of *Orthohantavirus* and no virus was detected. The serum samples of 175 rodents were screened by ELISA and immunoblot for the detection of antibody presence against *Orthohantavirus* and all of them were seronegative.

Conclusion: Despite the long-term and seasonal sampling, the presence of *Orthohantavirus* was not found in this study. A direct correlation between *Orthohantavirus* presence and glacial period shelters which is located south of Turkey and its vegetation could not be detected. The presence of geographic barriers between Turkey's north and south and the differences of climate characteristics which affects the viability of the virus in nature could be related with the absence of the *Orthohantavirus* in Turkey's southern regions.

Key Words: *Orthohantavirus*, rodent, Turkey

1. GİRİŞ VE AMAC

Orthohantavirüsler, tek iplikli, negatif yönelimli, segmentli bir RNA genomuna sahip, zarflı virüslerdir (1). Doğadaki yaygın konakları, kemiriciler (1-7) ve bazı böcekçiller (1, 8-12) olmakla birlikte son yıllarda köstebekler (13, 14) ve yarasalar (1, 12, 15-18) da orthohantavirüslerin yabani hayattaki taşıyıcıları olarak bildirilmişlerdir. Genellikle enfekte kemiricilere ait dışkı, idrar gibi çıkartılardan ve salya gibi sekresyonlardan ortama saçılan viral partiküllerin solunması yolu ile insanlara bulaştığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (19). Her *Orthohantavirus* türü insanlarda klinik bakımdan belirgin enfeksiyon oluşturmamakla birlikte belli *Orthohantavirus* türleri yüksek morbidite ve mortalite gösteren klinik tablolara yol açabilmektedir. Bu klinik tablolar genellikle renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirüs pulmoner sendrom (HPS) olarak adlandırılır ve dünya üzerindeki coğrafi yayılımları farklılık gösterir (1).

Orthohantavirüsler, kesin kural olmamakla birlikte belirgin olarak kendilerine özgül kemirici türleri ile taşındığından, virüsün yayılım alanları da bu kemiricilerin yayılım alanları ile sınırlı kalmaktadır (1). Bu nedenle, RSKA tablosuna yol açan orthohantavirüsler sıklıkla bu virüslerin taşıyıcılarının endemik olduğu Avrasya'da görülürken, HPS tablosuna yol açan orthohantavirüsler ise çoğunlukla taşıyıcılarının endemik olduğu Amerika kıtasında görülmektedir (20).

Orthohantavirus enfeksiyonlarında, tanı koyulmasının zor olması ve viruse karşı etkili bir antiviral ajanın bulunmaması nedeniyle, enfeksiyondan korunma önem taşımaktadır (1, 20). Bu nedenle, sahadaki kemirici topluluklarında enfeksiyonun takibinin sağlanması, orthohantavirus yayılımı ve prevalansının belirlenmesi önemlidir. Bu veriler, olası *Orthohantavirus* salgınları açısından risk altındaki bölgelerin belirlenmesi ve salgın bölgelerinin öngörülebilmesi için önemli imkanlar sağlamaktadır.

Orthohantavirus türlerinden *Dobrava-Belgrade* (DOBV) alt tür *Dobrava* (DOB) ve *Saaremaa* (SAA), *Puumala* (PUUV), *Tula* (TULV) ve *Seoul* (SEOV) virüslerin taşıyıcısı olan kemiriciler, sırasıyla *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus*'tur. Bu kemiricilerin Türkiye'de de yayılım gösterdikleri bildirilmiştir (21-25). Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda, hem insanlarda hem de kemiricilerde saptanan *Orthohantavirus* enfeksiyonları bildirilmiştir (26-33). Ancak

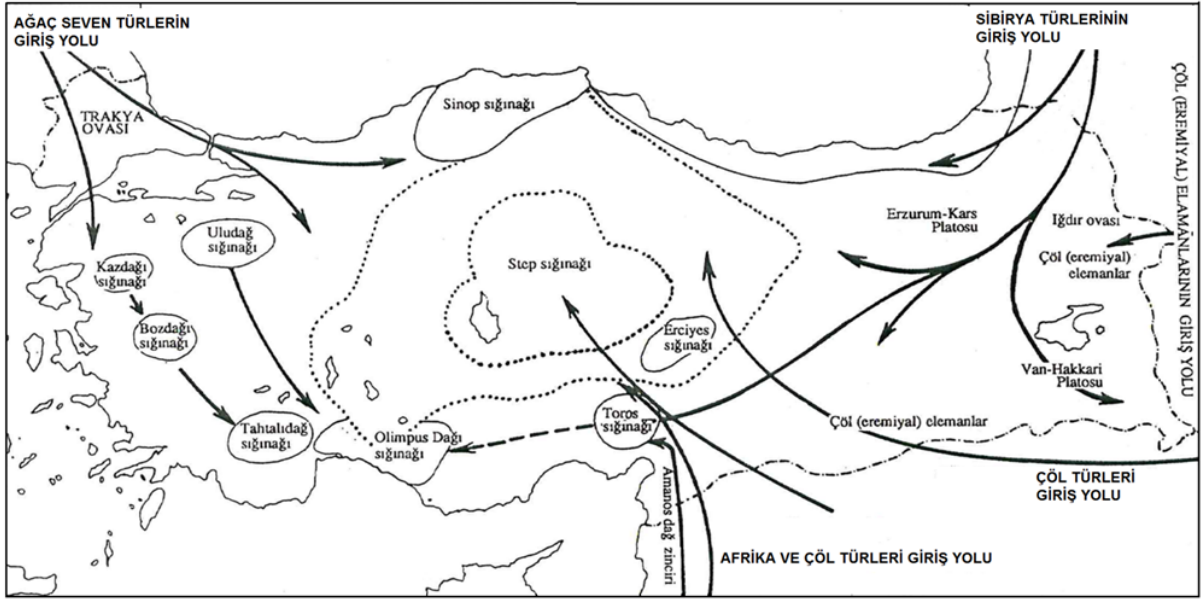
henüz arazi çalışması yapılmaması nedeniyle veri toplanamamış olan pek çok bölge bulunmaktadır.

Türkiye'nin üzerinde bulunduğu topraklar, buzul çağları sırasında küçük memeli türlerinin korunma ve barınma amacıyla toplandıkları buzul çağı sığınaklarına ev sahipliği yapmıştır (34). Küçük memeli türleri, buzul çağlarında yaşanan olumsuz koşullardan kaçarak Akdeniz Havzası'nda belirlenen, coğrafi olarak korunaklı toplam 52 buzul sığınağına saklanmışlardır. Türkiye, bu sığınaklardan altı tanesine sahiptir (Şekil 1) (34). Küçük memeli türleri, bu süreçte Anadolu'ya farklı yollardan girmişler ve bu altı noktayı sığınak olarak kullanmışlardır (Şekil 2) (35). Türkiye'de bulunan bu altı sığınaktan dördü, bu tezin çalışma alanı kapsamında olan Akdeniz Bölgesi'nde bulunmaktadır.

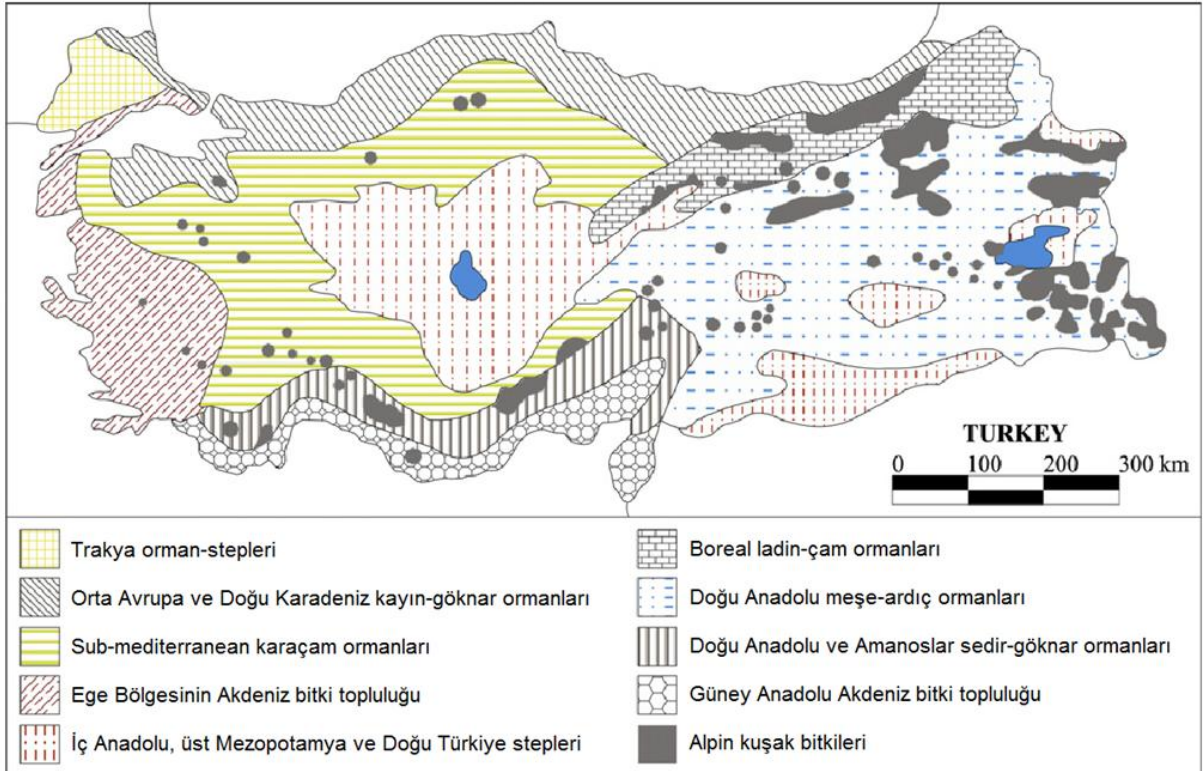


Şekil 1. Akdeniz Havzası'nda bulunan buzul dönem sığınakları (34).

Buzul devirlerinde türlerin sığındığı bu alanlar, buzullararası dönemlerde türlerin yayılma ve türleşme merkezleri olmuştur. Türleşme ve farklılaşmanın yoğun olarak gözlemlendiği bu alanlarda, yeni *Orthohantavirus* taşıyıcılarının bulunma ihtimalinin daha yüksek olması beklenmektedir. Türkiye'de beş tanesi endemik olmak üzere 67 kemirici türü yaşamaktadır (22, 23, 25). Beş endemik kemirici türünden dört tanesi, Türkiye'deki bu sığınak alanları ve yakın çevrelerinde yaşamaktadır. Bu durum, sığınak alanlarının türleşmedeki önemini göstermektedir.



Şekil 2. Küçük memeli türlerinin Anadolu'ya giriş kapıları ve Anadolu sığınakları (35).



Şekil 3. Türkiye'nin görülen bitki örtüsü tipleri (36).

Akdeniz ve İç Anadolu Bölgeleri, sahip oldukları buzul sığınakları ve bitki örtüsü tiplerinin çeşitliliği nedeniyle Türkiye'ye özgü orthohantavirüslerin bulunma ihtimalinin en yüksek olduğu biyocoğrafi alanlardır. Ayrıca bu bölgelerde yayılım gösteren kemirici topluluklarındaki *Orthohantavirus* varlığı da şimdiye kadar hiç araştırılmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, Akdeniz ve İç Anadolu'nun Akdeniz'e komşu bölgelerindeki *Orthohantavirus* prevalansının ve topluluk içerisinde dolaşmakta olan *Orthohantavirus* tür/türlerinin belirlenmesi, varsa bölgeye özgü yeni *Orthohantavirus* türlerinin tanımlanması, taşıyıcı kemirici türlerinin ve yayılımlarının saptanması ve virüsün moleküler karakterizasyonunun sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca Akdeniz ve İç Anadolu Bölgelerinde bulunan buzul dönem sığınaklarının, orthohantavirüsler açısından öneminin ortaya konulması da bu çalışmanın ana hedeflerinden biridir.

Son yıllarda Avrupa'da yapılan çalışmalarda, bir köstebek türü olan *Talpa europeae*'nin *Orthohantavirus* taşıyıcısı olduğunun bildirilmesi nedeniyle (13, 14), *Talpa* cinsinin Akdeniz Bölgesi'nde yayılım gösteren türü olan *Talpa davidiana*'nın *Orthohantavirus* taşıyıcılığı açısından araştırılması da çalışmanın bir diğer hedefidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

RSKA'ya dair ilk kanıtlara, 10. yüzyılda kaydedilmiş Çin tıbbi kayıtlarında rastlanmaktadır (37). RSKA ilk kez Rus klinik kayıtlarında, 1913 yılında Rusya'nın Amur Havzası'nda çıkan salgın için tanımlanmıştır (38). 1930-1934 yılları arasında aynı bölgede ve Rusya'nın Avrupa kısmında çıkan salgında 913 olgu bildirilmiş ve hastalık "Tula ateşi" olarak adlandırılmıştır (39).

RSKA salgınları, askeri faaliyetler sırasında da sıklıkla görülmüştür. 1934'teki Mançurya istilasından sonra Japon hekimler tarafından 12.000 olgu kaydedilmiştir (2). Kore Savaşı (1950-1953) sırasında 3.000'den fazla askerde ateş ve akut böbrek yetmezliğine neden olmuş ve "Kore Kanamalı Ateşi" olarak adlandırılmıştır (40).

1950'lerde hastalığın kemiriciler tarafından taşınıyor olabileceğinden şüpheleniliyordu. 1978 yılında Dr. Ho-Wang Lee ve ark. tarafından *Apodemus agrarius*'un akciğer ve böbrek dokularında orthohantavirüse özgü bir antijen bulunmuş ve yeni virüse, ilk kez saptandığı yer olan Güney Kore'deki Hantan Nehri'ne ithafen, *Hantaan virus* (HTNV) adı verilmiştir (2).

1934'te İsveç'te RSKA'ya benzer semptomlar gösteren ancak daha hafif seyreden bir hastalık görülmeye başlamış ve "Nefropatik Epidemik (NE)" olarak adlandırılmıştır. Etken, 1980 yılında Puumala, Finlandiya'da yakalanan *Myodes glareolus*'tan izole edilmiş ve *Puumala virus* (PUUV) olarak adlandırılmıştır (3).

Asya ve Avrupa'da da farklı hantavirüs türlerinin izole edilmesi ile bu virüslerin neden olduğu hastalık, 1983 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından "Renal Sendromlu Kanamalı Ateş (RSKA)" olarak adlandırılmıştır (41).

1993 yılında ABD'nin güneybatısında salgına neden olan yüksek mortaliteli pulmoner hastalığın etkeninin de hantavirüs olabileceği düşünülmüş ve daha sonra etken izole edilmiştir (46). Asya ve Avrupa'da görülen klinik tablodan daha farklı bir tablo oluşturan bu hastalık, "Hantavirus Pulmoner Sendrom (HPS)" olarak adlandırılmıştır (42).

Türkiye'de orthohantavirüsler ile ilgili ilk çalışma, 1993 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden bildirilmiştir (43). Türkiye'de orthohantavirüsler ile ilgili yapılan ilk yayın ise 1997 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi'nde yapılmıştır (44).

2.2 Sınıflandırma

Hantavirus, 2016 yılına kadar *Bunyaviridae* ailesinin beş cinsinden (*Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Tospovirus*, *Hantavirus*) biri olarak kabul edilmekteydi (45). 2016 yılında yayımlanan Uluslararası Virüsler Taksonomisi Komitesi (ICTV)'nin raporu ile *Hantavirus* cinsinin taksonomisinde ve isminde değişikliğe gidilmiştir. Cins adı *Orthohantavirus* olarak değiştirilmiş ve *Bunyavirales* takımının *Hantaviridae* ailesine dahil edilmiştir (46-48).

Bunyavirales takımının üyesi olan tüm cinsler, virion yapısı, genom organizasyonu ve replikasyon döngüsü açısından birbirine benzerdir. Ancak *Orthohantavirus*, yaşam döngüsü içerisinde artropod kaynaklı vektörlerin olmaması ile diğer cinslerden ayrılmaktadır (46).

Orthohantavirus türleri, Uluslararası Virüsler Taksonomisi Komitesi *Bunyaviridae* çalışma grubu tarafından kabul edilen dört kritere göre tanımlanmaktadır. (i) *Orthohantavirus* türleri, benzersiz bir ekolojik niş içinde, yani farklı bir primer rezervuar türlerinde veya alttürlerde bulunur; (ii) farklı türler, glikoprotein öncüsü (GPC) ve nükleokapsid proteine (N) ait tam dizi analizi verilerinin karşılaştırılması sonucunda aminoasit düzeyinde en az %7 farklılık göstermektedir; (iii) çapraz nötralizasyon testlerinde en az dört katlık titre farkı gösterirler; (iv) farklı *Orthohantavirus* türleri, diğer türler ile birlikte doğal yollardan yeni formlar oluşturmazlar (49). Ancak yeni keşfedilen *Orthohantavirus* türlerinin bazıları, bu şartları tamamen sağlamamaktadır.

Şimdiye kadar 40'ın üzerinde *Orthohantavirus* türü saptanmıştır (Tablo 1) (46). Bunlardan yaklaşık 20 tanesinin insanda hastalık yaptığı kabul edilmektedir (50).

Tablo 1. Bilinen *Orthohantavirus* türleri (46).

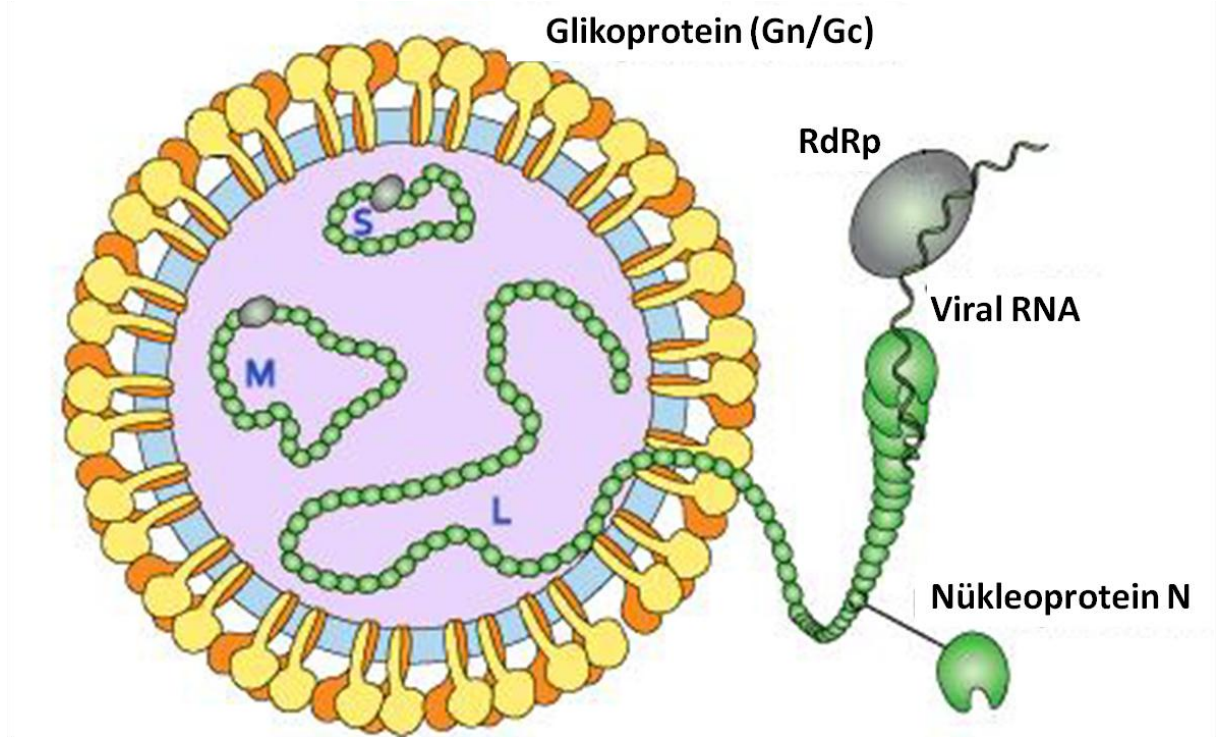
Tür	Kısaltma
<i>Amga orthohantavirus</i>	MGAV
<i>Andes orthohantavirus</i>	ANDV
<i>Asama orthohantavirus</i>	ASAV

<i>Asikkala orthohantavirus</i>	ASIV
<i>Bayou orthohantavirus</i>	BAYV
<i>Black Creek Canal orthohantavirus</i>	BCCV
<i>Bowe orthohantavirus</i>	BOWV
<i>Bruges orthohantavirus</i>	BRGV
<i>Cano Delgadito orthohantavirus</i>	CADV
<i>Cao Bang orthohantavirus</i>	CBNV
<i>Choclo orthohantavirus</i>	CHOV
<i>Dabieshan orthohantavirus</i>	DBSV
<i>Dobrava-Belgrade orthohantavirus</i>	DOBV
<i>El Moro Canyon orthohantavirus</i>	ELMCV
<i>Fugong orthohantavirus</i>	FUSV
<i>Fusong orthohantavirus</i>	FUGV
<i>Hantaan orthohantavirus</i>	HTNV
<i>Imjin orthohantavirus</i>	MJNV
<i>Jeju orthohantavirus</i>	JJUV
<i>Kenkeme orthohantavirus</i>	KKMV
<i>Khabarovsk orthohantavirus</i>	KHAV
<i>Laguna Negra orthohantavirus</i>	LANV
<i>Laibin orthohantavirus</i>	LAIV

<i>Longquan orthohantavirus</i>	LQUV
<i>Luxi orthohantavirus</i>	LUXV
<i>Maporal orthohantavirus</i>	MAPV
<i>Montano orthohantavirus</i>	MTNV
<i>Necocli orthohantavirus</i>	NECV
<i>Nova orthohantavirus</i>	NVAV
<i>Oxbow orthohantavirus</i>	OXBV
<i>Prospect Hill orthohantavirus</i>	PHV
<i>Puumala orthohantavirus</i>	PUUV
<i>Quezon orthohantavirus</i>	QZNV
<i>Rockport orthohantavirus</i>	RKPV
<i>Sangassou orthohantavirus</i>	SANGV
<i>Seoul orthohantavirus</i>	SEOV
<i>Sin Nombre orthohantavirus</i>	SNV
<i>Thailand orthohantavirus</i>	THAIV
<i>Thottapalayam orthohantavirus</i>	TPMV
<i>Tula orthohantavirus</i>	TULV
<i>Yakeshi orthohantavirus</i>	YKSV

2.3 Genom Organizasyonu

Orthohantavirüsler, 80-210 nm çapında zarflı, küremsi (sferik) virüs partikülleri içermektedir. Her biri farklı büyüklükte üç segmentten oluşan tek iplikli, negatif yönelimli RNA genomuna sahiptirler (Şekil 4) (51). Genom büyüklüğü, yaklaşık 12 kb'dır (51).

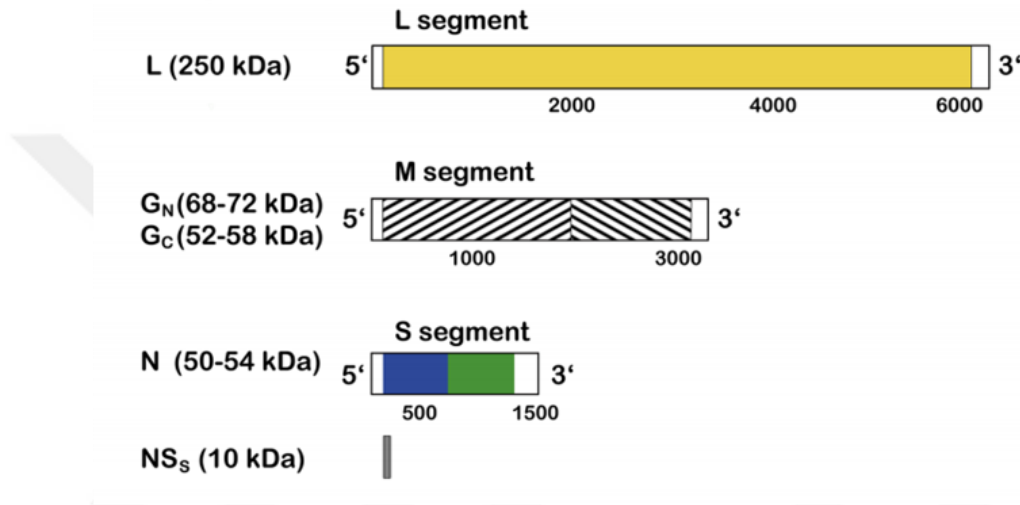


Şekil 4. Orthohantavirus virion yapısı ve bileşimi (52 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

Her bir segmentin viral RNA (vRNA)'sı, 3' ve 5' terminal uçlarında kodlanmayan bölgeler bulunan bir açık okuma bölgesi (ORF) içerir. Küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olarak adlandırılan genom segmentlerinin açık okuma bölgeleri sırasıyla N proteinini, GPC ve viral RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodlar (Şekil 5) (53). Her bir segmentin kodlanmayan bölgelerinin en uç kısımlarında, birbirinin komplementeri olan "AUCAUCAUCUG" dizileri bulunmaktadır. Bu diziler, viral promotör işlevi gören, replikasyon ve transkripsiyonda önemli roller oynayan "panhandle" yapısını oluşturmaktadır (Şekil 6) (54). RNA molekülü, "panhandle" yapısının oluşmasından dolayı sirküler olarak görülmektedir.

N proteinini kodlayan S segment, yaklaşık 1,8 kilobaz (kb) uzunluğundadır. N proteini, kapsidasyon ve viral genomun paketlenmesini sağlayarak vRNA'yı korur. Genellikle enfekte hücrelerin sitoplazmasında bulunmaktadır.

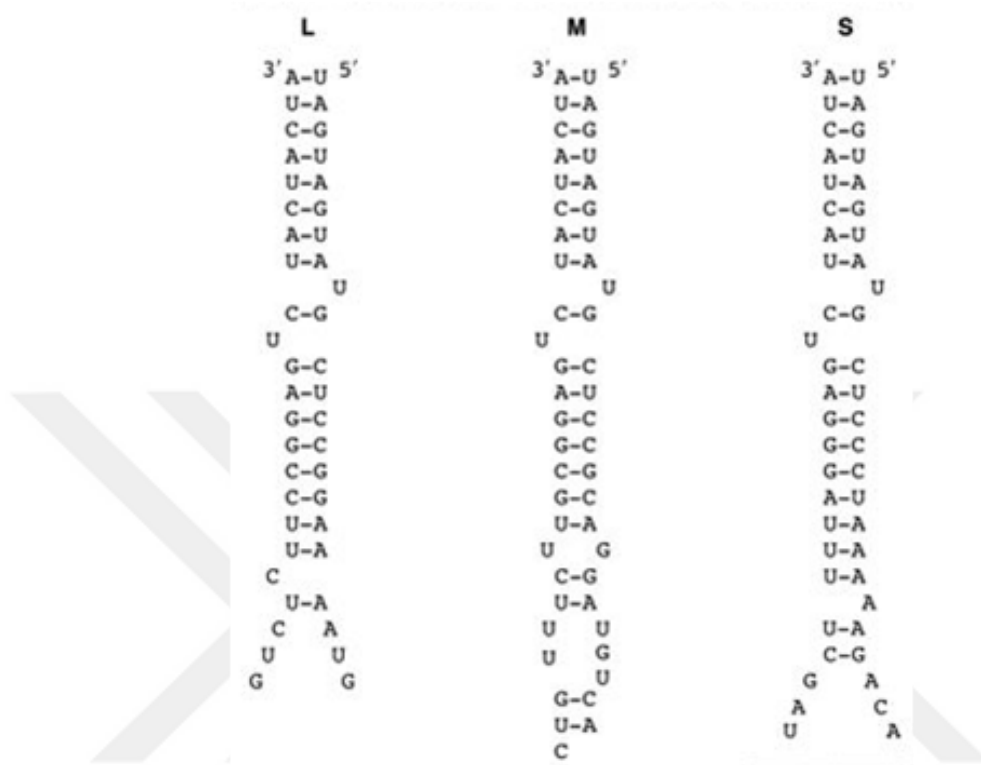
N proteini, virionda ve enfekte hücrelerde en fazla bulunan viral proteindir. Bu proteine karşı hızlı bir erken bağışık yanıt oluşturulmaktadır. N proteininin amino ucunda kodlanan 100 aminoasit yüksek immunojenik karaktere sahiptir. Bu nedenle tanısal amaçlı yöntemlerde sıklıkla bu bölgenin kodladığı protein ve/veya peptidler antijen olarak kullanılmaktadır (55).



Şekil 5. Orthohantavirus genom yapısı (55). L segment tarafından kodlanan RdRp (sarı), M segment tarafından kodlanan G_n ve G_c glikoproteinleri (çizgili), S segment tarafından kodlanan nükleokapsid proteini (mavi ve yeşil) ve bazı Orthohantavirus türlerinde görülen yapısal olmayan NSs proteini (gri). RNA moleküllerinin uç kısımlarındaki ifade edilmeyen bölgeler beyaz ile gösterilmiştir.

GPC'yi kodlayan M segment, yaklaşık olarak 3,7 kb uzunluğundadır. GPC, hücresel proteazlar tarafından parçalanarak G_n ve G_c olmak üzere iki ayrı zarf glikoproteine ayrılır. Zarf glikoproteinleri, konak hücre yüzey reseptörleri olan integrinler ile etkileşime girerek orthohantavirüslerin hücreye tutunma ve hücre içine girişlerini kolaylaştırmakta ve patogeneizde rol oynamaktadır. Ayrıca integrin reseptörleri ile etkileşime girmeleri, nötralizan antikor yanıtını indüklemektedir (55-57).

RdRp'yi kodlayan L segment, yaklaşık olarak 6,5 kb uzunluğundadır. RdRp, virüsün replikasyon döngüsünde görevlidir. Ayrıca polimeraz aktivitesinin yanı sıra helikaz, endonükleaz ve transkriptaz aktivitelerine de sahiptir (58).



Şekil 6. Orthohantavirus genom segmentlerinin "panhandle" yapısı (59).

2.4 Yaşam Döngüsü

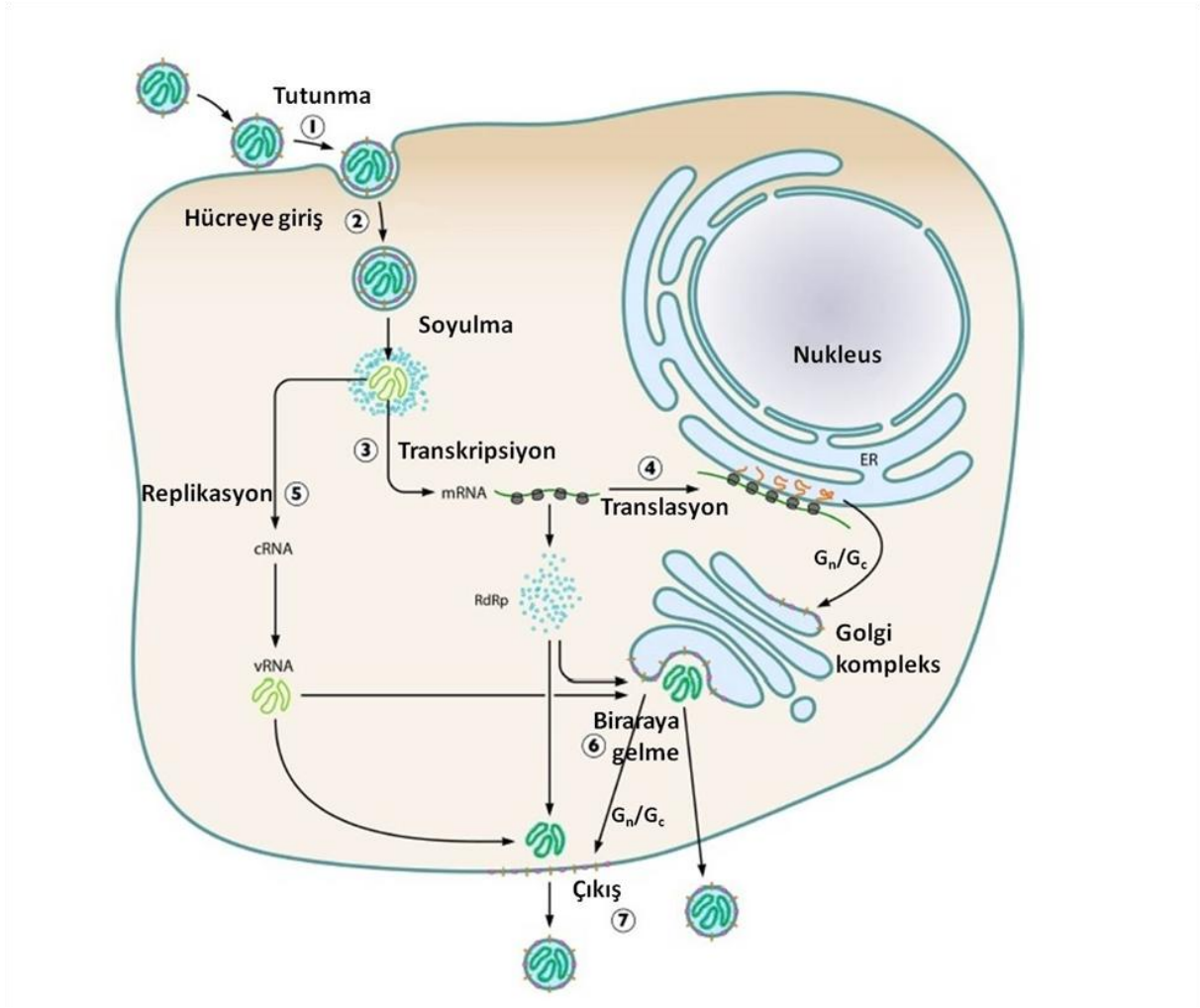
Orthohantavirüsler, birincil hedefleri akciğer ve böbreklerdeki endotel hücreleri olsa da diğer dokulardaki endotel hücrelerini, epitel hücrelerini, foliküler dendritik hücrelerini, makrofajları ve lenfositleri enfekte ederler (60). Yüzeylerinde bulunan viral zarf glikoproteinleri ile konağın hücre yüzey reseptörleri olan integrinlere ve adezyon moleküllerine tutunurlar (56, 57). Tutunma sonucunda virüs, hücre içine alınır. Hücre içine alınma, kltrin bağımlı endositoz ile gerçekleşir (61). Endositoz sırasında hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlı olan virionun çevresinde kltrin kaplı bir çukur oluşur. Bu çukur, virüsün kltrin ile çevrili hücre membranından oluşan kltrin kaplı veziküller içine alınmasını sağlar. Ancak bazı orthohantavirüsler hücre içine girişte birden çok yol kullanmaktadırlar. Makropinositoz, kltrin bağımsız reseptör aracılı endositoz ve kaveolar kolesterol bağımlı endositoz, hücre içine girişte alternatif giriş yolları arasında sayılabilir (53). Virion hücre içine

alındıktan sonra pH'taki azalmaya bağılı olarak hücresel reseptörlerden ayrılarak erken endozomlara (pH 6-6,5) ve geç endozomlara (pH 5-6) aktarılır. Endozomlardaki düşük pH, G_c glikoproteininin konformasyon değişikliğine neden olmaktadır. Bu durum daha ileri konformasyon değişiklikleri ile viral ve hücresel membranların füzyonuna yol açar (53). Viral zarf glikoproteinlerinin konformasyon değişikliğinden sonra zarf soyulmaya başlar. Sitoplazmaya salınan viral genom, replikasyon bölgesine taşınır (61).

Orthohantavirus genomundan vRNA'ların sentezlenmesi, transkripsiyon ve replikasyon ile gerçekleşmektedir. Bu iki olay da RdRp ile bağlantılıdır (62). Viral proteinler, perinükleer bölgeye taşınır. Burada S-, M- ve L- segmentleri RdRp tarafından fonksiyonel mRNA'lara transkribe edilir (52). Negatif polariteli segmentli RNA virüslerinin transkripsiyonu, kep hırsızlığı ("cap-snatching") olarak adlandırılan bir mekanizma ile başlatılmaktadır. Bu mekanizma, L-segmentte kodlanan bir endonükleazın konak hücre mRNA'sında 10-20 nükleotit uzunluğunda 5'-kepli oligonükleotitler oluşturması ile gerçekleşir (53). RNA sentezinin başlangıcı, bir "prime and realign" mekanizması ile gerçekleşmektedir. Konak hücre kaynaklı primerler 3' uçlarında, vRNA'nın uç kısmında bulunan AUC tekrarlarındaki ilk sitozin ile eşleşen bir guanozin rezidüsüne sahiptir. Bazların ard arda eklenmesinden sonra yeni oluşan RNA birkaç baz geriye doğru kayar ve vRNA'nın 3' ucundaki komplementer nükleotitler ile yeniden hizalanır. "Prime and realign" mekanizmasının tekrarlanması ile vRNA'nın tekrarlayan terminal dizileri üretilmiş olur (53, 63). Degrade olan hücresel mRNA'lar, viral mRNA sentezinin başlangıcında primer havuzu olarak iş gören sitoplazmik işleme cisimciklerinde (P cisimcikleri) toplanırlar (61).

Replikasyon sırasında vRNA, kendisinin çoğaltılmasında kalıp olarak kullanılacak olan komplementer RNA (cRNA)'ya dönüştürülür. cRNA, viral mRNA'nın sentezlenmesi için kalıp olarak kullanılabileceği gibi daha ileri safhalarda genomun öncülü de olabilir (52, 64). S- ve L- segmentlere ait mRNA'lar serbest ribozomlarda, M- segmente ait mRNA ise endoplazmik retikuluma (ER) bağılı ribozomlarda translasyona uğrar (20). GPC, G_n zarf glikoproteininin karboksi ucunda bulunan WAASA motifinin tanınmasından sonra iki farklı glikoprotein (G_n ve G_c) üretmek üzere eş zamanlı ifade edilir (65). Oluşan zarf glikoproteinleri (G_n ve G_c), posttranslasyonel modifikasyonla ER'de glikozillendikten sonra golgi kompleksine gönderilir (3). Ribonükleoprotein kompleksleri, dinein mikrotübülleri aracılığıyla ER-golgi ara kompartmanlarına ve sonra golgi kompleksine taşınır (66). Üretilen tüm ürünler, golgi kompleksinde birleştirilerek olgun viral partikülün biraraya gelmesi

sağlanır (viral assembly) (67). Olgun virionlar haline geldikten sonra golgi veziküllerinden füzyon yoluyla salınarak plazma membranına taşınır. Buradan ekzositoz ile salınır (68).



Şekil 7. Orthohantavirus yaşam döngüsü (20 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır). Virionun glikoproteinleri aracılığıyla konak hücre reseptörlerine tutunması (1), virionun endositoz ile konak hücre içersine alınması ve pH değişimine bağlı olarak virionun soyulması (2), viral RNA'nın mRNA'ya transkripsiyonu (3), viral proteinlerin translasyonu (4), viral RNA'nın replikasyonu (5), viral bileşenlerin golgi kompleksinde bir araya gelmesi (6), olgun virionların füzyon yoluyla golgi veziküllerinden salınması (7).

2.5 Konak ve Bulaş Yolları

Uzun yıllar boyunca orthohantavirüslerin doğal konakları, yalnızca kemiriciler olarak bilinse de son zamanlarda yapılan çalışmalarda böcekçiller, köstebekler ve yarasaların da *Orthohantavirus* taşıyıcı oldukları gösterilmiştir (60).

Her bir *Orthohantavirus*, kesin kural olmamakla birlikte genellikle kendilerine özgül belirli kemirici türleri ile taşınmaktadır (1). Orthohantavirüsler, konaklarının coğrafi yayılım alanlarına bağlı olarak Eski Dünya ve Yeni Dünya orthohantavirüsleri olarak bilinmektedir. Eski Dünya orthohantavirüsleri, RSKA etkenleri olup *Muridae* ailesinin *Murinae* alt ailesi ve *Cricetidae* ailesinin *Arvicolinae* alt ailesinden kemiriciler ile taşınmakta iken, Yeni Dünya orthohantavirüsleri HPS etkenleri olup *Cricetidae* ailesinin *Neotominae* ve *Sigmodontinae* alt ailelerinden kemiriciler ile taşınmaktadır (69). RSKA tablosuna yol açan orthohantavirüsler, konağı olan kemirici türlerinin yayılım gösterdiği Avrasya'da görülürken, HPS tablosuna yol açan orthohantavirüsler ise konağı olan kemirici türlerinin yayılım gösterdiği Amerika kıtasında görülmektedir (20, 70).

Orthohantavirüslerin konakları ile birlikte evrimleştikleri, bu nedenle de virüsün yayılım alanlarının, konağı olan kemiricilerin yayılım alanları ile sınırlı oldukları düşünülmekteydi (70-73). Bu düşüncenin sebebi, orthohantavirüslerin ve bunların taşıyıcısı olan kemirici türlerinin filogenetik analiz sonuçlarının birbirleri ile uyumlu olmasıydı (74-76). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, orthohantavirüslerin kısa süreli değişme ("substitution") oranlarının çok yüksek olduğunun (10^{-2} ile 10^{-4} substitutions/site/year) ve farklılaşma ("divergence") sürelerinin çok yakın (1000 yıldan az) olduğunun saptanması, konakları olan kemirici türleri ile birlikte evrimleştikleri hipotezine karşı bir bakış açısı ortaya koymuştur (77, 78). Ayrıca, orthohantavirüslerin evriminde, tercihli konak değişiminin ("preferential host switching") yani virüsün genetik olarak birbirinden farklı türde konaklar yerine birbiri ile yakından ilişkili konak türlerine bulaşmasının ve lokal adaptasyonun, önemli bir etki yarattığı da belirtilmektedir (77).

Orthohantavirüsler kemiricilerde belirti vermeyen, kronik bir enfeksiyona neden olurlar. Virüs, histopatolojik değişikliklere neden olmakta ve başta akciğer olmak üzere kemiricinin pek çok dokusunda saptanabilmektedir. Enfekte kemiriciler yaşamları boyunca çıkartıları ve salgıları aracılığıyla viral partikülleri çevreye saçarlar. Kemiriciler, kavga, grup içi agresif davranışlar ve birbirlerini tımarlama gibi aktiviteleri sırasında ya da aerosolizasyon yoluyla

virüsü horizontal olarak birbirlerine bulaştırabilmektedirler (79). Özellikle erkek kemiriciler dişi kemiricilere göre daha fazla agresif davranışlar sergiledikleri ve daha fazla yer değiştirdikleri için virüse maruz kalma ihtimalleri artmakta ve buna bağlı olarak da daha yüksek prevalansa sahip olmaktadır (79, 80). Vertikal bulaşa dair kesin kanıtlar bulunmamaktadır.

Orthohantavirüsler, enfekte kemiriciler ile taşınmakta ve enfekte kemiricilere ait sekresyonlardaki (salya, idrar, dışkı) viral partiküllerin aerosolizasyonu ya da enfekte kemiriciyle doğrudan temas yoluyla insanlara bulaşmaktadır (1). Hayvancılık ile uğraşanlar, çiftçiler, orman işçileri, avcılar, gardiyanlar, askerler, veterinerler veya açık havada aktivite yapanlar (kamp kurmak vb.), enfeksiyon açısından riskli grubu oluşturmaktadırlar. Ayrıca insanların kemiricilerin doğal yaşam alanlarını istila etmesi sonucunda kemiricilerin insanlara ait yaşam alanlarına girmesi de kontaminasyon nedenlerindendir (81, 82). Havalandırmanın az olduğu yerlerde muhtemel enfekte alanların süpürülerek temizlenmesi de enfeksiyonlara neden olmaktadır (83).

Kemirici popülasyonlarındaki yoğunluk, bulundukları habitat, besin kaynaklarının varlığı ve ulaşılabilirliği, yağış, sıcaklık ve çoğalma kapasiteleri gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörlerin kemirici popülasyonlarını olumlu yönde etkilediği yıllarda, *Orthohantavirus* enfeksiyonlarına da daha sık rastlandığı gösterilmiştir (84).

2.6 Klinik

Grip benzeri bulgular göstermesi ve enfeksiyonun şiddetinin etkene göre değişiklik göstermesi nedeniyle *Orthohantavirus* enfeksiyonlarında tanı koyulması oldukça zordur (85). Avrasya'da RSKA ve Amerika kıtasında HPS olmak üzere iki farklı klinik tablo görülmektedir (20). Ayrıca PUUV, İskandinav'da epidemik nefropati olarak adlandırılan, RSKA'nın daha hafif bir formuna neden olmaktadır. Ancak Türkiye'de görülen PUUV enfeksiyonları, epidemik nefropati gibi hafif seyretmemekte ve RSKA tablosuna neden olmaktadır (27).

Şimdiye kadar 40'ın üzerinde *Orthohantavirus* türü saptanmış olmasına rağmen bunların yaklaşık 20 tanesi patojenik olarak kabul edilmektedir (Tablo 2) (50).

Tablo 2. Klinik önemi olan *Orthohantavirus* türleri (46, 50).

	Tür	Coğrafi yayılımı	Taşıyıcı kemirici türü	Klinik tablo
Eski Dünya Orthohantavirüsleri	Dobrava-Belgrade	Balkanlar, Avrupa, Rusya	<i>Apodemus flavicollis</i> (Dobrava suşu) <i>Apodemus agrarius</i> (Saaremaa suşu) <i>Apodemus ponticus</i> (Sochi suşu)	RSKA
	Puumala	Avrupa, Asya	<i>Myodes glareolus</i> (Puumala suşu) <i>Myodes regulus</i> (Muju suşu) <i>Myodes rufocanus</i> (Hokkaido suşu)	RSKA (epidemik nefropati)
	Hantaan	Rusya, Çin, Güney Kore	<i>Apodemus agrarius</i> (Hantaan suşu) <i>Apodemus peninsulae</i> (Amur ve Soochong suşları)	RSKA
	Tula	Avrupa, Rusya	<i>Microtus arvalis</i> (Tula suşu) <i>Microtus majori</i> (Adler suşu)	RSKA
	Seoul	Avrupa, Güney Kore	<i>Rattus spp.</i>	RSKA
	Luxi	Çin	<i>Eothenomys miletus</i>	RSKA
	Sin Nombre	Kuzey Amerika	<i>Peromyscus maniculatus</i>	HPS
	Andes	Arjantin, Güney Amerika	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i> (Andes ve Oran suşları) <i>Oligoryzomys flavescens</i>	HPS

Yeni Dünya Orthohantavirüsleri			(Lechiguana suşu) <i>Oligoryzomys eliurus</i> (Castelo dos sonhos suşu)	
	Bayou	Kuzey Amerika	<i>Oryzomys palustris</i>	HPS
	Black Creek Canal	Kuzey Amerika	<i>Sigmodon hispidus</i>	HPS
	Choclo	Panama	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	HPS
	Laguna Negra	Arjantin, Bolivya, Paraguay, Peru	<i>Calomys laucha</i> (Laguna Negra suşu) <i>Oligoryzomys microtis</i> (Rio Mamore suşu)	HPS
	Maporal	Güney Amerika	<i>Oligoryzomys delicatus</i>	HPS

RSKA enfeksiyonlarında mortalite virüsün türüne bağlı olarak %12'ye kadar çıkabilmektedir (86). İnkübasyon süresi, genellikle 2 ila 4 hafta arasındadır. Hastalık, inkübasyon süresinden sonra birbirini takip eden beş dönemden oluşmaktadır (Tablo 3) (86).

Tablo 3. RSKA dönemleri, süreleri ve belirtileri (86).

Dönem	Süre	Belirtiler
Ateşli Dönem	3-6 gün	Bulantı, kusma, iştahsızlık, baş ve kas ağrısı, ateş, halsizlik, konjunktival hemoraji, proteinüri, eritematöz döküntü
Hipotansif Dönem	1-2 gün	Hipotansiyon, taşikardi, trombositopeni, proteinüri, soğuk ve nemli cilt
Oligürik Dönem	3-5 gün	Proteinüri, trombositopeni ve plazma kaybı sonucu böbrek yetmezliği
Diüretik Dönem	1-2 hafta	Hipotansiyon, elektrolit bozukluğu, viseral hemoraji, akciğer ve santral sinir sistemi tutulumu
Konvelesan Dönem	3-6 hafta	Kas güçsüzlüğü, hipostenüri ve oligüri

HPS ise RSKA'ya göre daha ağır seyretmektedir. Mortalitesi %35 civarındadır (87). İnkübasyon süresi, 2 ila 3 hafta arasındadır. Hastalık, inkübasyon süresinden görülen üç dönemden oluşmaktadır (Tablo 4) (86).

Tablo 4. HPS dönemleri, süreleri ve belirtileri (86).

Dönem	Süre	Belirtiler
Prodrom Dönem	3-6 gün	Baş ve kas ağrısı, ateş, halsizlik, gastrointestinal semptomlar
Kardiyopulmoner Dönem	7-10 gün	Akciğer ödemi, taşikardi, hipotansiyon, öksürük, gastrointestinal semptomlar
Konvelesan Dönem	7-15 gün	Trombositopeni, lökositoz

2.7 Patogenez

Vazodilatasyon ve vasküler permeabiledaki artış, RSKA ve HPS patogenezindeki ana faktörlerdir (88).

Orthohantavirüsler, vasküler endotel hücrelerini enfekte ederek vasküler endotelial fonksiyon bozukluklarına neden olurlar. Bu nedenle *Orthohantavirus* ile ilişkili hastalıklar, vasküler permeabilite artışı ile ortaya çıkan klinik tablolardır (89). Vasküler permeabiledaki artış, plazma eksozmosuna ve RSKA olgularında görülen hemokonsantrasyon, hipotansiyon, şok ve retroperitoneal ödemden kaynaklanan abdominal ağrılar gibi pek çok semptom ile ilişkili olan hemorajiye neden olmaktadır (90). HPS olgularında görülen, sıvıların alveolar alana ekstrasvazasyonu ve pulmoner ödem de yine vasküler permeabilite artışından kaynaklanmaktadır (91).

Orthohantavirus patogenezini tek bir faktör ile açıklamak doğru değildir. Yapılan çalışmalarda virüse ait faktörler, immün faktörler ve konak genetiğine ait faktörlerin bir arada rol oynadığı indirekt mekanizmaların, RSKA gelişiminde etkili olabileceğine değinilmektedir (89).

Viral glikoproteinlerin konak hücre yüzey reseptörlerine bağlanması yolu ile endotel hücrelerinin yanı sıra epitel, dendritik ve lenfositik hücreleri de enfekte etmektedirler. Patojenik orthohantavirüslerin hücreye girişte $\beta 3$ integrinleri tercih ettikleri, patojenik olmayan orthohantavirüslerin ise $\beta 1$ integrinleri tercih ettikleri düşünülmektedir (56, 92).

RSKA hastalarında oluşan hasarda kişinin sahip olduğu genetik faktörlerin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Örneğin insan lökosit antijen (HLA) genlerinden B8, DR3 ve DRQ2 alellerinin varlığı ile PUUV enfeksiyonlarının şiddetinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (93). HLA B27 alellinin ise PUUV enfeksiyonunun daha hafif formu olan epidemik nefropati ile ilişkilendirilmiştir (94).

2.8 İmmünoloji

Orthohantavirus genomu tarafından kodlanan N, G_n ve G_c yapısal proteinleri, konakta immün yanıt oluşumuna neden olmaktadır. Orthohantavirüslerin hedefi olan akciğer ve böbrek dokularındaki hasara, oluşan bu immün yanıt neden olmaktadır. Enfeksiyon sırasında hem doğal hem de kazanılmış immün yanıt rol oynamaktadır (95).

Doğal bağışıklık, patojen ile ilişkili moleküler paternler (PAMP) tanınması ile aktive olur. Burada Toll-benzeri reseptörler (TLR) önemli bir etkiye sahiptir. TLR'ler etkin bir immün yanıt oluşturabilir, inflamatuvar sitokinlerin ve tip I interferon (IFN) salınmasını sağlayabilir. Jiang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, HTNV ile enfekte vasküler endotel hücrelerinde TLR4 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Ayrıca RSKA olgularında TLR4'ün, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), IFN-gamma (γ) ve interlökin (IL)-6 ekspresyonunda artışa neden olabildiği gösterilmiştir (96).

RSKA'lı hastalarda inflamatuvar sitokinlerin aşırı sentezlenmesi, sıkça bildirilmektedir. Sitokin fırtınası olarak adlandırılan bu durumun hastalığın patogenezinde çok önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Sitokin ve kemokin seviyelerindeki artış ve bunların üretimindeki dengesizlik, vasküler endotelial geçirgenliğin artmasına ve RSKA'lı hastalarda klinik tablonun ağırlaşmasına neden olmaktadır (97). TNF- α , IL-6 ve IL-1 gibi sitokinlerin ateş, septik şok, hipotansiyon ve akut faz protein üretiminin başlatılmasında rol oynadıkları ve TNF- α , IFN- β ve IL-6'nın endotelial hücrelerin geçirgenliğinin artmasından sorumlu olduğu belirtilmektedir (98-100).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzeylerinin RSKA gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yüksek VEGF düzeyi ve böbrek hasarının şiddeti arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (101). β 3 integrinler, VEGF üzerinden etki ederek vasküler geçirgenliği düzenlemektedir (102).

RSKA'lı hastaların serumlarında ve *Orthohantavirus* ile enfekte hücrelerde daha yüksek IFN- β düzeyleri saptanmıştır (96). Hastalığın fazına ve şiddetine bağlı olarak RSKA'lı hastaların serumlarında IFN- γ düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (103). DOBV olgularının çoğunda IL-10, IFN- γ ve TNF- α düzeylerinin arttığı ve DOBV ile enfekte hastalardaki düzeylerin PUUV ile enfekte hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (104).

Kompleman sistem ve doğal öldürücü hücrelerin de *Orthohantavirus* immünopatolojisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (89, 105). PUUV enfeksiyonlarının akut döneminde komplemanın aktive olduğu ve hastalığın şiddetinin kompleman aktivasyon düzeylerine göre değiştiği gösterilmiştir (106). Akut PUUV enfeksiyonlarında kompleman aktivasyonu sırasında akut faz proteinlerinden pentraksin ilişkili protein 3 düzeyinde artış saptanmıştır (107).

Enfeksiyonun erken döneminde immünglobulin M (IgM) ve immünglobulin A (IgA) antikorları, geç döneminde ise immünglobulin G (IgG) antikorları saptanmaktadır (108). Enfeksiyon IgG'nin alt sınıfları açısından incelendiğinde, IgG1 ve IgG3 antikorlarında artış saptanmıştır. IgG2 antikoru ise nadiren saptanabilmiştir. IgG4 antikoru ise yalnızca RSKA'lı hastalarda saptanabilmiştir (95, 98, 109).

G_n ve G_c zarf glikoproteinlerine karşı nötralizan antikor oluşturulmaktadır. Nötralizan antikorlar, virüs titresinin azaltılmasını sağlamakta ve tekrarlayan karşılaşmalarda enfeksiyona karşı koruyuculuk sağlamaktadır (110, 111).

T hücreleri, enfeksiyonun klinik seyrinde ve virüsün ortadan kaldırılmasında rol oynamaktadır. Enfeksiyon başladıktan sonra bellek T hücrelerinde artış gözlenmekte ve enfeksiyon boyunca bu hücrelerin olgunlaşması devam etmektedir (98). Enfeksiyon sırasında CD8⁺ T hücrelerinde artış gözlenirken, CD4⁺ T hücre sayısında değişiklik görülmemektedir (95). Enfeksiyonun erken döneminde immun yanıt Th₁ yönünde iken, ileriki dönemlerde bu yanıt Th₂ yönüne kaymaktadır (19).

2.9 Epidemiyoloji

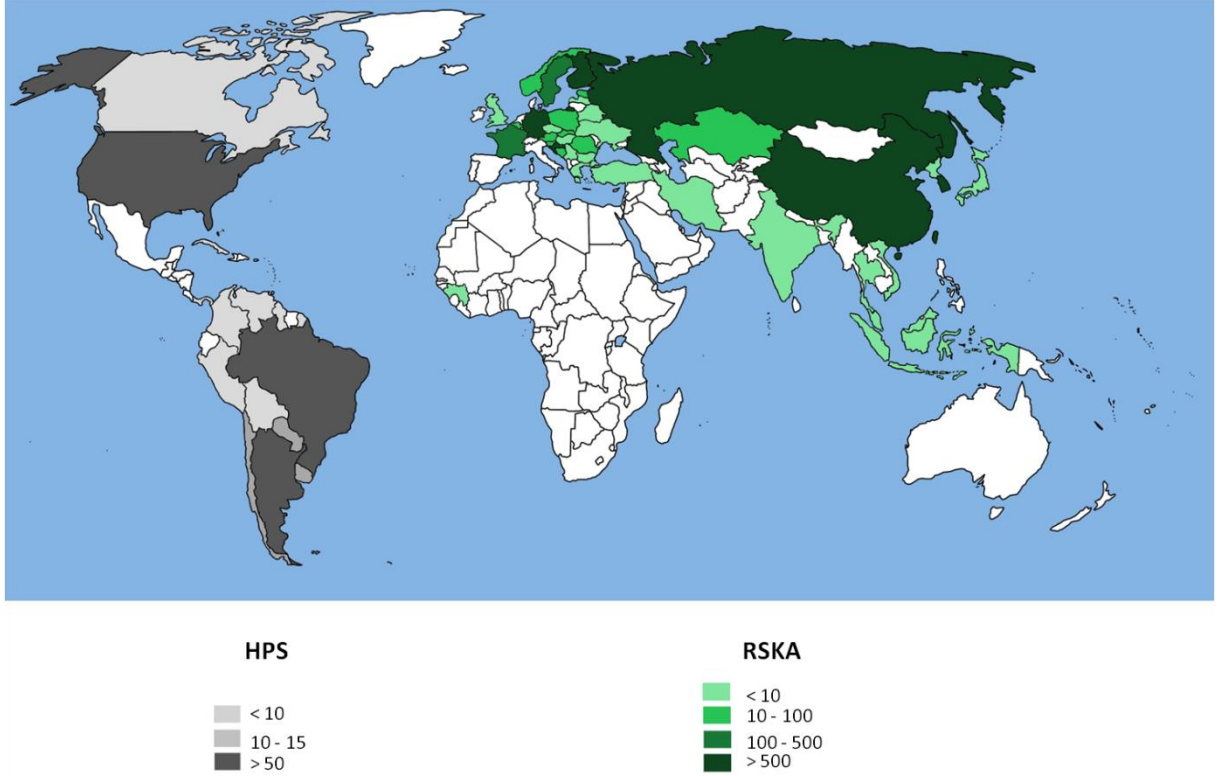
Orthohantavirus enfeksiyonları, RSKA ve HPS gibi mortal seyredabilen tablolara yol açması nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya’da her yıl 150-200 bin kişi RSKA veya HPS tanısı almaktadır (60, 86).

Yılda yaklaşık 100 bin olgunun bildirildiği RSKA olgularının büyük çoğunluğuna Avrupa ve Asya’da rastlanmaktadır (112). RSKA, Çin’de sınıf B bildirimi zorunlu bir hastalık olarak sınıflandırılmaktadır (113). Asya’da en sık rastlanılan RSKA etkenleri HTNV ve SEOV iken Avrupa’da PUUV ve DOBV’dir.

PUUV olguları çoğunlukla Finlandiya ve İsveç başta olmak üzere İskandinav ülkeleri, Avrupa’nın kuzeyi ve Rusya’dan bildirilmektedir (114). Son yıllarda Belçika, Almanya, Norveç, Fransa, Macaristan, Slovenya ve Avusturya’dan da epidemik nefropati olguları görülmektedir (83, 85, 115).

DOBV olguları ise genellikle Balkan ülkelerinden bildirilmektedir (116). DOBV Dobrava suşundan kaynaklı enfeksiyonlar Balkan ülkelerinde görülürken, Saaremaa suşundan kaynaklı enfeksiyonlar Rusya, Almanya ve Slovakya’da, Sochi suşundan kaynaklı enfeksiyonlar ise Rusya’da görülmektedir.

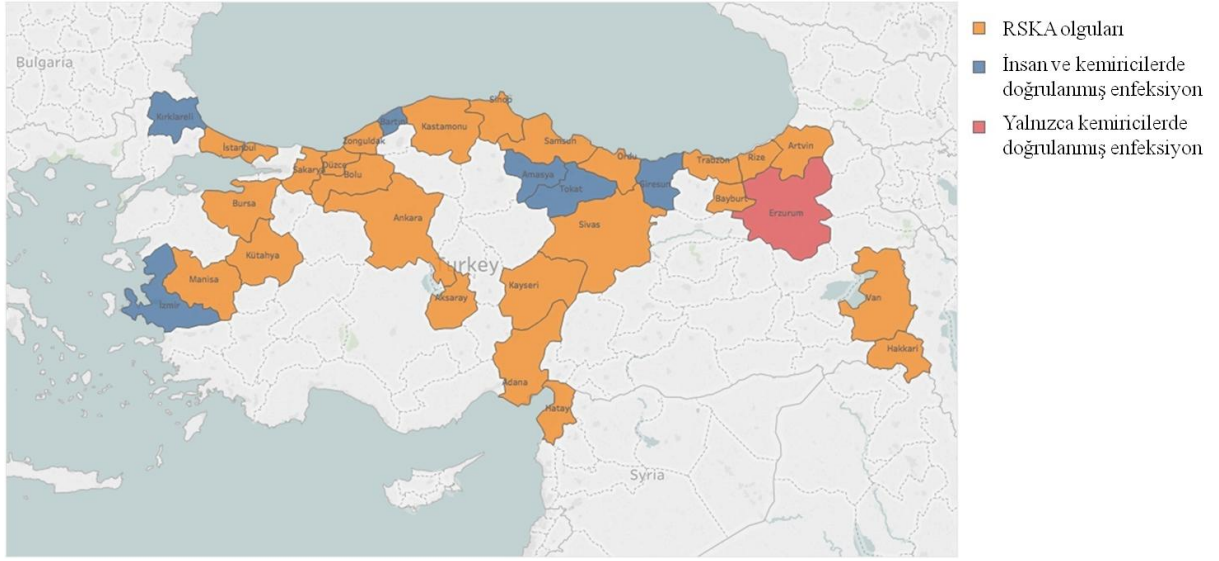
HPS olguları, Amerika kıtasında görülmektedir. HPS, 1995 yılından beri Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde bildirimi zorunlu bir hastalıktır (117). En sık rastlanılan etken, Kuzey Amerika’da Sin Nombre virüs (SNV) iken Güney Amerika’da Andes virüstür (ANDV) (20, 117-119).



Şekil 8. RSKA ve HPS olgularının ülkelere göre yıllık insidansı (2016 yılına kadar olan verileri içermektedir.) (119 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

2.9.1 Türkiye’de Orthohantavirus Epidemiyolojisi

Türkiye’de RSKA etkeni olan DOBV ve PUUV olguları bildirilmekte, dönem dönem salgınlara neden olabilmektedir (27, 29-31). Ayrıca Türkiye’de RSKA etkeni DOBV, PUUV, SEOV ve TULV’nin taşıyıcı olan kemirici türlerinin yayılımı mevcuttur (21-25). Şimdiye kadar bu kemirici türlerinde DOBV ve PUUV varlığı serolojik ve moleküler yöntemler ile doğrulanmıştır (26, 32, 33, 120) (Şekil 9).



Şekil 9. Türkiye'de RSKA olguları ile insanlarda ve kemiricilerde serolojik ve moleküler yöntemler ile *Orthohantavirus* varlığının bildirildiği iller (Veriler, bilimsel makaleler, T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı verileri ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD. verilerinden derlenmiştir.).

Türkiye'de yapılan ilk *Orthohantavirus* araştırması, 1993 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde yapılmıştır. Çalışma kapsamında 106 askeri personelde orthohantavirüs antikor varlığı araştırılmış ve herhangi bir pozitiflik saptanamamıştır (43). Daha sonra 1997 yılında yapılan bir çalışmada akut ve kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda orthohantavirüse karşı antikor varlığı araştırılmış ve nefropatili olguların %4,3'ünde, sağlıklı olguların ise %2,6'sında seropozitiflik saptanmıştır (44). 2006 yılında Trabzon, Rize ve İzmir çevresinde toplanan kemiricilerde orthohantavirüse karşı antikor varlığı araştırılmış ve prevalans %1,2 olarak bildirmiştir (26). İlk RSKA olguları, 2009 yılında Zonguldak ve Bartın illerinden bildirilmiştir. Aynı bölgede *Orthohantavirus* enfeksiyonu olabileceği düşünülen 23 hastanın %52,2'sinde orthohantavirüse karşı antikor varlığı saptanmıştır (27). Kaya ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise 2009-2012 yılları arasında *Orthohantavirus* tanısı almış 100 hastada antikor varlığı araştırılmış ve hastaların yalnızca % 20'sinde orthohantavirüse karşı antikor varlığı saptanmıştır. Antikor varlığı saptanan 20 hastadan 17'si Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaşarken, üçünün Batı Karadeniz ve İç Anadolu Bölgeleri'nde yaşadıkları belirtilmiştir (28). 2010 yılında İstanbul'dan iki farklı olgu bildirimi yapılmıştır. Olgulardan ilki, servikal lenf düğümlerinde hassasiyet ve faringeal enfeksiyon ile hastaneye başvurmuş ve DOBV

pozitifliği saptanmıştır (29). Diğer olgu ise yorgunluk, ağrı, bulantı ve kusma şikayetleri ile hastaneye başvurmuş, hastada DOBV'e karşı IgM pozitifliği saptanmış ve yoğun bakım ünitesine kaldırıldıktan iki gün sonra kaybedilmiştir (30). Giresun'da 626 sağlıklı bireyden kan örneği alınmış ve orthohantavirüse karşı IgG pozitifliği araştırılmıştır. Sağlıklı bireyler arasındaki seroprevalans %3,2 olarak saptanmıştır (31). 2009 yılında Batı Karadeniz Bölgesi'ndeki salgından sonra aynı bölgede arazi çalışması yapılmış ve 173 kemirici yakalanmıştır. Bu kemiricilerin %21'in orthohantavirüse karşı IgG pozitifliği, %13,3'ünde virüs saptanmış ve *Apodemus flavicollis* ve *A. uralensis*'te iki farklı DOBV suşu varlığı gösterilmiştir (32). Son olarak yine 2009 yılında Kırklareli İğneada bölgesinde yapılan arazi çalışması ile 73 *Apodemus spp.* türü kemirici yakalanmış ve bu kemiricilerin % 11'inde DOBV saptanmıştır. Virüs pozitifliği saptanan tüm kemiricilerin *A. flavicollis* oldukları bildirilmiştir (33).

2.10 Laboratuvar Tanısı

2.10.1 Serolojik Tanı

Orthohantavirus enfeksiyonlarının tanısında öncelikli olarak tercih edilen yöntem, serolojik testlerdir. Bunun nedenleri, moleküler yöntemlerin duyarlılığının serolojik testlere göre daha düşük olması, vireminin kısa süreli olması ve viremi düzeyinin *Bunyavirales* takımının diğer üyelerinden daha düşük olmasıdır. *Orthohantavirus* enfeksiyonları sırasında N proteinine karşı IgM ve IgG antikorları üretilmektedir. IgM antikor varlığının gösterilmesi, erken dönemde tanı koyulabilmesi için önemli olsa da yalnızca kısa bir süre saptanabildiğinden, IgG antikor varlığının gösterilmesi tercih edilmektedir. Bu nedenle hastadan farklı zamanlarda alınan serum örneklerinde saptanan dört katlık titre artışı tanı koydurucudur (121).

Orthohantavirus enfeksiyonlarının tanısında altın standart yöntem, plak redüksiyon nötralizasyon testidir. Bu testin özgüllüğü oldukça yüksektir. Ancak virüsün hücre kültürünün zahmetli olması ve biyogüvenlik düzey 3 laboratuvarlar gerektirmesi nedeniyle tüm laboratuvarlarda uygulanabilen bir yöntem değildir (20).

Orthohantavirus enfeksiyonlarının tanısında kullanılan anijenler, hücre kültüründe üretilmekte ve bulaş riski yüksek olan bu işlem, biyogüvenlik düzey 3 laboratuvarlarda

gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, ticari serolojik testlerin birçoğunda rekombinant DNA teknikleri ile üretilen antijenler kullanılmaktadır (20).

Tanıda virüse karşı antikor varlığının saptanabilmesi için en sık kullanılan yöntem, indirekt ELISA testidir. Bu yöntem için antijen olarak virüs ile enfekte lizatlar ya da pürifiye edilmiş N proteini kullanılabilir (20).

Orthohantavirus enfeksiyonlarının tanısında kullanılan bir diğer yöntem de immunoblot testleridir. İmmunoblot testlerinin duyarlılıkları ve özgüllükleri ELISA'dan daha yüksektir. Bu nedenle ELISA testlerinin doğrulanması ve enfeksiyona neden olan *Orthohantavirus* türünün saptanması amacıyla kullanılırlar. Ancak bazı *Orthohantavirus* türleri antijenik olarak birbirlerine benzer olduklarından çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir.

İndirekt immunofloresans testi (IFAT), hücre kültüründe *Orthohantavirus* ile enfekte edilen Vero E6 hücrelerinin lam üzerine fikse edilmesi ile hazırlanmaktadır. Son yıllarda geliştirilen IFAT testlerinde çapraz reaksiyonları ve yanlış pozitif sonuçları azaltmak için orthohantavirüslerin rekombinant proteinleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu rekombinant proteinlerin elde edilmesinde genellikle viral N proteininin antijenik determinantlarını ifade eden baculovirüs ve *Escherichia coli* ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır (121).

2.10.2 Moleküler Tanı

Moleküler yöntemler, serolojik yöntemlere göre duyarlılıklarının daha düşük olması nedeniyle öncelikli olarak tercih edilmemektedir. Ancak daha hızlı sonuç vermeleri, özellikle hızlı ilerleyen ve fatalite oranı yüksek olan HPS olgularında avantaj sağlamaktadır. Ters (“reverse”) transkripsiyon-polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) ile bir gün içerisinde sonuç alınabilmektedir. Viremi kısa süreli olduğundan viral RNA'yı saptamak güç olsa da doku örneklerinde yuvalanmış (“nested”)-RT-PZT ile saptanabilir (20).

Ayrıca *Orthohantavirus* türleri arasında çapraz tepkime olabildiğinden, serolojik yöntemlerle ayırt edilemeyen türler PZT ürünlerinin dizilenmesi ile ayırt edilebilmektedir (121).

2.11 Tedavi ve Korunma

Orthohantavirus ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek spesifik bir antiviral ajan bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalara destek tedavisi uygulanmaktadır. Destek tedavisi, semptomlara bağlı olarak sıvı takviyesi, elektrolit dengesinin izlenmesi, hemodiyaliz ve şok terapisinden oluşmaktadır.

Bir guanozin analogu olan ribavirin, *Orthohantavirus* replikasyonuna karşı *in vivo* ve *in vitro* etkilere sahip tek ajandır. Yapılan çalışmalarda, RSKA olgularında ve kemirici modellerinde virüs titresini ve mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (122, 123). Ancak doğrudan orthohantavirüse etkili değildir ve anemi gibi bazı yan etkileri bulunmaktadır (124-126). Ayrıca ribavirinin HPS hastalarında tedaviyi ve mortaliteyi etkilemediği gösterilmiştir (127).

Orthohantavirus enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek, doğrudan etkili bir ajan bulunmadığından, aşı çalışmaları ve enfeksiyondan korunma önem taşımaktadır (20). Orthohantavirüslere karşı aşı geliştirme çalışmalarında farklı teknikler uygulanmasına rağmen yalnızca HTNV'nin formalin ile inaktivasyonu sonucunda etkili bir aşı geliştirilebilmiştir (128). Cho ve Howard tarafından geliştirilen Hantavax® (Korea Green Cross, Seoul, Kore) isimli bu aşı, Dünya Sağlık Örgütü tarafından onaylanmadığından yalnızca Çin ve Kore'de ticari olarak satılmaktadır. Hantavax®'ın üçüncü aşılardan sonra IgG antikorlarını indüklediği ve aşılanan bireylerin %80'inde nötralizan antikor oluşturduğu gösterilmiştir.

Orthohantavirus enfeksiyonlarından korunmanın en iyi yolu, enfekte kemiriciler ile onların çıkartıları ve salgıları ile temastan kaçınmaktır (86, 127). Orthohantavirüsler, diğer tüm zarflı virüsler gibi ısı (60°C'de 30 dakika) ve ultraviyole ışın (UV) maruziyeti, asidik ortamlar, deterjanlar, organik çözücüler ve hipoklorit solüsyonları ile etkisiz hale gelmektedir (50). Ayrıca saha çalışmaları ile yaban hayatındaki kemirici populasyonlarında enfeksiyonun takibinin sağlanması, alandaki *Orthohantavirus* prevalansının belirlenmesini ve olası salgın bölgelerinin öngörülebilmesini sağlamaktadır (26, 32, 33, 129-134).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

“Türkiye'nin Akdeniz (Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye ve Hatay) ve İç Anadolu Bölgelerindeki (Konya, Aksaray, Niğde, Karaman) bazı illerde yaşayan *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Rattus* spp. ve *Talpa davidiana* türlerinde Hantavirus varlığının ve dağılımının araştırılması" adlı tez çalışması, deneysel niteliktedir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, Kasım 2013 tarihinde literatür taraması ile başlayıp Mayıs 2018 tarihinde tez çalışmasının yazımı ile tamamlandı. Çalışmaya ait laboratuvar deneyleri, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmada, 2015-2017 yıllarında Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Konya, Aksaray, Niğde ve Karaman illerine yapılan arazi çalışmaları sırasında canlı yakalama kapanları ile potansiyel *Orthohantavirus* taşıyıcısı olan *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Rattus* spp. ve *Talpa davidiana*'nın doğadan yakalanması ve bu kemiricilere ait serum ve doku örneklerinin toplanması planlandı.

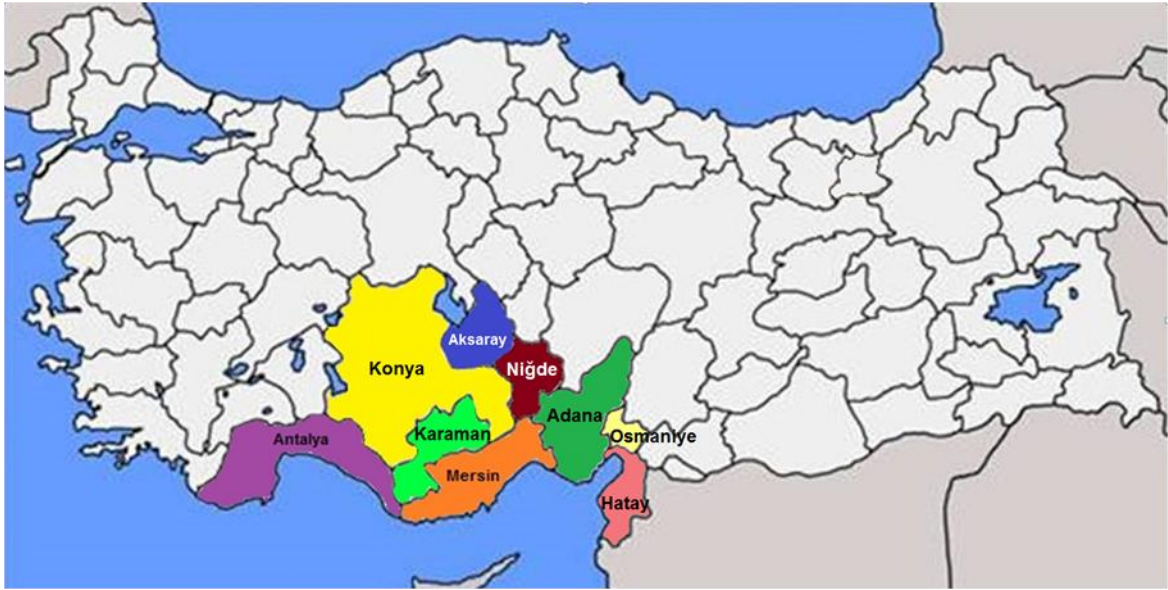
3.4 Çalışma Materyali

Bu çalışma için 15 Nisan 2015 - 30 Kasım 2017 tarihleri arasında Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Konya, Aksaray, Niğde ve Karaman illerine toplam 140 günlük arazi çalışması yapıldı (Şekil 10). Çalışma kapsamında, dokuz ilden 44 farklı lokaliteden "Sherman" tipi canlı yakalama kapanları (H.P. Sherman Traps Inc.) ile *Orthohantavirus* taşıyıcısı olarak bilinen *Apodemus*, *Microtus* ve *Rattus* türlerinden toplam 429 kemirici yakalandı. Örneklem yapılan lokalitelerin belirlenmesinde, bölgedeki buzul dönem sığınakları ve farklı bitki örtüsü yayılımları göz önünde bulunduruldu. Hedef bölgedeki *Orthohantavirus* yayılım durumunu temsil edebilecek şekilde, üç yıllık periyot dahilinde ve mevsimlere göre

dağılmış bir örneklem yapıldı. Her bir kemirici yuvasından bir veya en fazla iki kemirici olacak şekilde çok sayıda yuvadan örnekler toplanarak, bölgedeki *Orthohantavirus* prevalansının gerçeği yansıtacak şekilde belirlenmesi hedeflendi.

Çalışma kapsamında toplanması planlanan, bir köstebek türü olan *Talpa davidiana*, yayılım alanı olan Amanos Dağları'nın güvenlik sorunları nedeniyle kapalı olmasından dolayı toplanamadı.

Serolojik testler için kemiricilere ait serum örnekleri, moleküler testler içinse akciğer örnekleri kullanıldı.



Şekil 10. Arazi çalışması yapılan iller.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Kemiricilere ait serum örneklerinde orthohantavirüse karşı IgG izotipindeki antikor varlığı ve doku örneklerinde *Orthohantavirus* genomuna ait dizilerin saptanması "bağımlı değişkenler" iken *Orthohantavirus* varlığının saptandığı kemiricilerin türleri "bağımsız değişken" olarak değerlendirildi.

3.6 Veri Toplama Araçları

Tablo 5. Çalışma sırasında kullanılan cihaz, kimyasal ve sarf malzemelere ait bilgiler.

Malzeme Adı	Marka	Katalog No	Kullanıldığı Analiz
Canlı yakalama kapanı	H.P. Sherman Traps Inc.	-	Kemiricilerin yakalanması
GPS	Garmin	GPSMAP 64 s	Kapanların kurulduğu lokalitelere ait koordinatların işaretlenmesi
RNAlater	Invitrogen	AM7021	Doku örneklerinin saklanması
Vida kapaklı tüp (2 mL)	Greiner	126278	Dokuların saklanması
Bistüri ucu (22 numara)	plusMED	-	Dokuların kesilmesi
Paslanmaz çelik boncuklar (5 mm)	QIAGEN	69989	Dokuların homojenizasyonu
Ajitatör	Retsch	MM400	Dokuların homojenizasyonu
Anti-Hanta virus Pool ELISA IgG	Euroimmun	EI 278h-9601-1 G	ELISA testi
Euroline Anti-Hanta Profile 1	Euroimmun	DN 278h-1601-1 G	İmmunoblot testi
Vorteks	Stuart	SA8	Serumların homojenizasyonu
Orbital çalkalayıcı inkübatör	Stuart	SI500	ELISA plaklarının inkübasyonu
Horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti fare IgG konjugatı	Millipore	12-349	ELISA testi

Mikroplak okuyucu fotometre	Thermo Scientific	51119000	ELISA plaklarının OD değerlerinin okunması
Çalkalayıcı	Labnet International	S-1000	İmmunoblot şeritlerinin inkübasyonu
Alkalen fosfataz (AP) ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı	Santa Cruz	Sc-2008	İmmunoblot testi
PBS	Invitrogen	003002	ELISA ve immunoblot testleri
TRizol Reagent	Invitrogen	15596018	Viral RNA/DNA izolasyonu
Kloroform	Merck	1.02445.2500	Viral RNA/DNA izolasyonu
İzopropanol	Smyras	1490100	Viral RNA/DNA izolasyonu
Etanol	Sigma	32221	Viral RNA/DNA izolasyonu
Sodyum sitrat	Carlo Erba	368007	Viral RNA/DNA izolasyonu
DNAz/RNAz içermeyen distile su	Invitrogen	10977035	Viral RNA/DNA izolasyonu
Ters transkripsiyon kiti	Thermo Scientific	K1691	cDNA sentezi
Taq DNA polimeraz (500U)	Thermo Scientific	EP0402	PZT
dNTP Mix (10mM)	Thermo Scientific	R0193	PZT
Thermal cyclers	Techne	TC-412 ve TC-3000	cDNA sentezi ve PZT
50X Tris asetat-EDTA (TAE)	Applichem	A1691,5000CT	Agaroz jel elektroforezi
50 bp DNA ladder	Thermo Scientific	SM0371	PZT
100 bp DNA ladder	Thermo	SM0241	PZT

	Scientific		
1,5 mL'lik steril tüp	Greiner	616 201	Tüm testler
2 mL'lik steril tüp	Greiner	623 201	Tüm testler
0,2 mL'lik PZT tüpü	Axygen	PCR-02	PZT
Filtreli pipet ucu (0,5-10, 10-100, 100-1000 µL)	SSIBIO	-	Tüm testler
Agaroz	Applchem	A2114,0500	Agaroz jel elektroforezi
SafeView	ABM	G108	Agaroz jel elektroforezi
Pipet seti (1-10, 10-100, 100-1000 µL)	Thermo Scientific	FP-4700850	Tüm testler
Elektroforez tankı	Thermo Scientific	ELED-B2	Agaroz jel elektroforezi
Güç kaynağı	Thermo Scientific	EC 3000 XL	Agaroz jel elektroforezi
Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat	-	Agaroz jel elektroforezi
Mikrodalga fırın	Roda	RD-7017PA	Agaroz jel elektroforezi
-80°C derin dondurucu	New Brunswick Scientific	U410	Örneklerin saklanması
-20°C derin dondurucu	Ariston	-	Malzemelerin ve örneklerin saklanması
+4°C derin dondurucu	Vestel	-	Malzemelerin saklanması
Hassas terazi	Sartorius	-	Kimyasalların tartılması
Nitril eldiven	SeaSoul	-	Viral RNA/DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi

Pudralı eldiven	Tenty	-	Tüm testler
Pudrasız eldiven	Tenty	-	PZT
Su banyosu	Memmert	-	Viral RNA/DNA izolasyonu
Soğutmalı santrifüj	Heraeus	Labofuge 400R	Viral RNA/DNA izolasyonu
Çeker ocak	Köttermann	2-453-GAND	Viral RNA/DNA izolasyonu

3.6.1 Arazi Çalışmaları

Hedef kemirici türleri, “Sherman” tipi canlı yakalama kapanları (H.P. Sherman Traps Inc.) ile toplandı. Her kapan, türlerin daha önceden belirlenmiş olan yayılım alanları ve çalışma yapılan bölgedeki habitat uygunluğu referans alınarak kuruldu.

Kapanlar, alanlarda 10’ar metrelik aralıklarla yerleştirildi ve her kapanlama noktası, küresel yer belirleme sistemi (GPS) (Garmin) kullanılarak, kayıt altına alındı. Kapanlar akşam günbatımından kısa süre önce kurulup, sabah gündeğumundan kısa süre sonra toplandı. Hedef türler dışında kapana yakalanan diğer canlılar, tür ve lokasyon kayıtları alındıktan sonra aynı noktaya geri bırakıldı.

3.6.2 Örnek Toplama

Kemiriciler, yakalandıktan sonra canlı halde Bülent Ecevit Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Sistemik Laboratuvarı’na götürüldü. Örnekler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi ve kalp boşluklarından enjektör yardımı ile kan alındı. Kemiricilerin fenotipik tür tayinlerinin yapılabilmesi için gerekli olan vücut ölçümleri (ağırlık, tüm boy, kuyruk, kulak ve arka ayak uzunlukları) yapıldı ve fenotipik özellikleri kaydedildi. Diseksiyon sırasında kemiricilerin akciğer, karaciğer, dalak ve böbrek dokuları, RNA stabilize edici solüsyon (RNAlater) (Invitrogen) içeren tüplere alındı ve moleküler testler için kullanılabilecek kadar -80°C derin dondurucuda (New Brunswick Scientific) saklandı. Alınan kan örneklerinin aynı gün içerisinde serumları ayrıldı ve serolojik testler için kullanılabilecek kadar -80°C derin dondurucuda (New Brunswick Scientific) saklandı.

3.6.3 Laboratuvar Çalışmaları

3.6.3.1 Serolojik Tarama

Kemiricilerin serumlarında DOBV, PUUV ve HTNV'ye karşı IgG antikorlarının varlığı, Polat ve ark. tarafından optimize edilen ELISA ve immunoblot yöntemleri ile tarandı (120).

Bu çalışmada kullanılan serolojik testlerde anti-fare antikorları kullanıldığından ve *Rattus* spp. türüne ait antikorların anti-fare antikorları tarafından tanınmamasından dolayı, *Rattus* spp. türüne ait serum örnekleri her iki test ile de taranamadı. Ancak bu kemiricilere ait akciğer dokuları virüs varlığı açısından moleküler yöntemler ile tarandı.

3.6.3.1.1 "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA)

Test için, DOBV, PUUV ve HTNV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı "Anti-Hanta virus Pool ELISA IgG" plakları (Euroimmun) kullanıldı.

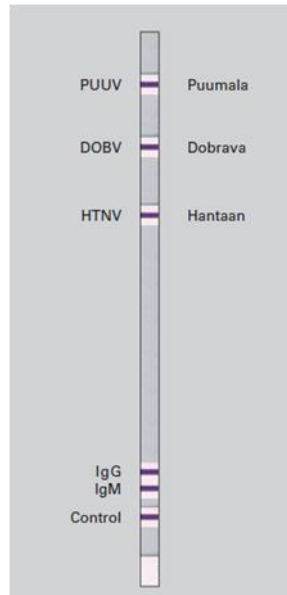
- Kemiricilere ait serum örnekleri, 1/50 oranında fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile seyreltildi. Bir dakika vorteks karıştırıcı ile homojenize edildikten sonra 30 saniye santrifüjle dipte toplandı. Antijen kaplı plaklardaki her bir kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş serum örneği eklendi. Her örnek çift kuyucuk olacak şekilde çalışıldı.
- Seyreltilmiş serum örnekleri eklendikten sonra plaklar, orbital çalkalayıcı inkübatörde (Stuart) 37°C'de bir saat inkübe edildi.
- Inkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra, deterjan içeren yıkama tamponu ile üçer kez yıkandı. Her bir yıkamada, her kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanıldı ve 30 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plaklar boşaltıldı.
- Yıkama sonrasında kuyucuklara, 1/10.000 oranında PBS ile seyreltilmiş "horseradish" peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore) 100 µL eklendi.
- Orbital çalkalayıcı inkübatörde (Stuart) 37°C'de bir saat inkübe edildi.
- Inkübasyon sonrasında yukarıda anlatılan yıkama işlemi tekrarlandı.

- Yıkama işlemini takiben, her kuyucuğa 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit (TMB/H₂O₂) kromojen/substrat solüsyonu eklendi ve karanlık ortamda, oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında substrat solüsyonunun üzerine 100 µL 0,5 molar (M) sülfirik asit (H₂SO₄) eklenerek, tepkime durduruldu.
- Örneklerin optik dansite (OD) değerleri, tepkimenin durdurulmasını takip eden 30 dakika içerisinde, mikropalak okuyucu fotometre (Thermo Scientific) ile 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçüldü.

OD değeri, eşik değeri olarak kabul edilen 0,325 ve üzerinde olan örnekler pozitif, 0,325'in altında olan örnekler ise negatif olarak değerlendirildi (120).

3.6.3.1.2 İmmunoblot

ELISA ile OD değeri 0,325 ve üzerinde saptanan örneklerin sonuçları, *Orthohantavirus* enfeksiyonlarının değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilen immunoblot testi ile doğrulandı. Test için HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş "Euroline Anti-Hanta Profile 1" şeritleri (Euroimmun) kullanıldı (Şekil 11).



Şekil 11. *Orthohantavirus* türlerine göre oluşan IgG yanıtının immunoblot şeritlerindeki görünümü.

Serum ve konjugat dilüsyonları ve yıkama basamaklarında, distile su ile 1x olacak şekilde seyreltilen genel tampon (10x) kullanıldı. Hazırlanan tüm dilüsyonlar, aynı gün kullanıldı.

- Kullanılacak her bir şerit, inkübasyon tepsisine yerleştirildi ve 1,5 mL bloklama tamponu içerisinde 15 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı (Labnet International) üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında sıvı aspire edildi ve şerit üzerine 1,5 mL 1/100 oranında 1x genel tampon ile seyreltilen serumlar eklendi.
- Oda sıcaklığında çalkalayıcı (Labnet International) üzerinde 30 dakika inkübe edildikten sonra serum örnekleri aspire edildi.
- Şeritler, üçer kez beşer dakika 1,5 mL 1x genel tampon içerisinde yıkandı.
- Yıkama sonrasında, her bir şerit üzerine 1/5.000 oranında 1x genel tampon ile seyreltilen alkalen fosfataz (AP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Santa Cruz) 1,5 mL eklendi.
- Şeritler, oda sıcaklığında çalkalayıcı (Labnet International) üzerinde 30 dakika inkübe edildi.
- Konjugat aspire edildikten sonra yukarıda anlatılan yıkama işlemi tekrarlandı.
- Yıkama sonrasında her bir şerit üzerine 1,5 ml nitrobluetetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) substrat solüsyonu eklendi.
- Şeritler, oda sıcaklığında çalkalayıcı (Labnet International) üzerinde 10 dakika inkübe edildi.

Substrat solüsyonu aspire edildikten sonra her bir şerit, üçer kez birer dakika distile su ile yıkandı ve kuruduktan sonra değerlendirildi (120).

3.6.3.2 Moleküler Tarama

3.6.3.2.1 RNA/DNA İzolasyonu

RNAlater (Invitrogen) içerisinde saklanan akciğer dokularından Chomczynski ve Sacchi tarafından bildirilen guanidin-tiyosiyanat-fenol-kloroform yöntemi ile viral RNA ve DNA izolasyonu yapıldı (135).

Her bir doku örneği için 500 µL TRIzol (Invitrogen) içerisine 50-100 mg doku örneği konuldu ve 5 milimetre (mm) çapındaki paslanmaz çelik boncuklarla (Qiagen) ajitatörde (Retsch) sert çalkalamayla homojenize edildi.

3.6.3.2.1.1 Faz Seperasyonu

Homojenizasyon sonrasında örnekler, RNA ve DNA izolasyonunun yapılmasını sağlayacak şekilde fazlara ayrıldı.

- Örnekler, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve 100 µL kloroform eklendikten sonra 15 saniye yavaşça karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 2-3 dakika tekrar inkübe edildikten sonra 12.000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj ile çöktürüldü.
- Oluşan renksiz üst sulu faz viral RNA izolasyonunda, beyaz renkteki interfaz ve pembe renkteki organik faz ise DNA izolasyonunda kullanıldı.

3.6.3.2.1.2 RNA İzolasyonu

- Renksiz üst sulu faz, temiz bir tüpe aktarıldı ve 250 µL izopropanol eklenerek, dikkatlice karıştırıldı.
- RNA'nın çökmesi için 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj ile çöktürüldü.
- Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra 500 µL %75 ethanol eklendi.
- RNA çökeltisi vorteks (Stuart) ile etanolde yıkandıktan sonra 7.500 x g'de 5 dakika 4°C'de santrifüjle çöktürüldü.
- Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra RNA çökeltisi fazla etanol, 5-10 dakika tüplerin kapakları açık olacak şekilde inkübe edilerek uçuruldu.

- RNA çökeltisi, 20 µl RNase içermeyen suda süspansiyon haline getirildi ve 55-60°C’de 10-15 dakika inkübe edildikten sonra -80°C’de saklandı.

3.6.3.2.1.3 DNA İzolasyonu

- Tüp içerisindeki interfaz ve organik fazın üzerine 150 µL %100 etanol eklendi ve karıştırıldıktan sonra 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 2.000 x g’de 5 dakika 4°C’de santrifüj ile çöktürüldü ve üst faz uzaklaştırıldı.
- Üst faza 500 µL 0,1M sodyum sitrat içeren %10 etanol eklendi ve ara sıra karıştırılarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2.000 x g’de 5 dakika 4°C’de santrifüjlenerek yıkandı.
- Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi tekrarlandı.
- DNA çökeltisine 1 ml %75 etanol eklendi ve ara sıra karıştırılarak 10-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 2.000 x g’de 5 dakika 4°C’de santrifüj ile çöktürüldükten sonra üst faz uzaklaştırıldı.
- DNA çökeltisindeki fazla etanol, tüplerin kapakları açık olacak şekilde 5-10 dakika inkübe edilerek uçuruldu.
- Çökeltilerin üzerine 300 µl 8 milimolar (mM) NaOH eklendi ve çözünmeyen parçacıkların uzaklaştırılması için 12.000 x g’de 10 dakika 4°C’de santrifüj ile çöktürüldü.
- DNA içeren üst faz, temiz bir tüpe aktarılarak, -80°C’de saklandı.

3.6.3.2.2 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzolasyon sonucunda elde edilen RNA ürünleri, RevertAid RT kiti (Thermo Scientific) kullanılarak ters transkripsiyon yöntemi ile komplementer DNA (cDNA)’ya çevrildi.

Karışım, toplam hacim 20 µL olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnek için 5’er µL RNA kullanıldı. RNA’ya 100 µM “random hexamer” eklendi ve karışım DNaz/RNaz içermeyen su ile 12 µL’ye tamamlandı. 65°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra 4 µL 5x tampon, 20 ünite (U) RiboLock RNase inhibitörü, 20 mM dNTP ve 200 U RevertAid RT enzimi eklendi. Karışım, sırasıyla 25°C’de 5 dakika, 42°C’de 60 dakika ve 70°C’de 5 dakika inkübe edildi.

Tepkime sonunda elde edilen cDNA ürünleri, polimeraz zincir tepkimesinde (PZT) kalıp olarak kullanılana kadar -80°C’de saklandı.

3.6.3.2.3 Pan-hanta L-segment Yuvalanmış PZT

Kemiricilere ait akciğer dokularından izole edilen cDNA ürünleri, bilinen tüm orthohantavirüslere özgül olan pan-hantavirus L-segment öncül setleri kullanılarak tarandı (Tablo 6) (136). Bu öncül setleri, *Orthohantavirus* genomunda RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlayan L-segmentteki korunmuş bölgeleri tanımaktadır.

Tablo 6. Pan-hantavirus L-segment taramasında kullanılan öncüller (136).

Öncül adı	Polarite	Dizi
HanLF1	Sense	5'-ATG TAY GTB AGT GCW GAT GC-3'
HanLR1	Antisense	5'-AAC CAD TCW GTY CCR TCA TC-3'
HanLF2	Sense	5'-TGC WGA TGC HAC XAA RTG GTC-3'
HanLR2	Antisense	5'-GCR TCR TCW GAR TGR TGD GCA A-3'

Tepkimeler, toplam hacimleri 25 µL olacak şekilde hazırlandı. Tepkimenin birinci basamağında 2 µL cDNA, ikinci basamağında ise 2 µL 1. tepkimeden elde edilen PZT ürünü kullanıldı. Tepkimeler sırasında kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları ile amplifikasyon koşulları aşağıda belirtilmiştir (Tablo 7-10).

Tablo 7. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 1. tepkimesinde kullanılan malzemelerin, konsantrasyonları ve hacimleri.

	Hacim
10x Tampon (MgCl ₂ içermez)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
dNTP (10 mM)	0,2 mM
HanLF1	10 µM
HanLR1	10 µM

Taq DNA polimeraz (5U/ μ L)	2,5 U
cDNA	2 μ L
Son Hacim	25 μ L

Tablo 8. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 1. tepkimesindeki amplifikasyon koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94°C	1 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	5
Bağlanma	60°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	5
Bağlanma	58°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	5
Bağlanma	56°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	20
Bağlanma	52°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	1

Tablo 9. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 2. tepkimesinde kullanılan malzemelerin, konsantrasyonları ve hacimleri.

	Hacim
10x Taq Tampon (MgCl ₂ içermez)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
dNTP (10 mM)	0,2 mM
HanLF2	10 µM
HanLR2	10 µM
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	2,5 U
1. tepkime ürünü	2 µL
Son Hacim	25 µL

Tablo 10. Pan-hanta L-segment yuvalanmış PZT'nin 2. tepkimesindeki amplifikasyon koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94°C	1 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	35
Bağlanma	53°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	1

3.6.3.2.4 *Microtus* Topluluklarının Mitokondriyal DNA (mtDNA) Soylarının Teşhisi

Microtus türleri, fenotipik olarak birbirlerine çok benzer olduklarından, yakalanan kemiricilerin mtDNA soylarının saptanabilmesi için genotipik tür tayini yapıldı. *Microtus* türlerinin yakalandığı her lokaliteden en az bir kemiricinin tür tayini yapıldı. Mitokondriyal genomda bulunan *sitokrom-b* geni, PZT ile çoğaltıldı (Tablo 11) (137). Tepkimeler, toplam hacimleri 25 µL olacak şekilde hazırlandı. Tepkime sırasında kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları ile amplifikasyon koşulları aşağıda belirtilmiştir (Tablo 12 ve 13).

Tablo 11. *Microtus* topluluklarının mtDNA soylarının teşhisinde kullanılan, *sitokrom-b* genine özgül öncül dizileri (137).

Öncül adı	Polarite	Dizi
L14727-sp	Sense	5'-GAC AGG AAA AAT CAT CGT TG-3'
H15915-sp	Antisense	5'-TTC ATT ACT GGT TTA CAA GAC-3'

Tablo 12. *Sitokrom-b* PZT'de kullanılan malzemelerin, konsantrasyonları ve hacimleri.

	Hacim
10x Taq Tampon (MgCl ₂ içermez)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM
dNTP (10 mM)	0,2 mM
L14727-sp	10 µM
H15915-sp	10 µM
Taq DNA polimeraz(5U/µL)	1,25 U
DNA	0,5 µL
Son Hacim	25 µL

Tablo 13. *Sitokrom-b* PZT amplifikasyon koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
Bağlanma	54°C	60 saniye	
Uzama	72°C	90 saniye	
Son uzama	72°C	10 dakika	1

3.6.3.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

PZT ürünlerinin görüntülenebilmesi için 1X Tris asetat-EDTA tamponu (TAE) içerisinde %1,5'lik agaroz jel hazırlandı. 100 mL 1X TAE tamponu (Applichem) içerisine 1,5 gr agaroz (Applichem) konuldu. Mikrodalga fırında (RODA) eritildikten sonra 5 µL SafeView (ABM) eklendi. Hazırlanan karışım, elektroforez tankının kalıbına döküldü ve tarakları yerleştirildi (Thermo Scientific). Jel donduktan sonra tank, 1X TAE tamponu ile dolduruldu ve taraklar jelden çıkarıldı.

Jeldeki her bir kuyucuğa, 5 µL PCR ürünü ve 1 µL yükleme boyası karıştırılarak yüklendi. Örneklerdeki bant büyüklüklerinin karşılaştırılabilmesi için "DNA ladder" (Thermo Scientific) kullanıldı. Jele yüklenen örnekler, 110 volt'ta 50 dakika yürütüldü. Sonuçlar, ultraviyole transilluminatörde (Vielber Lourmat), Infinity Capt yazılımı kullanılarak, görüntülendi.

3.6.3.2.6 Dizi Analizi

Microtus türlerinin genotipik tür tayinlerinin yapılabilmesi için PZT ürünleri, Sanger dizileme yöntemi ile dizilendi. Çalışmanın bu basamağı, hizmet alımı yolu ile yapıldı.

Elde edilen diziler, "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) ile değerlendirildi ve mitokondriyal soylarının tespiti yapıldı (138).

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 14. Araştırma planı ve takvimi.

Kasım 2013 - Şubat 2014	Literatür taraması
Mart 2014 - Ağustos 2014	Etik kurul onayı, Orman ve Su İşleri Bakanlığı'ndan izin alımı
Eylül 2014 - Ocak 2015	TÜBİTAK proje başvurusu ve kabulü
Nisan 2015 - Aralık 2016	Sarf ve demirbaşların alımı
Nisan 2015 - Kasım 2017	Saha çalışması ve örneklerin toplanması, serolojik ve moleküler yöntemlerin uygulanması
Aralık 2017 - Mayıs 2018	Sonuçların değerlendirilmesi ve tez yazımı

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Orthohantavirus taşıyıcısı olan enfekte kemiriciler, sekresyonları aracılığıyla virüsü uzun yıllar çevreye saçmaktadır. Bu nedenle yakalanan kemiriciler virüs ile enfekteyse, virüsün ve/veya virüse karşı antikor varlığının saptanma ihtimali yüksektir. Yakalanan kemiricilerin virüs ile karşılaşmış olma ihtimallerinin değerlendirilebilmesi için hem serolojik hem de moleküler testler ile kullanıldı.

Serolojik testlerden ELISA'ya ait veriler, belirlenen eşik değeri göz önünde bulundurularak pozitif ve negatif olarak değerlendirildi. Ancak belirlenen bu eşik değeri, bazı kemirici örneklerinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle ELISA testi sonucunda seropozitiflik saptanan tüm örnekler, başka bir serolojik test olan ve altın standart olarak kabul edilen immunoblot testi ile doğrulandı. Böylelikle olası yanlış pozitif örneklerde, doğru sonuç elde etme ihtimali arttırıldı ve enfeksiyon kaynağı olan *Orthohantavirus* türünün belirlenmesi hedeflendi.

Orthohantavirus enfeksiyonları, çoğunlukla viral partiküllerin aerosolizasyonu yoluyla bulaştığından, enfeksiyondan ilk etkilenen organ akciğerdir. Bu nedenle seropozitiflik saptansın ya da saptanmasın yakalanan tüm kemiricilere ait akciğer dokularında virüs varlığı moleküler yöntemler ile araştırıldı.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Arazi çalışmaları kapsamında gidilmesi planlanan Antakya ili Amanos Dağları'ndaki güvenlik sorunları nedeniyle bölgeye girilememiş ve bu bölgede yayılım gösteren *Talpa davidiana* türüne ait örnekler toplanamamıştır.

Kemirici serumlarının *Orthohantavirus* açısından serolojik olarak taranmasında kullanılan testler, anti-fare antikoru ile uyumludur. Bu nedenle çalışma kapsamında yakalanan *Rattus* spp. türünden kemiricilere ait serum örnekleri, orthohantavirüse karşı antikor varlığı açısından değerlendirilememiştir. Ancak yakalanan tüm kemiricilere ait doku örnekleri virüs varlığı açısından moleküler yöntemler ile tarandığından, olası bir *Orthohantavirus* pozitifliği kaçırılmamıştır.

Çalışmanın bir diğer sınırlılığı ise kullanılan serolojik testlerin, orthohantavirüsün yalnızca DOBV, PUUV ve HTNV türlerini belirleyebilmesidir. Bu nedenle, kemiricilerin orthohantavirüsün farklı türleri ile enfekte olması halinde, bu türler serolojik yöntemler ile tespit edilemeyecektir. Fakat kemiricilere ait doku örneklerinin moleküler olarak taranmasında bilinen tüm *Orthohantavirus* türlerini saptamaya yarayan pan-hantavirüs öncülleri kullanılmıştır. Böylelikle kemiricilerin DOBV, PUUV ve HTNV türlerinden farklı bir *Orthohantavirus* türü ile enfekte olması durumunda, bu *Orthohantavirus* türü moleküler yöntemler ile saptanabilecektir.

3.10 Etik Kurul Onayı

Çalışma planı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu tarafından 04.03.2014 tarih ve 15/2014 protokol numaralı karar ile onaylanmış, 18.03.2014 ve 19.08.2014 tarihlerindeki kararlar ile çalışmanın başlığında değişiklik yapılması uygun görülmüştür. Onay belgeleri, EK-I'de belirtilmiştir.

Kemiricilerin doğadan yakalanması için Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden alınan, 08.09.2014 tarih ve 72784983-488.04-183208 sayılı izin belgesi, EK-II'de belirtilmiştir.

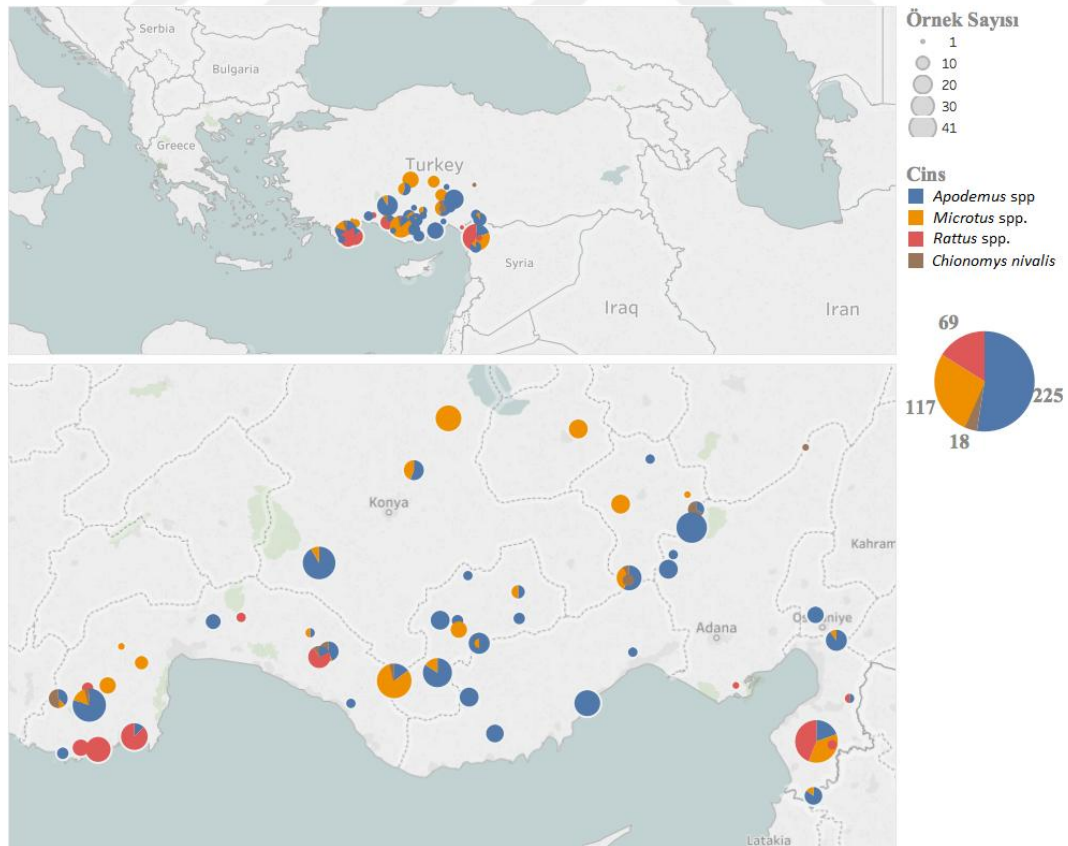


4. BULGULAR

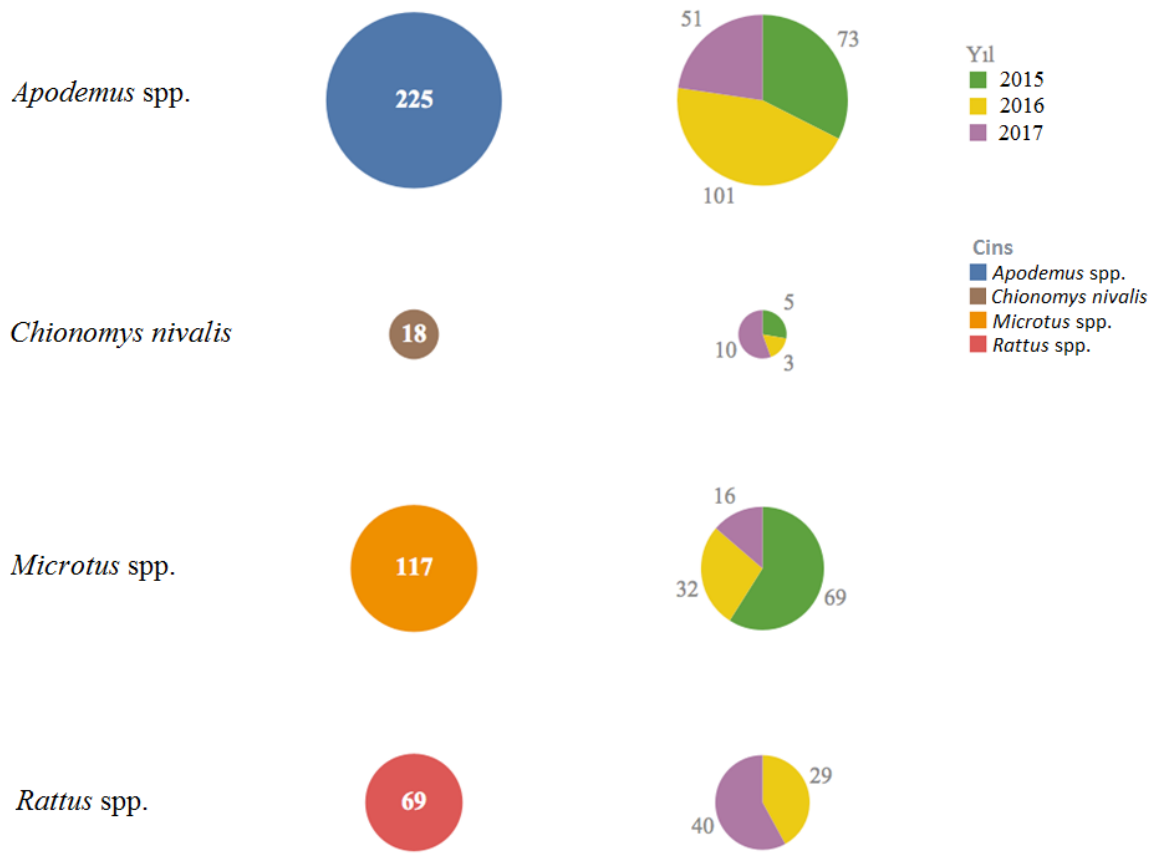
4.1 Örnek Grubu

15 Nisan 2015 - 30 Kasım 2017 tarihleri arasında Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Konya, Aksaray, Niğde ve Karaman illerine yapılan 140 günlük arazi çalışması sonucunda toplam 429 adet kemirici yakalandı (Şekil 12-14). Fenotipik olarak teşhisleri yapılan 225 adet *Apodemus* spp., 117 adet *Microtus* spp., 18 adet *Chionomys nivalis* ve 69 adet *Rattus* spp.'ye ait serum ve doku örnekleri kullanılarak *Orthohantavirus* taraması yapıldı (Şekil 13, 15-21).

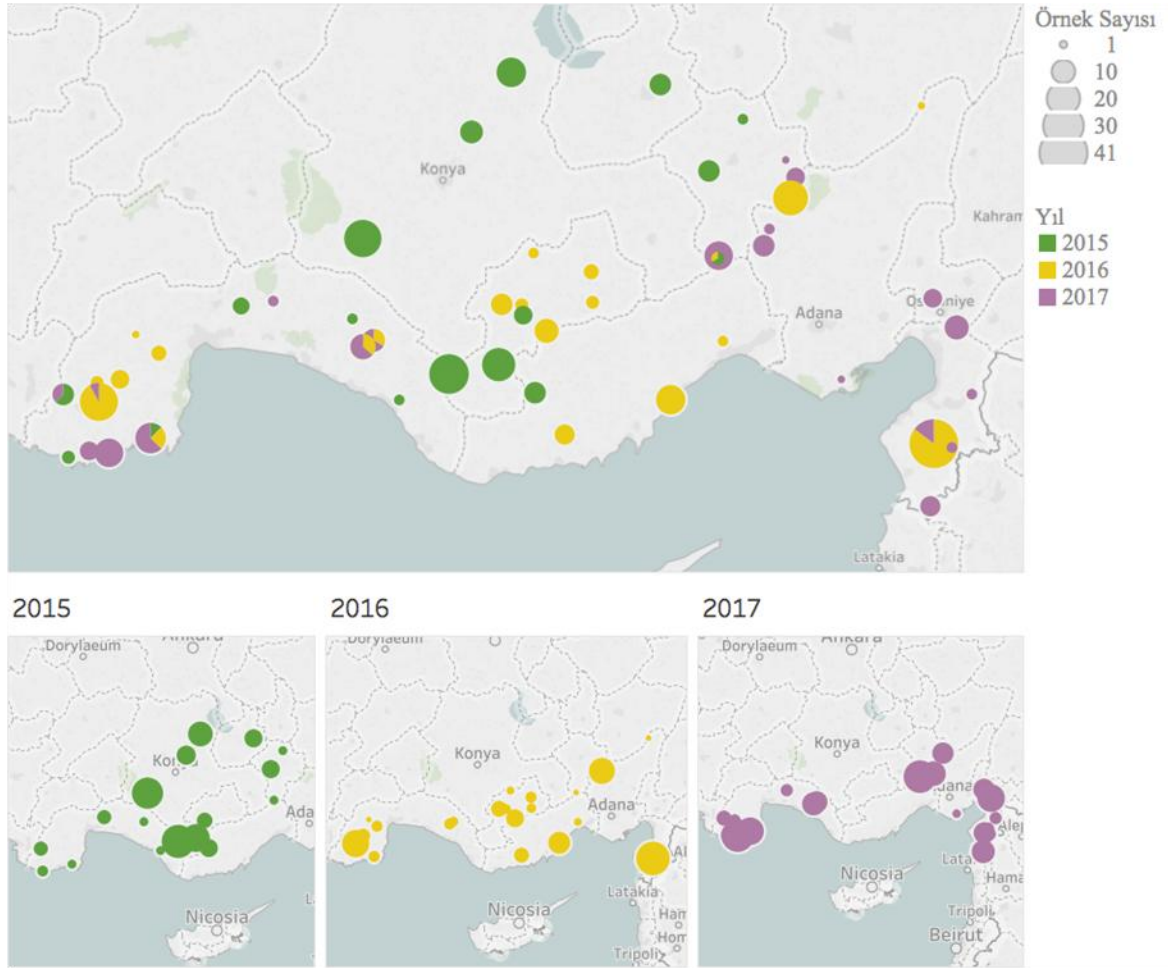
Chionomys nivalis, bu çalışmanın hedef türlerinden biri gibi görünmemesine karşın daha önce *Microtus* cinsi içerisinde sınıflandırılmaktaydı. Yapılan çalışmalarda bu grubun *Microtus*'un kardeş taksonu olduğu gösterilmiştir (139). Günümüzde farklı bir cins olarak sınıflandırılmasına rağmen, hedef gruba yakın akraba olması sebebiyle potansiyel *Orthohantavirus* taşıyıcısı olabileceği düşünülerek, yakalanan *Chionomys nivalis* örnekleri de çalışmaya dahil edildi.



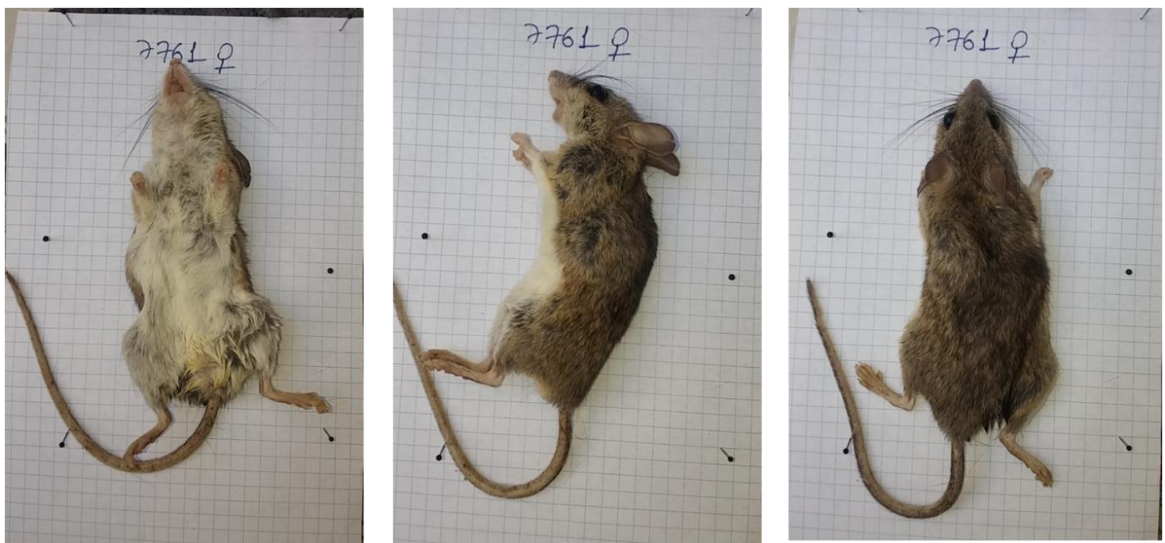
Şekil 12. Örneklerin toplandığı lokaliteler ve türlere göre dağılımı.



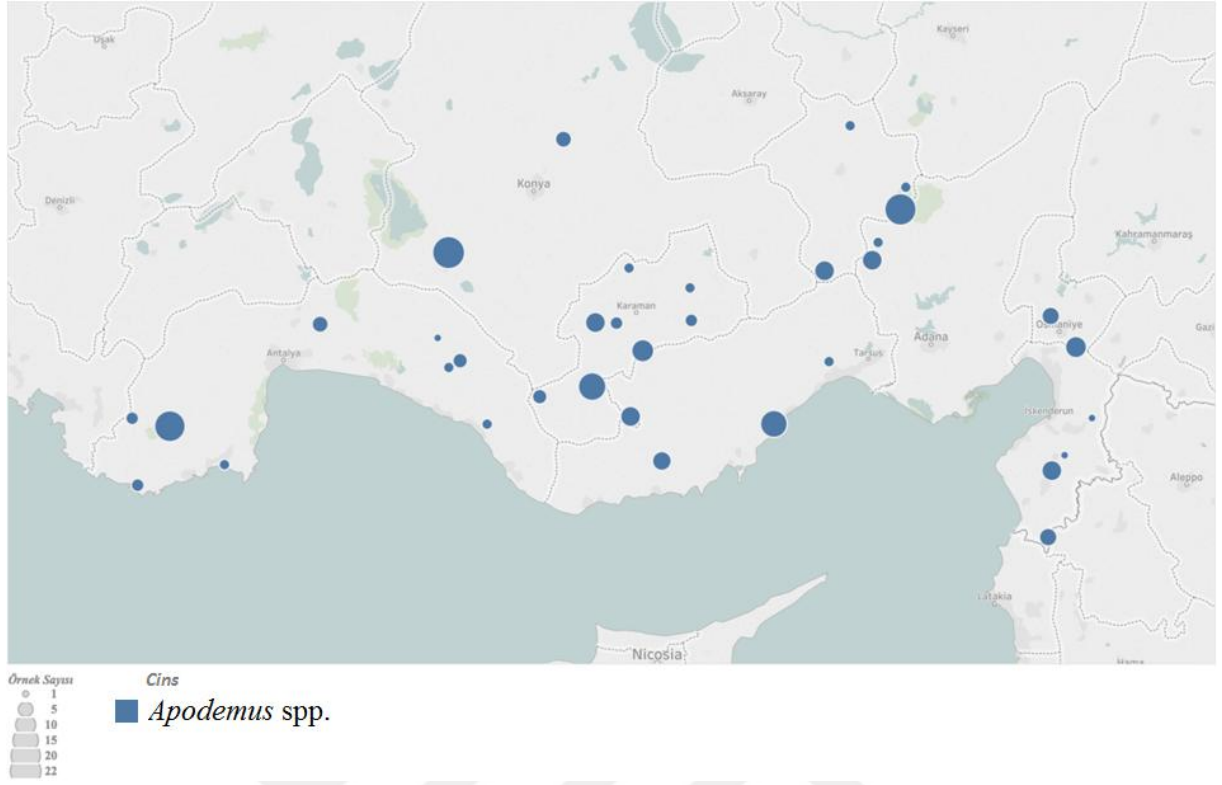
Şekil 13. Yakalanan örneklerin yıllara göre sayıları (A) ve toplam sayıları (B).



Şekil 14. Örneklerin yıllara göre dağılımı.



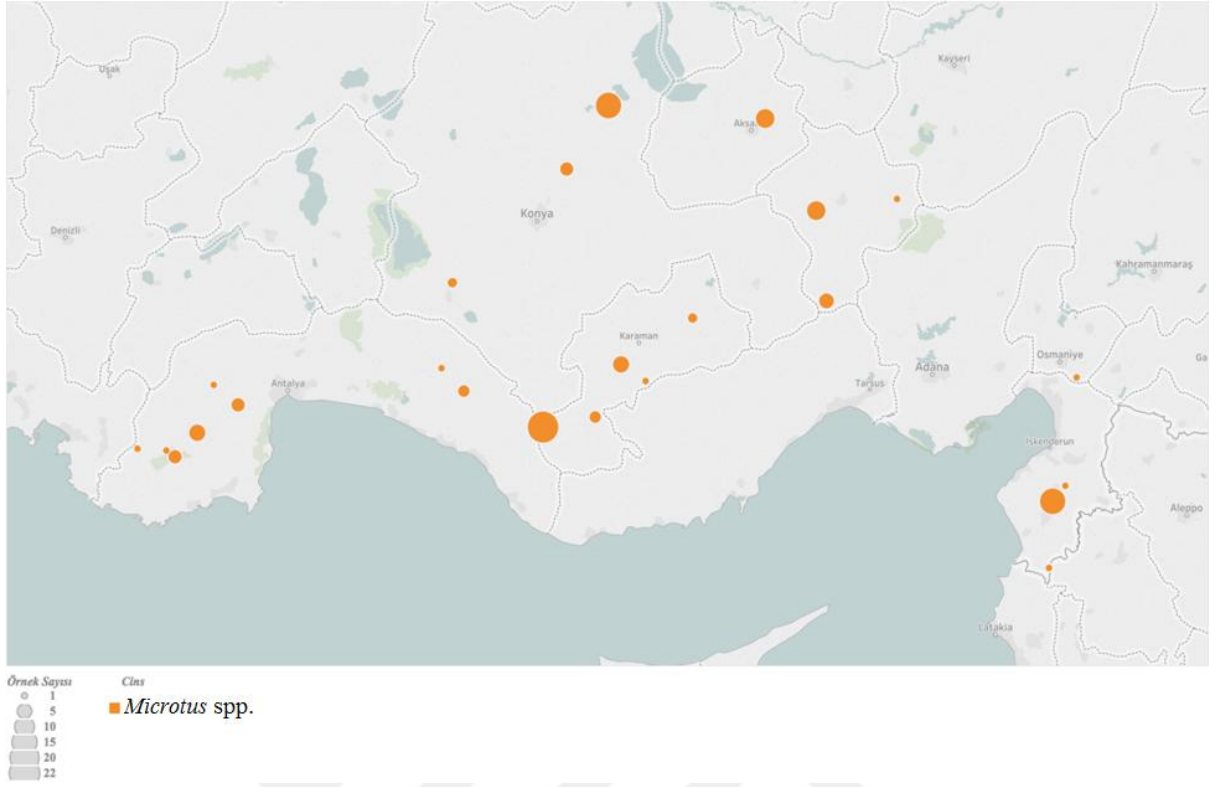
Şekil 15. *Apodemus mystacinus*'un ventral, lateral ve dorsal görünümü.



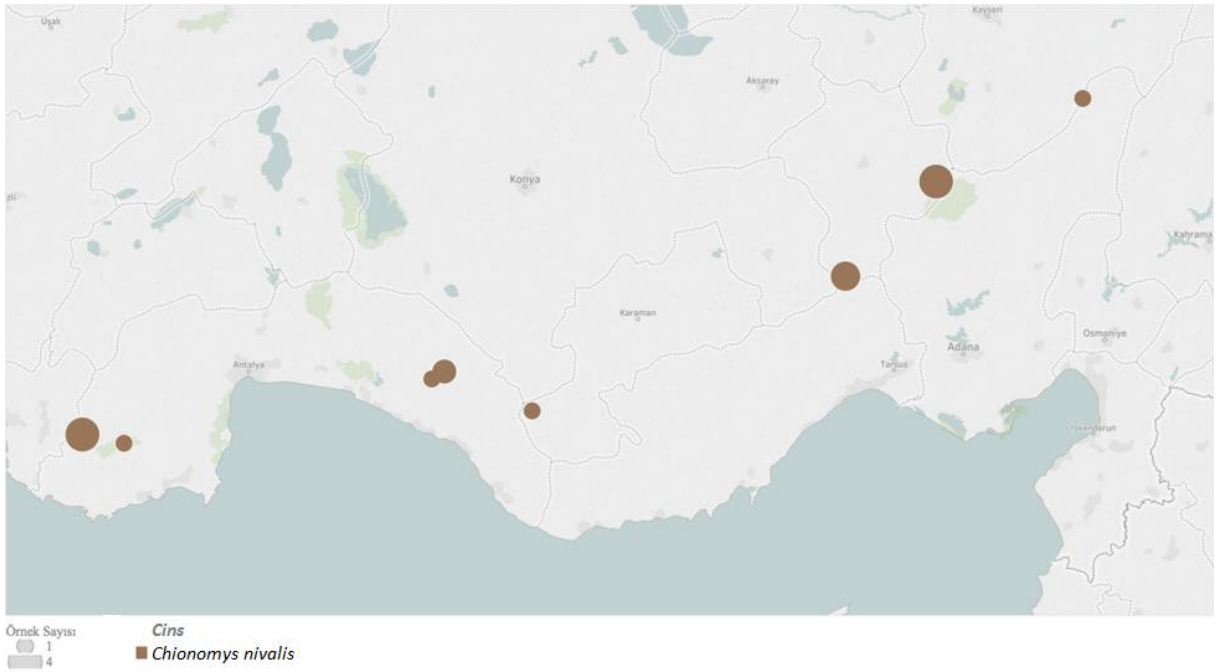
Şekil 16. Arazi çalışması sonucunda *Apodemus* türlerinin yakalandığı lokaliteler.



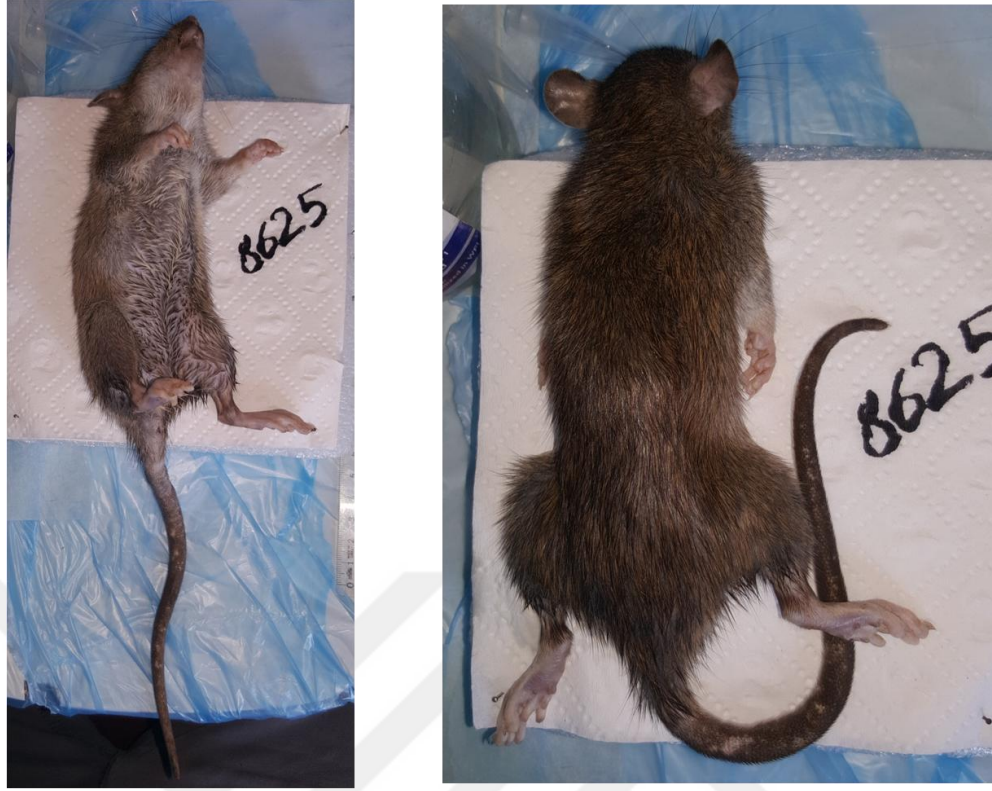
Şekil 17. *Microtus guentheri*'nin ventral, lateral ve dorsal görünümü.



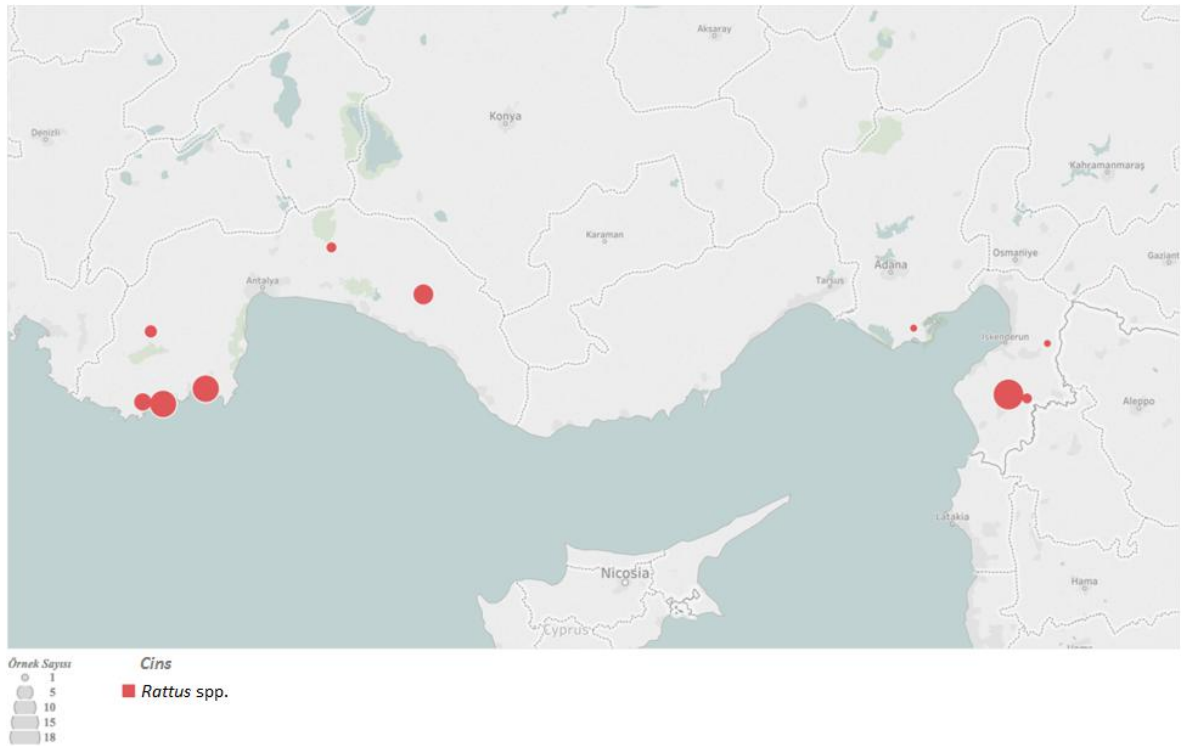
Şekil 18. Arazi çalışması sonucunda *Microtus* türlerinin yakalandığı lokaliteler.



Şekil 19. Arazi çalışması sonucunda *Chionomys nivalis* örneklerinin yakalandığı lokaliteler.



Şekil 20. *Rattus norvegicus*'un dorsal ve ventral görünümü.



Şekil 21. Arazi çalışması sonucunda *Rattus* türlerinin yakalandığı lokaliteler.

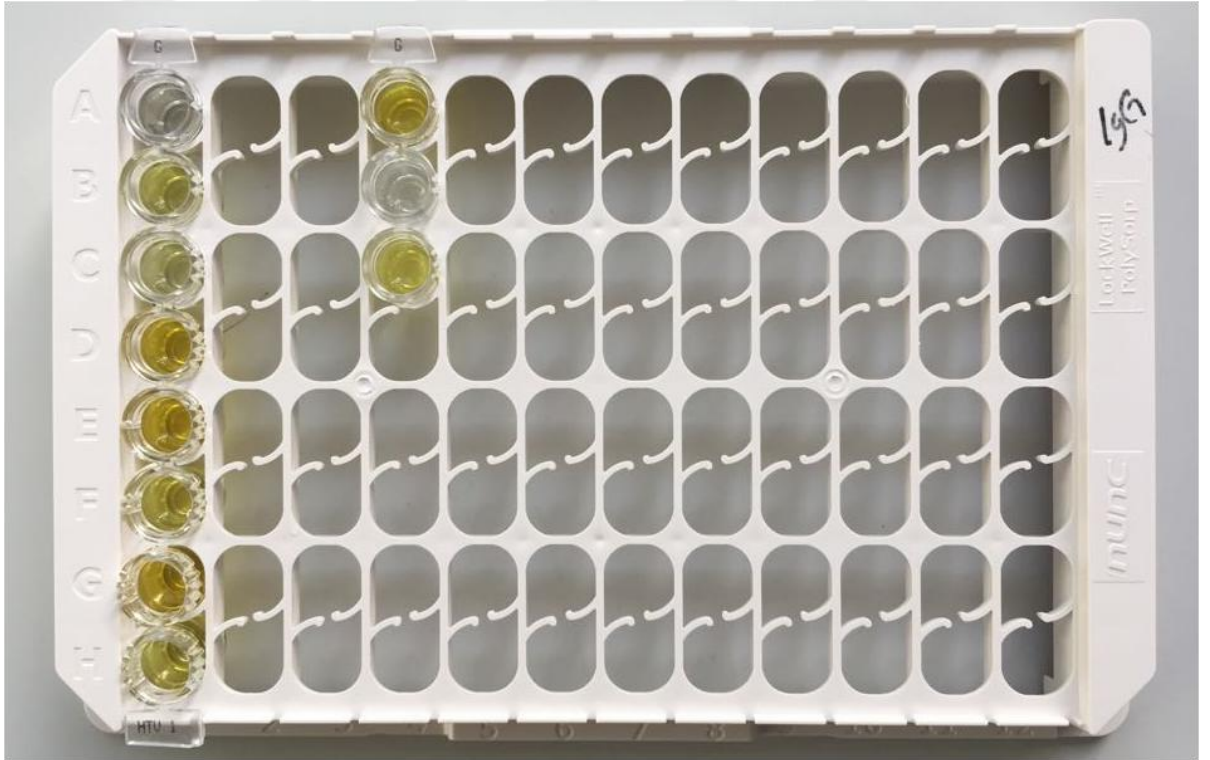
4.2 Serolojik Tarama

4.2.1 ELISA

ELISA testinde anti-fare antikoru kullanıldığından, *Rattus* spp. türünden kemiricilere ait serum örnekleri serolojik olarak taranamadı.

Kan örneği alınabilen, 118 adet *Apodemus* spp., 55 adet *Microtus* spp. ve 2 adet *Chionomys nivalis* olmak üzere toplam 175 adet kemiriciye ait serum örnekleri, orthohantavirüse karşı antikor varlığı açısından serolojik olarak tarandı (Şekil 22). Örneklerin hiçbirinde seropozitiflik saptanmadı.

Kan örneği alınamayan 185 adet kemiricinin serolojik taraması için kemiricilere ait kalp dokuları kullanıldı. Bu örneklerde de seropozitifliğe rastlanmadı.



Şekil 22. Kemirici serumlarının çalışıldığı ELISA testine ait plak görüntüsü.

4.2.2 İmmunoblot

ELISA testi ile taraması yapılan kemiricilerin seronegatifliklerinin doğrulanması için, immunoblot testi uygulandı (Şekil 23). İmmunoblot testinin sonuçları, ELISA testi ile uyumluluk gösterdi ve serolojik taraması yapılan tüm kemiricilerin seronegatif oldukları doğrulandı.

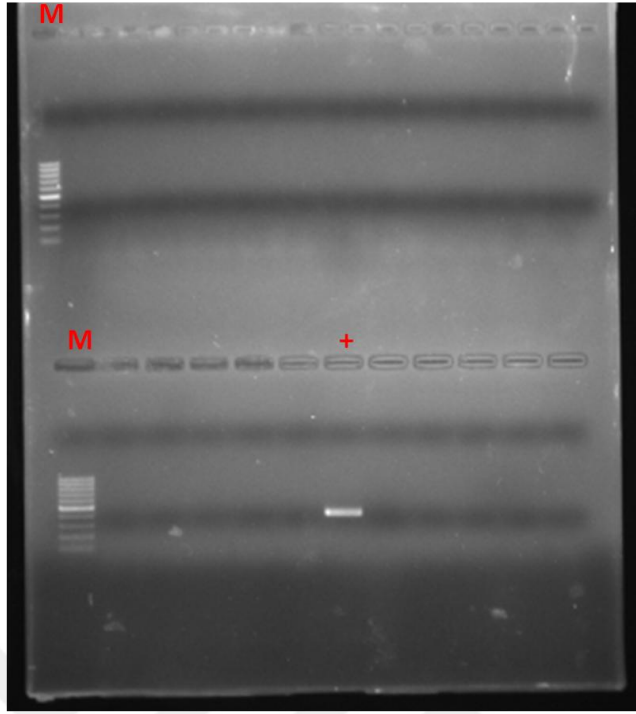


Şekil 23. Seronegatif kemirici serumlarının çalışıldığı immunoblot striplerinin görünümü. Kontrol bandı (altta) testin düzgün şekilde çalıştığını göstermesine rağmen HTNV, DOBV ve PUUV'ye karşı IgG antikor varlığını gösteren bantlarda (üstte) pozitiflik yok.

4.3 Moleküler Tarama

4.3.1 Pan-hanta L-segment Yuvalanmış PZT

429 kemiriciye ait akciğer dokuları pan-hantavirus L-segment öncül setleri ile taranmış, ancak pozitiflik saptanamamıştır (Şekil 24).

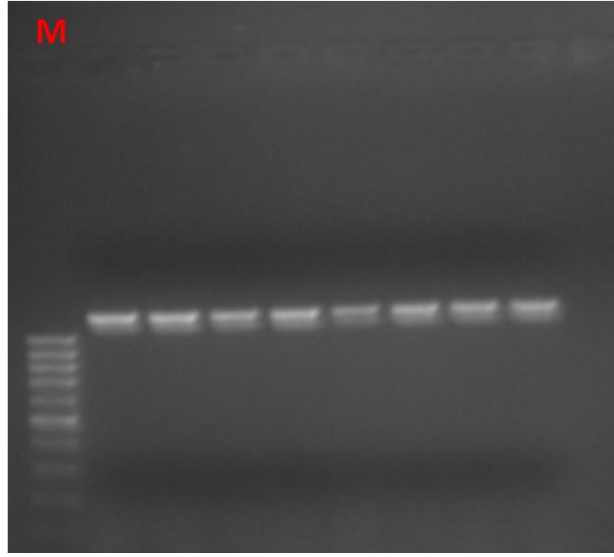


Şekil 24. Örneklere ait yuvalanmış PZT ürünlerinin %1,5'luk agaroz jelde 110 voltta 50 dakika yürütülmüş görüntüsü. M: Marker (Fermentas SM0241 katalog numaralı ürün, 100 baz çiftlik “DNA Ladder”), +: DOBV pozitif kontrol.

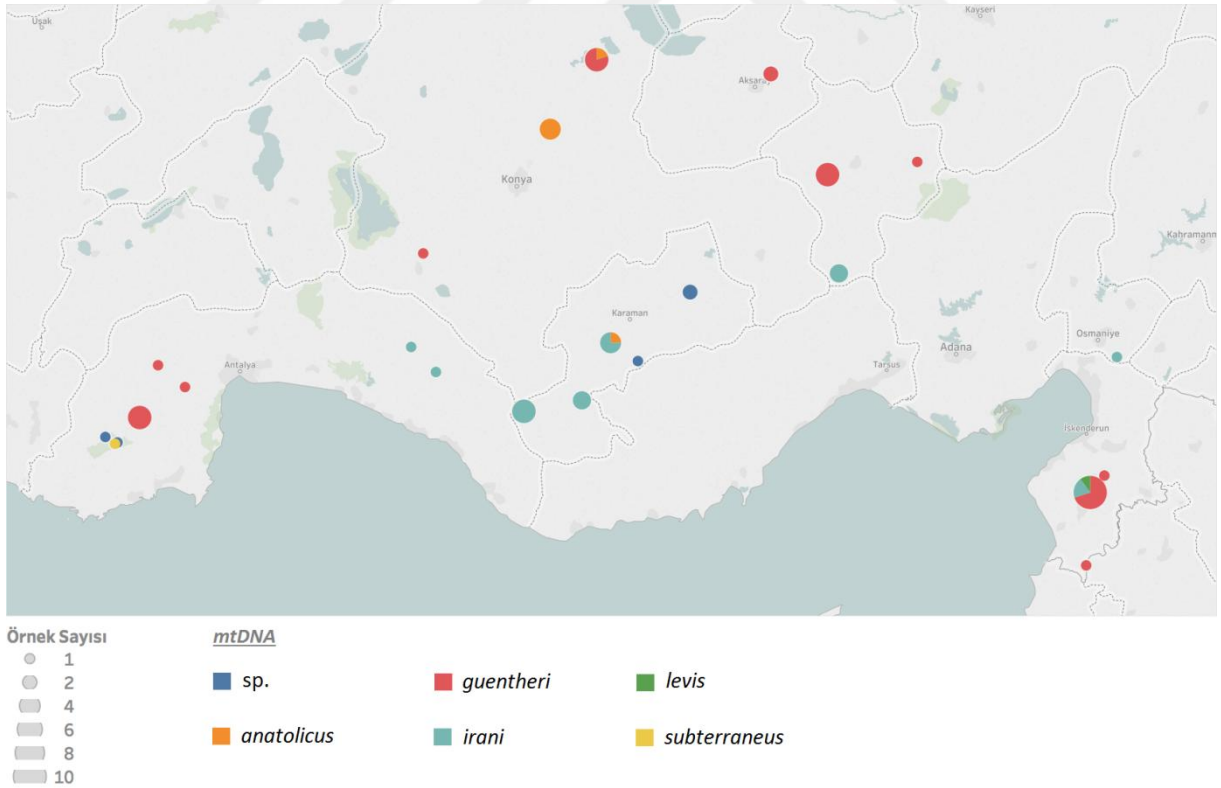
4.3.2 *Microtus* Topluluklarının mtDNA Soylarının Teşhisi

Microtus türlerinin genotipik teşhislerinin yapılabilmesi için, her lokaliteden en az bir kemiricinin *sitokrom-b* geni çoğaltıldı ve dizi analizi yapıldı (Şekil 25).

Toplamda 56 örneğe ait diziler, Genbank'ta BLAST'lanarak mitokondriyal soylarının tespiti yapıldı (138). Çalışma alanı içerisinde en az 5 farklı mtDNA soyu *Orthohantavirus* varlığı açısından tarandı. Yakalanan *Microtus* türlerinin lokaliteleri ve soyları, aşağıda Şekil 26'da belirtilmiştir.



Şekil 25. *Microtus* türlerine ait *sitokrom-b* geni PZT ürünlerinin %1,5'luk agaroz jelde 110 volta 50 dakika yürütülmüş görüntüsü. M: Marker (Fermentas SM0371 katalog numaralı ürün, 50 baz çiftlik "DNA Ladder").



Şekil 26. *Microtus* mtDNA soylarının dağılımı. Görselde "sp." olarak ifade edilen örneklerin (koyu mavi) *sitokrom-b* analizi yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA

Orthohantavirus kaynaklı enfeksiyonlar, Dünya'da her yıl 150-200 bin kişiyi etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur (60, 86). Bu enfeksiyonlar, Türkiye'de de görülmekte ve dönem dönem salgınlara neden olmaktadır. Türkiye'de şimdiye kadar yalnızca DOBV ve PUUV ile enfekte olmuş RSKA olguları bildirilmiştir (27, 29-31). Bu olgular genellikle Türkiye'nin kuzeyinde saptanmıştır. 2010-2013 yıllarında Türkiye'nin güneyinden de az sayıda şüpheli olgu bildirilse de bunların çoğu serolojik ya da moleküler yöntemler ile doğrulanamamıştır (T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı verileri).

Türkiye'nin kuzeyinde RSKA olgularının rapor edildiği alanlarda yapılan saha çalışmalarında, daha önceden orthohantavirüsler ile enfekte kemiricilere rastlanmıştır (26, 32, 33, 120). Karadeniz kıyılarındaki bazı illerden toplanan *Apodemus flavicollis* ve *Apodemus uralensis* türü kemiricilerde DOBV ve *Myodes glareolus* türü kemiricilerde ise PUUV varlığı bildirilmiştir (26, 140). Bu çalışmada ise, *Orthohantavirus* varlığı, Türkiye'nin güneyinde yayılım gösteren olası *Orthohantavirus* taşıyıcısı olan kemirici türlerinde ilk kez araştırılmıştır.

RSKA etkeni olan DOBV, PUUV, TULV ve SEOV taşıyıcısı olan kemirici türlerinden *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Rattus norvegicus* ve *Rattus rattus* Türkiye'de yayılım göstermektedirler (Şekil 27-32) (21-25). Ayrıca *Microtus arvalis* dışında, *Orthohantavirus* taşıdığı bildirilmemiş farklı *Microtus* türü kemiriciler de Türkiye'de yayılım göstermektedir (141). *Orthohantavirus* taşıyıcısı olma potansiyeline sahip olan bu türlerin Türkiye genelinde dağılım gösterdiği coğrafya, Türkiye'deki *Orthohantavirus* yayılımı açısından önem taşımaktadır (142-145). Bu nedenle henüz olgu bildirimini yapılmamış bölgelerde de *Orthohantavirus* türlerinden kaynaklanan enfeksiyonların görülme ve bu etken ya da etkenlerle ilişkili salgınlara ortaya çıkabilme ihtimali bulunmaktadır.



Şekil 27. DOBV Dobrava suşunun taşıyıcısı olan *Apodemus flavicollis*'in Türkiye'deki yayılım alanları (sarı ile belirtilmiş) (146).



Şekil 28. DOBV Saaremaa suşunun taşıyıcısı olan *Apodemus agrarius*'un Türkiye'deki yayılım alanları (sarı ile belirtilmiş) (147).



Şekil 29. PUUV taşıyıcısı olan *Myodes glareolus*'un Türkiye'deki yayılım alanları (sarı ile belirtilmiş) (148).



Şekil 30. SEOV taşıyıcısı olan *Rattus rattus*'un Türkiye'deki yayılım alanları (mor ile belirtilmiş) (149).



Şekil 31. SEOV taşıyıcısı olan *Rattus norvegicus*'un Türkiye'deki yayılım alanları (sarı ile belirtilmiş) (150).



Şekil 32. TULV taşıyıcısı olan *Microtus arvalis*'in Türkiye'deki yayılım alanları (sarı ile belirtilmiş) (151).

Orthohantavirüsler, Rodentia, Eulipotyphla ve Chiroptera takımlarında yer alan memeli türleri ile taşınmaktadır (70, 80, 152, 153). Genel olarak konaklarına özgül olsalar da konakları ile simpatrik olarak yaşayan farklı türlerde de enfeksiyona neden olabildikleri gösterilmiştir (32, 154-156). Bu nedenle çalışmaya, hem daha önce *Orthohantavirus* taşıyıcısı olduğu bildirilen hem de taşıyıcı türlerin yakın akrabası olan diğer türler de dahil edilmiştir.

Çalışma kapsamında, *Orthohantavirus* taşıyıcısı olduğu bilinen kemiricilerin yayılım gösterdiği buzul dönem sığınakları ve farklı bitki örtüsü yayılımları göz önünde bulundurularak, Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinde bulunan 9 ildeki (Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Konya, Aksaray, Niğde ve Karaman) pek çok lokaliteden, her bir lokalitedeki *Orthohantavirus* yayılım durumunu temsil edebilecek şekilde, üç yıllık periyot dahilinde ve mevsimlere göre dağılmış bir örneklem yapılmıştır. Bu çerçevede, belirli bir kemirici yuvasından çok sayıda olacak şekilde değil, her bir kemirici yuvasından bir veya iki kemirici olacak şekilde çok sayıda yuvadan örnekler toplanarak çalışmalar yürütülmüştür. Aynı yuvadaki kemiricilerin birbirleri ile yakın temas halinde olması ve yuvadaki enfekte bir kemiricinin aynı yuvadaki diğer kemiricileri de kolayca enfekte edebilmesi nedeniyle, bölgedeki *Orthohantavirus* prevalansının olduğundan daha yüksek saptanmasının önüne geçilmesi hedeflenmiştir.

Yakalanan kemiricilere ait doku örnekleri, arazi çalışmaları süresince içerisindeki DNA ve RNA'nın zarar görmeyeceği koşullarda saklanmıştır. Örnekler laboratuvara ulaştığında ise uzun süreli saklamanın sağlanabilmesi için çalışılana kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Örnekler, *Orthohantavirus* varlığı açısından hem serolojik hem de moleküler yöntemler ile araştırılmış, böylece virüsü taşımasa bile hayatının herhangi bir döneminde *Orthohantavirus* ile karşılaşmış kemiricilerin de saptanabilmesi hedeflenmiştir. Ancak çalışmanın örneklerin toplanması, saklanması ve *Orthohantavirus* varlığı açısından taranması basamaklarında azami özen gösterilmesine rağmen, kemiricilerin dokularında *Orthohantavirus* genomuna rastlanmadığı gibi daha önce bu virüs ile karşılaşp, virüse karşı antikor geliştirdiklerine dair bir kanıta da rastlanmamıştır.

Çalışma alanı, zengin bitki örtüsü ve hayvan çeşitliliğine sahiptir. Ayrıca bölgede bulunan Batı, Orta ve Doğu Toroslar, birbirlerinden farklı buzul sığınağı bölgeleri içermektedir (34). Farklılaşmanın ve biyolojik çeşitliliğin yoğun olarak gözlemlendiği bu bölgeler, buzullararası dönemlerde küçük memeliler için türlerin yayılma ve türleşme

merkezleri olmuştur (34, 35, 157). Bu alanların virüsler açısından da öneme sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle Türkiye'de henüz tanımlanmamış yeni *Orthohantavirus* tür ya da türlerinin bulunabileceği en olası bölgenin burası olacağı düşünülmüştür. Çalışma kapsamında yakalanan hedef kemirici türlerinin tümü *Orthohantavirus* negatif olarak bulunmuştur. Hatta örneklenen türlerden *Apodemus flavicollis* gibi bazı türlerin Türkiye'nin kuzey bölgelerinde virüs taşıyıcısı oldukları bilinmektedir (26). Buna karşın araştırma bölgesindeki *Apodemus flavicollis* türü kemiricilerde virüs varlığı açısından herhangi bir pozitiflik saptanamamıştır.

Çalışma bölgesinde yer alan Hatay ilinin Akdeniz kıyıları Afrika kökenli kemirici türlerinin Anadolu'ya giriş kapısı olduğu için, Türkiye'de henüz saptanmamış Afrika kökenli *Orthohantavirus* türlerinin tespit edilmesi için en uygun alandır. Hatay ilinin Amanos Dağları'nın doğusunda kalan bölümü ise Arabistan yarımadası kökenli çöl türlerinin Anadolu'ya giriş kapısıdır. Bu yüzden Arabistan yarımadası kökenli ve henüz saptanmamış *Orthohantavirus* türlerini barındırma ihtimali yüksektir. Çalışmada söz konusu *Orthohantavirus* türlerinin saptanması halinde, Orta Doğu'daki kemiricilerle taşınan ve enfeksiyon kaynağı olabilecek *Orthohantavirus* enfeksiyonlarına da ışık tutulması planlanmıştır. Ancak elde edilen veriler doğrultusunda, Afrika ya da Arabistan yarımadası kökenli herhangi bir *Orthohantavirus* varlığına rastlanmamıştır.

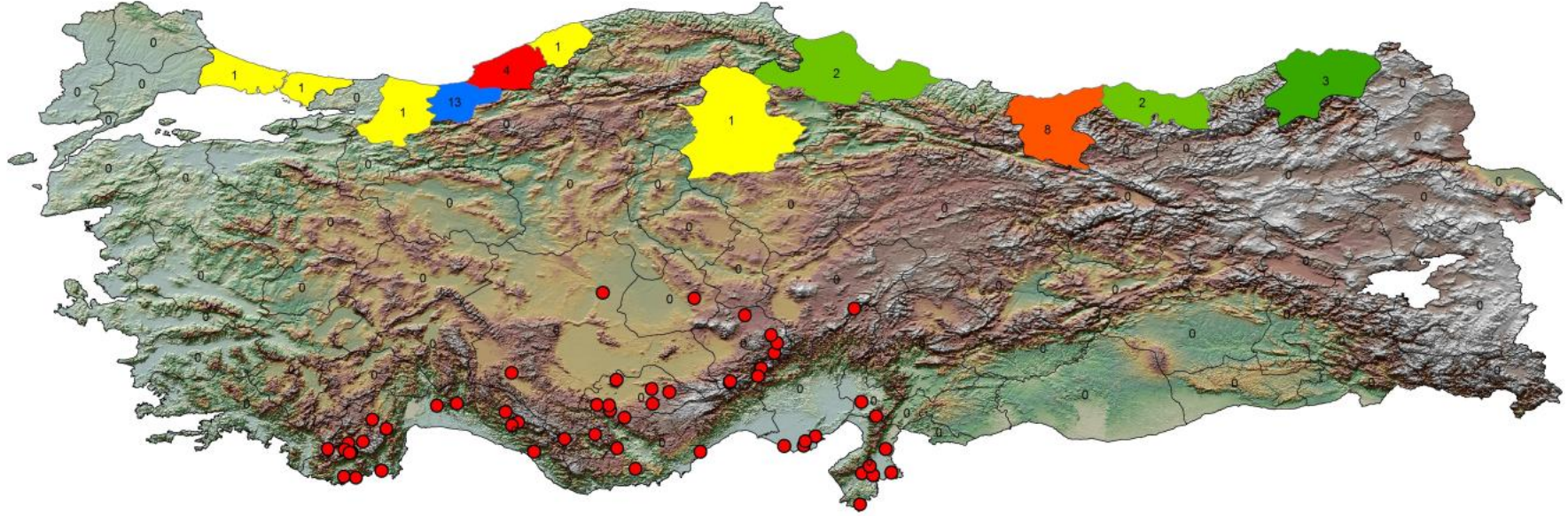
Çalışma alanında *Orthohantavirus* taşıma potansiyeli olan endemik bir *Microtus* türü olan *Microtus anatolicus* yayılış göstermektedir (158). Bu kemirici türlerinde konağa özgül yeni orthohantavirüslerin evrimleştiği düşünülmektedir. Ancak bu yönde herhangi bir bulguya ulaşamamıştır.

Orthohantavirus enfeksiyonlarının ortaya çıkışı ve yayılımı; çevresel faktörler (hava, yiyecek varlığı, vb.), konak topluluğundaki değişimler, ormanlık alanlardaki insan ve/veya evcil hayvan kaynaklı bozulmalar (ormanların yok edilmesi, kentleşme, tarımsal kalkınma, vb.), insan kaynaklı faktörler ve ekolojik değişikliklerden etkilenmektedir. Bu etkileşimlerin doğal sonucu olarak zaman zaman salgınlar ortaya çıkmaktadır (27, 159-166). Ayrıca biyoçeşitlilik kaybı da konaklar arasında aktarımı kolaylaştırmakta, kemirici toplulukları arasında salgınlara yol açmakta ve insanlara bulaşma ihtimalini arttırarak enfeksiyon riskini belirginleştirmektedir (167, 168).

Son yıllarda iklim değışikliklerinin normalden daha hızlı şekilde seyretmesi, iklime duyarlı patojenlerin epidemiyolojisinde değışime neden olarak insan sağlığını etkilemektedir (169). İklim değışikliği, kemirgen konakların coğrafı dağılımını, kemirici topluluklarındaki birey sayısını ve topluluk içindeki dinamikleri etkileyebilecek önemli bir faktördür (119). Sıcaklık, yağış, nem değışimleri ve hava kirliliğinin, topluluklardaki viral aktiviteyi, bulaşmayı ve yayılımı etkilediği bildirilmiştir (169). Bu değışimlerin *Orthohantavirus* salgınlarını da etkilediği gösterilmiştir (170, 171). Örneğin 2000 yılının başlarında Panama'da görülen bir HPS salgını, salgından önce bölgeye düşen yağış miktarındaki 2-3 katlık artış sonucunda bölgedeki kemirici topluluklarında meydana gelen artış ile ilişkilendirilmiştir (170).

Avrupa'da ılıman iklim görülen bölgelerde iklim değışikliğine bağlı olarak sıcak yaz aylarında daha fazla meşe palamudu oluşmaktadır. Kış aylarında kemiricilerin hayatta kalmasını sağlayan zengin bir besin kaynağı olan meşe palamudunun miktarındaki artış nedeniyle *Orthohantavirus* kaynaklı salgınlarda artış gözlenmektedir (165, 172). Ayrıca, iklim değışikliğine bağlı olarak mevsimsel tarım faaliyetlerinin ve kırsalda geçirilen zamanın artması, insanların virüse maruz kalma ihtimalinde de artışa neden olmaktadır (165).

Türkiye'deki RSKA olguları ve virüs varlığı saptanan insan ve kemirici örnekleri, genel olarak ülkenin kuzeyinden bildirilmektedir (Şekil 33) (26, 27, 29-33). Bu çalışmada 15 Nisan 2015 - 30 Kasım 2017 tarihleri arasında saha temsiliyeti dikkate alınarak yapılan örneklemler ve taramalarda *Orthohantavirus* varlığının ilk kez araştırıldığı güney bölgelerde (Şekil 33), söz konusu virüsler ile enfekte herhangi bir kemiriciye rastlanmamıştır. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı verilerine göre 2017 yılında Türkiye'nin güneyinden doğrulanmış herhangi bir *Orthohantavirus* insan enfeksiyonunun bildirilmemiş olması da Türkiye'nin güney bölgelerindeki potansiyel rezervuarlarda virüsün saptanamaması ve virüsün alanda dolaşmadığı bulgularını destekler niteliktedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, Türkiye'nin kuzeyindeki kemirici toplulukları ile güneyindeki kemirici topluluklarının birbirleri ile karışmadıkları düşünülmektedir (173).

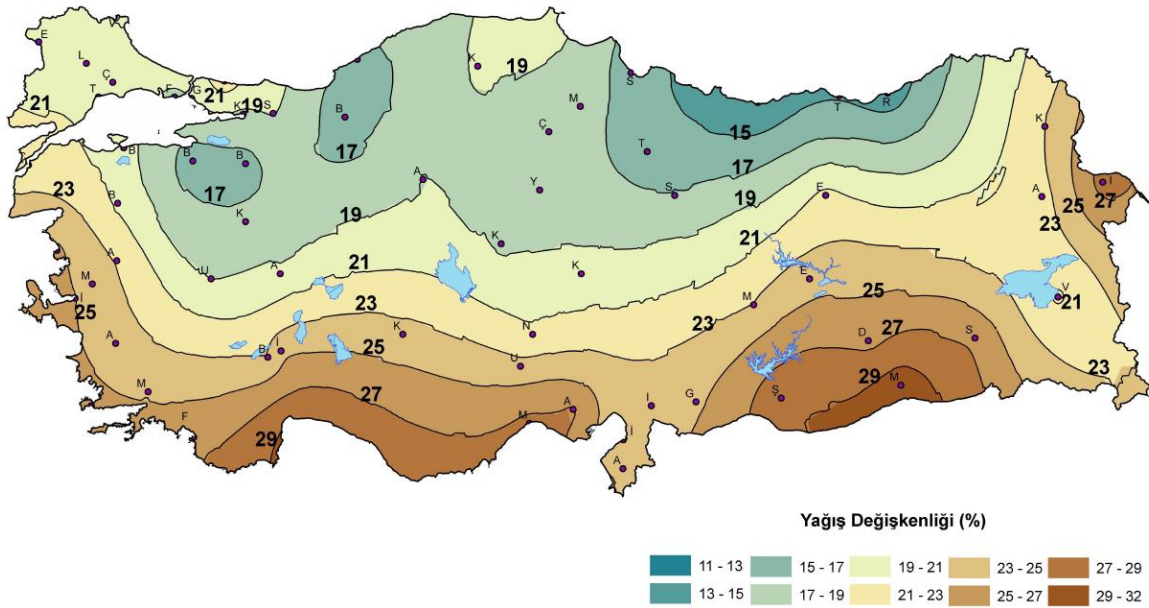


Şekil 33. Çalışma kapsamında örneklem yapılan lokaliteler (kırmızı noktalar ile belirtilmiştir) ve 2017 yılında bildirilen *Orthohantavirus* olguları (T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı'ndan elde edilen veriler, il bazında farklı renklerle ve olgu sayılarıyla ifade edilmiştir.).

Çalışma kapsamında örneklem yapılan bölgelerde *Orthohantavirus* varlığı saptanamamasında, bölgedeki coğrafi faktörler ve iklim özellikleri ile virüsün lokal adaptasyonunda çıkan sorunların etkili olabileceği değerlendirilmektedir.

Öncelikli olarak örneklem yapılan bölgede, kemiricilerin uzak mesafeler kat etmelerini zorlaştıran coğrafi bariyerler (Batı, Orta ve Doğu Toroslar) bulunmaktadır (173). Bu bariyerler sayesinde, bölgede yaşayan enfekte olmamış kemiricilerin, ülkenin kuzeyindeki enfekte kemiricilerden uzakta kalarak korunmuş olmaları ihtimal dahilindedir.

Türkiye'nin kuzeyi ile güneyi, yıllık yağış değişkenliği açısından farklılık göstermektedir (174). Yağış değişkenliği katsayısı, kuzeyden güneye doğru düzenli olarak artmaktadır. Katsayının %19 ile %25 arasında olduğu alan, yağış değişkenliğinin en fazla olduğu güney ile en az olduğu kuzey bölgelerini doğu-batı doğrultusunda ikiye bölmektedir (Şekil 34) (174). Virüsün doğada canlı kalması açısından önem taşıyan bu özellik, virüsün güney bölgelerdeki varlığı üzerinde etkili olabilir.



Şekil 34. Türkiye'nin yıllık yağış değişkenliği haritası (174).

Yağış miktarının yanı sıra sıcaklık, nem ve UV maruziyeti gibi etkenler de Türkiye'nin kuzey bölgeleri ile güney bölgeleri arasında farklılık göstermektedir. Tüm bu etkenler, zarflı

bir virüs olan *Orthohantavirus*'un doğada enfektif olarak bulunup bulunmaması açısından önem taşımaktadır. Zarflı virüsler kuruluğa ve UV'ye karşı dayanıklı olmadıklarından bu etkenlerin varlığında, virüs enfeksiyon aktivitesini kaybedecek ve insanları ve/veya virüsle karşılaşmamış kemiricileri enfekte edemeyecektir (50). Söz konusu coğrafi faktörler, iklim özellikleri ve habitat farklılıkları ile diğer muhtemel etkenler, çalışmanın yapıldığı bölgelerde orthohantavirüsün lokal adaptasyon sorunu yaşamasına da sebebiyet vermiş olabilir.

Öte yandan, iklim değişikliğinin etkisi ile Türkiye'de yıllık ortalama sıcaklık artışının 2016-2040 yılları arasında 1°C-2°C arasında, 2041-2070 yılları arasında 1,5°C-4°C arasında ve 2071-2099 yılları arasında ise 1,5°C-5°C arasında olması beklenmektedir (175). 2071-2100 yılları arasındaki sıcaklık artışının kış mevsiminde 3°C'yi, yaz mevsiminde ise 8°C'yi bulabileceği düşünülmektedir (175). Kış mevsiminde ülke genelindeki yağış miktarında artışlar, ilkbahar mevsiminde ülkenin sahil kesimi ve kuzeydoğusu haricinde yağışlarda azalmalar ve sonbahar mevsiminde de ülke genelinde yağış miktarında azalmalar görüleceği öngörülmektedir (175). Tüm bu değişiklikler doğrultusunda özellikle Türkiye'nin nehir havzalarında ciddi risklerin oluşabileceği belirtilmektedir. Bu risklerden ilki, Anadolu'nun iç kesimleri ve güneyindeki havzalarda yağış miktarında görülecek azalmadır. İkincisi, artan sıcaklıkların yağış cinsi değişikliklerine neden olabileceği ve yağın karın bahar aylarında normalden daha erken zamanda erimesine neden olabileceğidir. Üçüncüsü ise yaz aylarında özellikle de Anadolu'nun batı ve kuzey sahil kesimlerinde aşırı yağışların oluşabileceğidir (175). Tüm bu şartlarda, Türkiye'nin bir iklim değişikliğine maruz kalacağı söylenebilecektir.

Akdeniz havzasında yaşayan canlıların, önümüzdeki yıllarda gerçekleşecek iklim değişikliği sebebiyle, alçak rakımdan daha yüksek rakıma doğru ve kuzey bölgelere göç edeceği belirtilmektedir (176, 177). Bu durumun Türkiye'de yaşanması muhtemel iklim değişikliğine yansımaları ise, ülkenin güneyinde yayılım gösteren türlerin kuzey bölgelerine doğru hareket etmeleri şeklindedir. Ancak Türkiye'nin güneyinden kuzeyine doğru hareket edecek kemirici topluluklarının *Orthohantavirus* taşıyıcısı olduklarına dair bir kanıt ulaşılmadığından, kuzeydeki toplulukları tehdit edecek yeni bir enfeksiyon kaynağı olmayacakları düşünülmektedir. Güneyden kuzeye doğru hareket edecek, *Orthohantavirus* ile enfekte olmayan kemirici topluluklarının, kuzeyde aynı ya da farklı türden enfekte kemirici topluluklarıyla ortak çevreyi paylaşmaları durumunda enfekte kemirici sayısı artacaktır. Bu durumda kuzeyde yaşayan kişilerin enfekte kemiriciler ile temas etme ihtimalinin artacağı öngörülmektedir.

Bunun yanında kemiricilerdeki *Orthohantavirus* enfeksiyonlarında, dolayısı ile insanlarda neden olduğu klinik tablolarda da yeni senaryolarla karşı karşıya kalınması söz konusu olabilir. Öncelikli olarak, Türkiye'nin güneyinde yaşayan ve daha önce *Orthohantavirus* taşıyıcısı olduğu bildirilmemiş bazı kemirici türlerinin, ülkenin kuzeyine yapacağı bir göç sonucunda simpatrik olarak yaşayacağı farklı türlerden enfekte olması durumunda yeni bir *Orthohantavirus* türü ya da varyantının doğmasına sebep olabileceği değerlendirilmektedir. Böyle bir durumda ortaya çıkabilecek olası yeni bir *Orthohantavirus* türü ya da varyantının insanlar açısından patojen olup olmayacağı ve patojen olması halinde klinik açıdan nasıl bir tabloya neden olacağı belirsizdir.

Söz konusu senaryoların gerçekleşmesi durumunda, son yıllarda geçerliliği tartışılmakta olan orthohantavirüslerin konakları ile birlikte evrimleştikleri ve bu nedenle virüsün yayılım alanlarının konağı olan kemiricilerin yayılım alanları ile sınırlı oldukları tezi zayıflayacak ve virüsün genetik olarak birbirinden farklı türde konaklar yerine birbirleri ile yakından ilişkili konak türleri arasında hareket etmeyi tercih ettiği (tercihli konak değişimi/"preferential host switching") ve bulunduğu bölgeye lokal adaptasyon geliştirdiği tezleri güçlenmiş olacaktır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda da kemiricilerin tercihli konak değişimini tercih ettikleri gösterilmiştir (32).

Son yıllarda Afrika kıtasından kemiriciler ve böcekçillerin yanı sıra yarası kökenli orthohantavirüslerin varlığı da bildirilmektedir (10, 136, 178). Uzun yaşam süreleri, uzak mesafeler kat edebilmeleri ve sosyal bir davranış sergilemeleri nedeniyle yarasaların orthohantavirüslerin varlığı ve yayılımında önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (178, 179). Dolayısıyla Türkiye'de *Orthohantavirus* varlığı saptanan bölgeler ile bu çalışma kapsamında örneklem yapılan bölgelerdeki yarası popülasyonlarında *Orthohantavirus* taraması yapılması, eğer varsa yarası kaynaklı patojen ve patojen olmayan *Orthohantavirus* türlerinin etkilerinin daha açık şekilde ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır.

Çalışma kapsamında, uzun süreli ve mevsimlere göre dağılmış şekilde örneklem yapılmasına rağmen *Orthohantavirus* varlığına rastlanmamıştır. Böylece, Türkiye'nin güneyinde yer alan bölgelerde ilk kez yapılan bu çalışma ile hem ülkenin güneyinde *Orthohantavirus* ile enfekte kemirici bulunmadığı ortaya konmuş hem de *Orthohantavirus* salgınlarının ve sporadik insan olgularının günümüze kadar sadece Türkiye'nin kuzey bölgesinde saptanmasının da tesadüf olmadığı gösterilmiştir (Şekil 34). Bu veriler ışığında,

Türkiye'nin güney bölgelerinde *Orthohantavirus* enfeksiyonları açısından bir risk öngörülmemekle birlikte Doğu Anadolu, İç Anadolu'nun kuzeyi ve İç Karadeniz bölgelerinde *Orthohantavirus* taramaları yapılmasına ve bu bölgelerde söz konusu virüsün varsa dağılımının ortaya konulmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye'nin Akdeniz ve İç Anadolu'nun Akdeniz Bölgesi'ne komşu bölgelerinde bulunan Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Konya, Aksaray, Niğde ve Karaman illerinde *Orthohantavirus* varlığı ve dağılımı araştırılmıştır. Söz konusu bölge, küçük memeliler için buzullararası dönemlerde türleşme merkezleri olan ve virüsler açısından da öneme sahip olabileceği düşünülen buzul dönem sığınaklarını ve farklı bitki örtülerini barındırmaktadır. Çalışma alanının sahip olduğu bu özellikler nedeniyle, Türkiye'de henüz saptanmamış *Orthohantavirus* türlerinin tespit edilebileceği ve/veya varsa Türkiye'ye özgü yeni *Orthohantavirus* türlerinin bulunabileceği en olası bölge olduğu düşünülmüştür.

Çalışma kapsamında geniş ve alanı temsil eden örneklem ile elde edilen hayvan materyalleri kullanılmıştır. Gerçekleştirilen serolojik ve moleküler taramalarda, çalışma bölgesindeki kemiricilerde *Orthohantavirus* genomuna rastlanmadığı gibi hayatlarının herhangi bir döneminde söz konusu virüs ile karşılaşmış bir kemirici de saptanmamıştır. Türkiye'nin güneyinde yer alan buzul dönem sığınaklarının bulunduğu coğrafya ve bitki örtüsü ile *Orthohantavirus* varlığı arasında da doğrudan bir bağlantı tespit edilememiştir. Bu sonuç doğrultusunda, saha çalışması yapılan bölgelerdeki *Orthohantavirus* taşıyıcısı olarak bilinen majör kemirici türlerinde (*Apodemus* spp., *Microtus* spp. ve *Rattus* spp.) söz konusu virüsün bulunmadığı söylenebilir.

Öte yandan, bu çalışma kapsamında örneklem yapılan bölgelerdeki böcekçil ve yarasa topluluklarında da *Orthohantavirus* taraması yapılması, şu ana dek ulaşılan sonucun, *Orthohantavirus* taşıyıcısı olduğu bildirilmiş tüm türleri kapsayacak şekilde güncellenmesine katkı sunabilecektir. Kemiricilerin buzul dönem sığınaklarına giden göç yolları üzerinde bulunan ve daha önce *Orthohantavirus* varlığı saptanan bölgelerde yapılacak çalışmalar, buzul dönem sığınaklarının *Orthohantavirus* varlığı veya yokluğu üzerindeki olası etkilerinin ortaya çıkarılması konusunda daha detaylı veri sağlayabilecektir.

Kemirici çeşitliliğinin yüksek olduğu ve henüz *Orthohantavirus* varlığının araştırılmadığı alanlarda yapılacak yeni çalışmalar da, orthohantavirüslerin taşıyıcıları olan kemiriciler ile birlikte evrimlerine ışık tutacak bilgiler sağlanması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerle, Türkiye'nin kuzeyindeki kemirici toplulukları ile güneyindeki kemirici topluluklarının birbirlerini enfekte etmedikleri değerlendirilmiştir. Hedef bölgedeki coğrafi faktörler, iklim değişkenlikleri, habitat farklılıkları ve virüsün lokal adaptasyonu gibi etkenlerin *Orthohantavirus*'un bölgedeki varlığı üzerinde etkili olabileceği tartışılmıştır. Ayrıca, iklim değişikliğinin etkisi ile gelecek yıllarda Türkiye'nin güneyinde yayılım gösteren kemirici türlerinin ülkenin kuzeyine doğru hareket etmeleri neticesinde, enfekte kemirici sayısının artacağı ve yeni bir *Orthohantavirus* türü ya da varyantının doğabileceği hususuna değinilmiştir. İlerleyen dönemlerde Türkiye'de yapılacak saha çalışmalarından elde edilecek verilerin, tüm bu hususların aydınlatılmasına ışık tutması ve *Orthohantavirus* yayılımına neden olan etmenlerin anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J ve ark. Hantavirus infections Europe and their impact on public health. Rev Med Virol, 2013; 23: 35-49.
2. Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J Infect Dis, 1978; 137: 298-308.
3. Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH ve ark. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. J Infect Dis, 1980; 141: 131-4.
4. Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. J Infect Dis, 1982; 146: 638-44.
5. Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A ve ark. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. J Med Virol, 1992; 38: 132-7.
6. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE ve ark. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science, 1993; 262: 914-7.
7. Padula PJ, Edelstein A, Miguel S, Lopez N ve ark. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. Virology, 1998; 241(2): 323-30.
8. Song JW, Baek LJ, Schmaljohn CS, Yanagihara R. Thottapalayam virus, a prototype shrewborne hantavirus. Emerg Infect Dis, 2007; 13(7): 980-5.
9. Song JW, Kang HJ, Gu SH, Moon SS ve ark. Characterization of Imjin virus, a newly isolated hantavirus from the Ussuri white-toothed shrew (*Crocidura lasiura*). J Virol, 2009; 83(12): 6184-91.
10. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B ve ark. Novel hantavirus sequences in shrew, Guinea. Emerg Infect Dis, 2007; 13(3): 520-2.
11. Song JW, Gu SH, Bennett SN, Arai S ve ark. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). Virol J, 2007; 4: 114.
12. Zhang YZ. Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. Virus Res, 2014; 187: 15-21.

13. Gu SH, Dormion J, Hugot JP, Yanagihara R. High prevalence of Nova hantavirus infection in the European mole (*Talpa europaea*) in France. *Epidemiol Infect*, 2013; 142(6): 1167-71.
14. Hugot JP, Gu SH, Feliu C, Ventur J ve ark. Genetic diversity of *Talpa europaea* and Nova Hanta virus (NVAV) in France. *Bull Acad Vet Fr*, 2014; 167(3).
15. Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowak K ve ark. Hantavirus in bat Sierra Leone. *Emerg Infect Dis*, 2012; 18: 159-61.
16. Sumibcay L, Kadjo B, Gu SH, Kang HJ ve ark. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire. *Virol J*, 2012; 9: 34.
17. Guo WP, Lin XD, Wang W, Tian JH ve ark. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog*, 2013; 9(2): e1003159.
18. Arai S, Nguyen ST, Boldgiv B, Fukui D ve ark. Novel bat-borne hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, 2013; 19, 1159-61.
19. Klein SL, Calisher CH. Emergence and persistence of Hantaviruses, In: Childs JE, Mackenzie JS, Richt J, editors. *Wildlife and emerging zoonotic diseases: the biology, circumstances and consequences of cross-species transmission*, Springer, 2007; 315, 217-52.
20. Jonsson CB, Figueriedo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev*, 2010; 23: 412-41.
21. Kefelioglu H, Tez C, Gündüz İ. The Taxonomy and Distribution of *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Mammalia: Rodentia) in the European Part of Turkey. *Turk J Zool*, 2003; 27(2): 141-6.
22. Yiğit N, Çolak E, Sözen M, Karataş A. Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Editor: Demirsoy A. Ankara, Meteksan Yayınevi, 2006.
23. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia I: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae. University of Primorska, Science and Research Centre, Koper, 2005, 292 p.
24. Krystufek B, Vohralik V. Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: Rodentia) in Anatolia. *Zoology in the Middle East*, 2007; 42(1): 25-36.

25. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. University of Primorska, Science and Research Centre, Koper, 2009, 371 p.
26. Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, Blasdel K ve ark. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. J Wildl Dis, 2006; 42(3): 672-6.
27. Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by Hantavirus in the Black Sea Region of Turkey, January-May 2009. Euro Surveill, 2009; 14(20).
28. Kaya S, Çağlayık SY, Uyar Y, Yılmaz H ve ark. Can Hantavirus infections be predicted on admission to hospital? J Med Virol, 2012; 84: 1790-6.
29. Sarıgüzel N, Hofmann J, Canpolat AT, Türk A ve ark. Dobrava Hantavirus infection complicated by panhypopituitarism, İstanbul, Turkey, 2010. Emerg Infect Dis, 2012; 18(7): 1180-3.
30. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, Turhan V ve ark. Hantavirus infection in İstanbul, Turkey. Emerg Infect Dis, 2011; 17(2): 303-4.
31. Gözalan A, Kalaycıoğlu H, Uyar Y, Sevindi DF ve ark. Human Puumala and Dobrava Hantavirus infections in the Black Sea Region of Turkey: a cross-sectional study. Vector Borne Zoonotic Dis, 2013; 13(2): 111-8.
32. Oktem IM, Uyar Y, Dincer E, Gozalan A ve ark. Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. Emerg Infect Dis, 2014; 20(1): 121-5.
33. Polat C, Sironen T, Plyusnina A, Karatas A ve ark. Dobrava Hantavirus variants found in *Apodemus flavicollis* mice in Kırklareli Province, Turkey. J Med Virol, 2018; 90(5): 810-8.
34. Médail F, Diadema K. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. Journal of Biogeography, 2009; 36(7): 1333–45.
35. Demirsoy A. Genel zoocoğrafya ve Türkiye zoocoğrafyası “Hayvan coğrafyası”. Genişletilmiş (5. Baskı). Ankara, Meteksan A.Ş, 2002.
36. Altan T. Türkiye’nin doğal bitki örtüsü (Ders Kitabı No: 70). Adana, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 1993.
37. Lee HW. Hemorrhagic fever with renal syndrome. History; Hantaan virus and epidemiological features. Scand J Infect Dis Suppl, 1982; 36: S82-S85.

38. Casals J, Henderson BE, Hoogstraal H, Johnson KM ve ark. A review of the Soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. *J Infect Dis*, 1970; 122: 437-53.
39. Gajdusek DC. Viral hemorrhagic fevers. *The Journal of Pediatrics*, 1962; 60: 841-57.
40. Smadel JE. Epidemic hemorrhagic fever. *Am J Public Health Nations Health*, 1953; 43(10): 1327-30.
41. Haemorrhagic fever with renal syndrome: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*, 1983; 61(2): 269-75.
42. Hughes JM, Peters CJ, Cohen ML, Mahy BW. Hantavirus pulmonary syndrome: An emerging infectious disease. *Science*, 1993; 262: 850-1.
43. Haznedaroğlu T, Doğanç L, Gün H, Lee HW. Türk Silahlı Kuvvetleri personelinde hantavirus seroprevalansının "high density particle agglutination" yöntemiyle araştırılması. 26. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Özet Kitabı: p21, 11-15 Nisan 1994, Antalya, Türkiye.
44. Kavukçu S, Türkmen M, Salman Ş, Soylu A ve ark. Ege Bölgesinde Hantavirüs ile İlişkili Nefropati Riski Nedir? *Turk Neph Dial Transpl*, 1997; 3-4: 131-5.
45. Plyusnin A, Beauty BJ, Elliott RM, Goldbach R ve ark., Bunyaviridae. In: King AMQ, Lefkowitz EJ, Adams MJ, Carstens EB., editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 2012, 725-41.
46. Brieze T, Alkhovsky S, Beer M, Calisher CH ve ark. ICTV taxonomic proposal 2016.023a-cM.A.v2.Hantavirus_sprev. In the genus Hantavirus, create 24 species and abolish 7 species; change the genus name to Orthohantavirus and rename its constituent species similarly. http://www.ictv.global/proposals16/2016.023a-cM.A.v2.Hantavirus_sprev.pdf. Erişim tarihi: 15 Aralık 2017.
47. Brieze T, Alkhovsky S, Beer M, Calisher CH ve ark. ICTV taxonomic proposal 2016.030avM.A.v6.Bunyavirales. Create the order Bunyavirales, including eight new families, and one renamed family. <http://www.ictv.global/proposals-16/2016.030a-vM.A.v6.Bunyavirales.pdf>. Erişim tarihi: 4 Nisan 2017.
48. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B ve ark. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, 2017; 162: 2505-38.

49. Elliott RM, Bouloy M, Calisher CH, Goldbach R ve ark., Bunyaviridae, In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB ve ark., editors. Virus taxonomy. VII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA, Academic Press, 2000, 599-621.
50. Avsic-Zupanc T, Saksida A, Korva M. Hantavirus infections. Clin Microbiol Infect, 2016; doi: 10.1111/1469-0691.12291.
51. Johnson KM. Hantaviruses: history and overview, In: Schmaljohn CS, Nichol ST, editors. Hantaviruses, 1st edition, New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 256, 1-14.
52. Sanfeliu MR. Microevolution of Puumala hantavirus in its host, the bank vole (*Myodes glareolus*), Helsinki, University of Helsinki, Doktora tezi, 2012.
53. Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, Sironen T ve ark. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. Nat Rev Microbiol, 2013; 11(8): 539-50.
54. Schmaljohn CS, Dalrymple JM. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. Virology, 1983; 131: 482-91.
55. Reuter M, Krüger DH. The nucleocapsid protein of hantaviruses: much more than a genome-wrapping protein. Virus Genes, 2017; 54(1): 5-16.
56. Gavrilovskaya IN, Shepley M, Shaw R, Ginsberg MH ve ark. Beta3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95(12): 7074-9.
57. Mackow ER, Gavrilovskaya IN. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis, In: Schmaljohn CS, Nichol ST, editors. Hantaviruses, 1st edition, New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 256, 91-115.
58. Jonsson CB, Schmaljohn CS. Replication of Hantaviruses, In: Schmaljohn CS, Nichol ST, editors. Hantaviruses, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2001, 256, 15-32.
59. <http://slideplayer.com/slide/3130238/>, erişim tarihi 20 Şubat 2018.
60. Manigold T, Vial P. Human hantavirus infections: Epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. Swiss Med Wkly, 2014; 144: w13937.
61. Jin M, Park J, Lee S, Park B ve ark. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. Virology, 2002; 294(1): 60-9.

62. Byström JW, Näslund J, Trulsson F, Evander M ve ark. Quantification and kinetics of viral RNA transcripts produced in *Orthohantavirus* infected cells. *Virol J*, 2018; 15(1): 18.
63. Garcin D, Lezzi M, Dobbs M, Elliott RM ve ark. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *J Virol*, 1995; 69: 5754-66.
64. Mir MA, Duran WA, Hjelle BL, Ye C ve ark. Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105: 19294-9.
65. Löber C, Anheier B, Lindow S, Klenk HD ve ark. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology*, 2001; 289: 224-9.
66. Ramanathan HN, Chung DH, Plane SJ, Sztul E ve ark. Dynein-dependent transport of the hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J Virol*, 2007; 81: 8634-47.
67. Spiropoulou CF. Hantavirus maturation, In: Schmaljohn CS, Nichol ST, editors. *Hantaviruses*, 1st edition, New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 256, 33-46.
68. Pettersson RF, Melin L. Synthesis, assembly and intracellular transport of Bunyaviridae membrane proteins, In: Elliot RM, editor. *The Bunyaviridae*, New York, Plenum Press, 1996, 159-88.
69. Mir M. Hantaviruses. *Clin Lab Med*, 2010; 30(1): 67-91.
70. Plyusnin A, Sironen T. Evolution of hantaviruses: co-specification with reservoir hosts for more than 100 MYR. *Virus Res*, 2014; 187: 22-6.
71. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol*, 1996; 77: 2677-87.
72. Yates TL, Mills JN, Parmenter CA, Ksiazek TG ve ark. The ecology and evolutionary history of an emergent disease: hantavirus pulmonary syndrome. *Bioscience*, 2002; 52: 989-98.
73. Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 256: 47-75.
74. Hughes AL, Friedman R. Evolutionary diversification of protein-coding genes of hantaviruses. *Mol Biol Evol*, 2000; 17: 1558-68.

75. Morzunov SP, Rowe JE, Ksiazek TG, Peters CJ ve ark. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. J Virol, 1998; 72: 57–64.
76. Nemirov K, Henttonen H, Vaheiri A, Plyusnin A. Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by *Apodemus* mice. Virus Res, 2002; 90: 207-15.
77. Ramsden C, Holmes EC, Charleston MA. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. Mol Biol Evol, 2009; 26(1): 143-53.
78. Ramsden C, Melo FL, Figueiredo LM, Holmes EC ve ark. High rates of molecular evolution in hantaviruses. Mol Biol Evol, 2008; 25: 1488-92.
79. Khalil H, Hörnfeldt B, Evander M, Magnusson M ve ark. Dynamics and drivers of Hantavirus prevalence in rodent populations. Vector Borne Zoonotic Dis, 2014; 14(8): 537-51.
80. Forbes KM, Sironen T, Plyusnin A. Hantavirus maintenance and transmission in reservoir host populations. Curr Opin Virol, 2017; 28: 1-6.
81. Clement J, Underwood P, Ward D, Pilaski J ve ark. Hantavirus outbreak during military manoeuvres in Germany. Lancet, 1996; 347: 336.
82. Vapalahti K, Paunio M, Brummer-Korvenkontio M, Vaheiri A ve ark. Puumala virus infections in Finland: increased occupational risk for farmers. Am J Epidemiol, 1999; 149(12): 1142-51.
83. Heyman P, Vaheiri A, Lundkvist A, Avsic-Zupanc T. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. Exp Rev Antiinfect Ther, 2009; 7: 205-17.
84. Biggs JR, Bennett KD, Mullen MA, Haarman TK ve ark. Relationship of ecological variables to Sin Nombre virus antibody seroprevalance in populations of deer mice. J Mammal, 2000; 81: 676-82.
85. Vapalahti O, Mustonen J, Lundqvist A, Henttonen H ve ark. Hantavirus infections in Europe. Lancet Infect Dis, 2003; 3(10): 653-61.
86. Bi Z, Formenty PBH, Roth CE. Hantavirus infection: A review and global update. J Infect Dev Ctries, 2008; 2(1): 3-23.

87. MacNeil A, Nichol ST, Spiropoulou CF. Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res*, 2011; 162:138-47.
88. Linderholm M, Elgh L. Clinical characteristics of Hantavirus infections on the Eurasian continent, In: Schmaljohn CS, Nichol ST, editors. *Hantaviruses*, 1st edition, New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 256, 135-51.
89. Jiang H, Du H, Wang LM, Wang PZ ve ark. Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016; 6: 1.
90. Hayasaka D, Maeda K, Ennis FA, Terajima M. Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*, 2007; 123: 120-7.
91. Vapalahti O. Genetic and antigenic properties of Puumala and Tula viruses. Helsinki, University of Helsinki, Doktora tezi, 1996; 24-26.
92. Mackow ER, Gavrilovskaya IN. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb Haemostasis*, 2009; 102(6): 1030-41.
93. Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, Pietila K ve ark. Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Kidney Int*, 1996; 49: 217-21.
94. Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, Pietila K ve ark. Association of HLA B27 with benign clinical course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Scand J Immunol*, 1998; 47: 277-9.
95. Khaiboullina SF, St. Jeor SC. Hantavirus immunology. *Viral Immunol*, 2002; 15(4): 609-25.
96. Jiang H, Wang PZ, Zhang Y, Xu Z ve ark. Hantaan virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *Virology*, 2008; 380: 52-9.
97. Wang PZ, Li ZD, Yu HT, Zhang Y ve ark. Elevated serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome. *J Int Med Res*, 2012; 40: 648-56.
98. Maes P, Clement J, Gavrilovskaya I, Van Ranst M. Hantaviruses: immunology, treatment, and prevention. *Viral Immunol*, 2004; 17(4): 481-97.
99. Linderholm M, Ahlm C, Settergen B, Waage A ve ark. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6 and IL-

- 10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis*, 1996; 173(1): 38-43.
- 100.** Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS ve ark. Hantavirus pulmonary syndrome- pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol*, 1995; 146(3): 552-79.
 - 101.** Li M, Ji Y, Dong Y, Zhou Y ve ark. The detection of vascular endothelial growth factor in serum of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Inflammation*, 2013; 36(4): 962-7.
 - 102.** Dvorak HF. Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res*, 2006; 312: 522-6.
 - 103.** Khaiboullina SF, Martynova EV, Khamidullina ZL, Lapteva EV ve ark. Upregulation of IFN- γ and IL-12 is associated with a milder form of hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014; 33: 2149-56.
 - 104.** Saksida A, Wraber B, Avšič-Županc T. Serum levels of inflammatory and regulatory cytokines in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *BMC Infect Dis*, 2011; 11: 142.
 - 105.** Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C ve ark. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med*, 2011; 208(1): 13-21.
 - 106.** Sane J, Laine O, Mäkelä S, Paakkala A ve ark. Complement activation in Puumala hantavirus infection correlates with disease severity. *Ann Med*, 2012; 44(5): 468-75.
 - 107.** Outinen TK, Mäkelä S, Huhtala H, Hurme M ve ark. High pentraxin-3 plasma levels associate with thrombocytopenia in acute Puumala hantavirus-induced nephropathia epidemica. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012; 31(6): 957-63.
 - 108.** de Carvalho Nicacio C, Bjorling E, Lundkvist A. Immunoglobulin A response to Puumala hantavirus. *J Gen Virol*, 2000; 81: 1453-61.
 - 109.** Lundkvist A, Bjorsten S, Niklasson B. Immunoglobulin G subclass responses against the structural components of Puumala virus. *J Clin Microbiol*, 1993; 31: 368-72.
 - 110.** Vapalahti O, Lundkvist A, Vaheri A. Human immune response, host genetics and severity of disease, In: Schmaljohn CS, Nichol ST, editors. *Hantaviruses*, 1st edition, New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 256, 153-69.

111. Schonrich G, Rang A, Lutteke N, Raftery MJ ve ark. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol Rev*, 2008; 225(1): 163-89.
112. Lee HW. Epidemiology and pathogenesis of haemorrhagic fever with renal syndrome. In: Elliot RM, editor. *The Bunyaviridae*. New York: Plenum Press; 1996, 253-67.
113. Zou LX, Chen MJ, Sun L. Haemorrhagic fever with renal syndrome: literature review and distribution analysis in China. *Int J Infect Dis*, 2016; 43: 95-100.
114. McCaughey C, Hart CA. Hantaviruses. *J Med Microbiol*, 2000; 49: 587-99.
115. Heyman P, Ceianu CS, Christova I, Tordo N ve ark. A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Euro Surveill*, 2011; 16(36).
116. Avsic-Zupanc T, Korva M, Marcotic A. HFRS and hantaviruses in the Balkans/South-East Europe. *Virus Res*, 2014; 187: 27-33.
117. Knust B, Rollin PE. Twenty-year summary of surveillance for human hantavirus infections, United States. *Emerg Infect Dis*, 2013; 19: 1934-7.
118. Firth C, Tokarz R, Simith DB, Nunes MR ve ark. Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *J Virol*, 2012; 86: 13756-66.
119. Jiang H, Zheng X, Wang L, Du H ve ark. Hantavirus infection: a global zoonotic challenge. *Virol Sin*, 2017; 32(1): 32-43.
120. Polat C, Karatas A, Sözen M, Matur F ve ark. Yabani kemiricilerde Eski Dünya Hantavirus antikorlarının saptanması için enzim immunoassay ve immunoblot optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul*, 2016; 50(2): 245-55.
121. Öktem MA. Hantavirüs enfeksiyonlarında laboratuvar tanısı, In: Özkan AT, Duman DC, Uyar Y, editors. *Hantavirüs sempozyumu*. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68(2): 45-7.
122. Huggins JW, Kim GR, Brand OM, McKee KT Jr. Ribavirin therapy for Hantaan virus infection in suckling mice. *J Infect Dis*, 1986; 153(3): 489-97.
123. Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY ve ark. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis*, 1991; 164(6): 1119-27.

124. Ogg M, Jonsson CB, Camp JV, Hooper JW. Ribavirin protects Syrian hamsters against lethal hantavirus pulmonary syndrome – after intranasal exposure to Andes virus. *Viruses*, 2013; 5: 2704-20.
125. Severson WE, Schmaljohn CS, Javadian A, Jonsson CB. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol*, 2003; 77: 481-8.
126. Kruger DH, Figueiredo LT, Song JW, Klempa B. Hantaviruses-globally emerging pathogens. *J Clin Virol*, 2015; 64: 128-36.
127. Muranyi W, Bahr U, Zeier M, van der Woude FJ. Hantavirus Infection. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16(12): 3669-79.
128. Cho HW, Howard CR. Antibody response in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax). *Vaccine*, 1999; 17(20-21): 2569-75.
129. Papa A, Mills JN, Kouidou S, Ma B ve ark. Preliminary characterization and natural history of hantaviruses in rodents in Northern Greece. *Emerg Infect Dis*, 2000; 6(6): 654-5.
130. Papa A, Nemirov K, Henttonen H, Niemimaa J ve ark. Isolation of Dobrava virus from *Apodemus flavicollis* in Greece. *J Clin Microbiol*, 2001; 39(6): 2291-3.
131. Christova I, Plyusnina A, Gladnishka T, Kalvatchev N ve ark. Detection of Dobrava Hantavirus RNA in *Apodemus* mice in Bulgaria. *J Med Virol*, 2015; 87(2): 263-8.
132. Stamenković G, Nikolić V, Blagojević J, Bugarski-Stanojević V ve ark. Genetic analysis of Dobrava-Belgrade virus from Western Serbia- a newly detected focus in the Balkan Peninsula. *Zoonoses Public Health*, 2014; 62(2): 141-50.
133. Panculescu-Gatej RI, Sirbu A, Dinu S, Waldstrom M ve ark. Dobrava virus carried by yellow-necked field mouse *Apodemus flavicollis*, causing hemorrhagic fever with renal syndrome in Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2014; 14(5): 358-64.
134. Papa A, Rogozi E, Velo E, Papadimitriou E ve ark. Genetic detection of hantaviruses in rodents, Albania. *J Med Virol*, 2016; 88(8): 1309-13.
135. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty- something years on. *Nature Protocols*, 2006; 1(2): 581-5.
136. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, ve ark. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12: 838-40.

137. Jaarola M, Searle JB. Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Ecol*, 2002; 11: 2613-21.
138. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW ve ark. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990; 215(3): 403-10.
139. Jaarola M, Martinkova N, Gündüz I, Brunhoff C ve ark. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 2004; 33(3): 647-63.
140. Dinçer E, Özkul A. Hantavirüsün moleküler karakterizasyonu ve genetik ağaç, In: Özkan AT, Duman DC, Uyar Y, editors. Hantavirüs sempozyumu. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68(2): 49-50.
141. Pardinas U, Myers P, Leon-Paniagua L, Garza NO ve ark. Family Cricetidae (True Hamsters, Voles, Lemmings and New World Rats and Mice), In: Wilson DE, Lacher Jr TE, Mittermeier RA, editors. *Handbook of the Mammals of the World - Volume 7 Rodents II*. Barcelona, ES, Lynx Edicions, 2017, 331-53.
142. Plyusnina A, Laakkonen J, Niemimaa J, Henttonen H ve ark. New genetic lineage of Tula Hantavirus in *Microtus arvalis obscurus* in Eastern Kazakhstan. *Open Virol J*, 2008; 2: 32-6.
143. Song JW, Gligic A, Yanagihara R. Identification of Tula hantavirus in *Pitymys subterraneus* captured in the Cacak region of Serbia- Yugoslavia. *Int J Infect Dis*, 2002; 6(1): 31-6.
144. Yashina LN, Zaykovskaya AV, Protopopova EV, Babkin IV ve ark. Tula hantavirus in Crimea. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 2015; 33(4): 38-41.
145. Tkachenko EA, Witkowski PT, Radosa L, Dzagurova TK ve ark. Adler hantavirus, a new genetic variant of Tula virus identified in Major's pine voles (*Microtus majori*) sampled in southern European Russia. *Infect Genet Evol*, 2015; 29: 156-63.
146. <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=1892>, erişim tarihi 29.12.2017.
147. <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=1888>, erişim tarihi 29.12.2017.
148. <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=4973>, erişim tarihi 29.12.2017.
149. <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=19360>, erişim tarihi 29.12.2017.
150. <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=19353>, erişim tarihi 29.12.2017.
151. <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=13488>, erişim tarihi 29.12.2017.

152. Castel G, Tordo N, Plyusnin A. Estimation of main diversification time-points of hantaviruses using phylogenetic analyses of complete genomes. *Virus Res*, 2017; 233: 60-9.
153. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ ve ark. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 2016; 540: 539-43.
154. Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: A global disease problem. *Emerg Infect Dis*, 1997; 3: 95.
155. Klingstrom J, Heyman P, Escutenaire S, Sjolander KB, ve ark. Rodent host specificity of European hantaviruses: Evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J Med Virol*, 2002; 68: 581-8.
156. Schmidt-Chanasit J, Essbauer S, Petraityte R, Yoshimatsu K, ve ark. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J Virol*, 2010; 84: 459-74.
157. Gür H. Geç Kuvaterner Buzul buzullararası döngülerinin Anadolu'nun biyolojik çeşitliliği üzerine etkileri. *Türkiye Jeoloji Bülteni*, 2017; 60(4): 507-28.
158. Yavuz M, Öz M, Albayrak I. Two new locality records extend the distribution of *Microtus anatolicus* Kryštufek and Kefelioğlu, 2002 (Mammalia: Rodentia) into Antalya Province in Turkey. *North-Western Journal of Zoology*, 2009; 5(2): 364-9.
159. Brummer-Korvenkontio M, Henttonen H, Vaheri A. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Finland: ecology and virology of nephropathia epidemica. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1982; 36: 88-91.
160. Engelthaler DM, Mosley DG, Cheek JE, Levy CE ve ark. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, Four Corners region, United States. *Emerg Infect Dis*, 1999; 5: 87-94.
161. Buceta J, Escudero C, De la Rubia FJ, Lindenberg K. Outbreaks of hantavirus induced by seasonality. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2004; 69: 021906.
162. Yan L, Fang LQ, Huang HG, Zhang LQ ve ark. Landscape elements and Hantaan virus-related hemorrhagic fever with renal syndrome, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2007; 13(9): 1301-6.
163. Clement J, Vercauteren J, Verstraeten WW, Ducoffre G ve ark. Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: the mast connection. *Int J Health Geogr*, 2009; 8: 1.

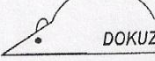
- 164.** Kallio ER, Begon M, Henttonen H, Koskela E ve ark. Cyclic hantavirus epidemics in humans predicted by rodent host dynamics. *Epidemics*, 2009; 1: 101-7.
- 165.** Klempa B. Hantaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect*, 2009; 15: 518-23.
- 166.** Tersago K, Verhagen R, Servais A, Heyman P ve ark. Hantavirus disease (nephropathia epidemica) in Belgium: effects of tree seed production and climate. *Epidemiol Infect*, 2009; 137: 250-6.
- 167.** Ostfeld RS, Keesing F. Effects of host diversity on infectious disease. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 2012; 43: 157-182.
- 168.** Lafferty KD, Wood CL. It's a myth that protection against disease is a strong and general service of biodiversity conservation: Response to Ostfeld and Keesing. *Trends Ecol Evol*, 2013; 28: 503-4.
- 169.** Mirsaedi M, Motahari H, Khamesi MT, Sharifi A ve ark. Climate change and respiratory infections. *Ann Am Thorac Soc*, 2016; 13(8): 1223-30.
- 170.** Bayard V, Kitsutani PT, Barria EO, Ruedas LA, ve ark. Outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Los Santos, Panama, 1999-2000. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10(9): 1635-42.
- 171.** Jiang F, Wang L, Wang S, Zhu L ve ark. Meteorological factors affect the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome via altering the breeding and hantavirus-carrying states of rodents and mites: a 9 years' longitudinal study. *Emerg Microbes Infect*, 2017; 6(11): e104.
- 172.** Tersago K, Verhagen R, Vapalahti O, Heyman P ve ark. Hantavirus outbreak in Western Europe: reservoir host infection dynamics related to human disease patterns. *Epidemiol Infect*, 2011; 139: 381-90.
- 173.** Bilgin R. Back to the suture: The distribution of intraspecific genetic diversity in and around Anatolia. *Int J Mol Sci*, 2011; 12: 4080-103.
- 174.** Ölgün MK. Türkiye’de yıllık ve mevsimsel yağış değişkenliğinin alansal dağılımı. *Ege Coğrafya Dergisi*, 2010; 19(1): 85-95.
- 175.** Demircan M, Gürkan H, Eskioğlu O, Arabacı H, Coşkun M. Climate change projections for Turkey: three models and two scenarios. *Turkish Journal of Water Science and Management*, 2017; 1(1): 22-43.

- 176.** Levinsky I, Skov F, Svenning JC, Rahbek C. Potential impacts of climate change on the distributions and diversity patterns of European mammals. *Biodiverse Conserv*, 2007; 16: 3803-16.
- 177.** Maiorano L, Falcucci A, Zimmermann NE, Psomas A ve ark. The future of terrestrial mammals in the Mediterranean basin under climate change. *Phil Trans R Soc B*, 2011; 366: 2681-92.
- 178.** Witkowski PT, Klempa B, Ithete NL, Auste B ve ark. Hantaviruses in Africa. *Virus Res*, 2014; 187: 34-42.
- 179.** Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV ve ark. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev*, 2006; 19: 531-45.



8. EKLER

EK-I

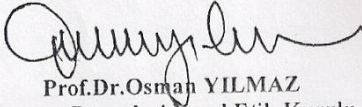
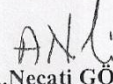
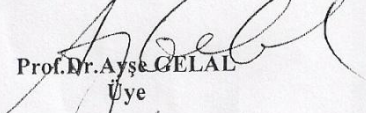
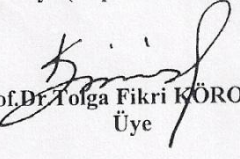
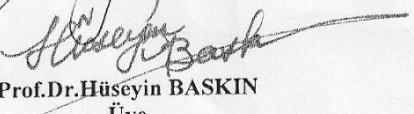
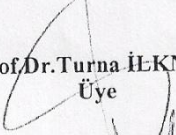
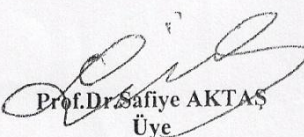
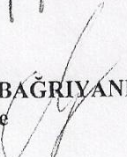
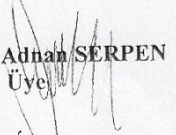
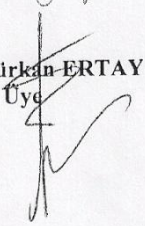
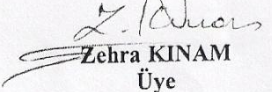
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
35340, Inciraltı, İzmir-232 412234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 09/05/2014
Toplantı Tarihi : 04 Mart 2014

Sayın, Doç.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

15/2014 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Türkiye'nin Akdeniz ve İç Anadolu Bölgelerindeki apodemus spp, microtus spp, talpa europaea, rattus rattus ve rattus norvegicus türlerinde Hantavirus varlığının ve dağılımının araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	 Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN Başkan Yardımcısı
 Prof.Dr.Alper SOYLU Üye (Topl.katılmadı)	 Prof.Dr.Ayşe GELAL Üye
 Prof.Dr.Tolga Fikri KÖROĞLU Üye	 Prof.Dr.Hüseyin BASKIN Üye
 Prof.Dr.Gülgün OKTAY Üye (Topl.katılmadı)	 Prof.Dr.Turna İLKNUR Üye
 Prof.Dr.Safiye AKTAŞ Üye	 Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU Üye
 Prof.Dr.Tonay İNCEBOZ Üye	 Prof.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK Üye
 Vet.Hekim Adnan SERPEN Üye	 Doç.Dr.Türkan ERTAY Üye
 Zehra KINAM Üye	

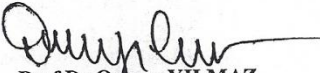
NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 11/06/2014
Toplantı Tarihi : 18 Mart 2014

Sayın, Doç.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

15/2014 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Türkiye'nin Akdeniz ve İç Anadolu Bölgelerindeki Apodemus spp, Microtus spp, Talpa europaea, Rattus rattus ve Rattus norvegicus türlerinde Hantavirus varlığının ve dağılımının araştırılması" isimli projede, proje isminin "Türkiye'nin Akdeniz ve İç Anadolu Bölgelerindeki Apodemus spp, Microtus spp, Talpa davidiana, Rattus rattus ve Rattus norvegicus türlerinde Hantavirus varlığının ve dağılımının araştırılması" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.

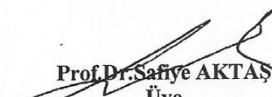
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

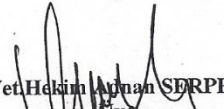

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

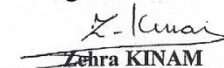
Prof.Dr.Tolga Fikri KÖROĞLU
Üye
(Topl.katılmadı)

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye (Topl.katılmadı)


Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

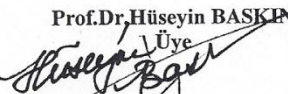

Prof.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye


Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

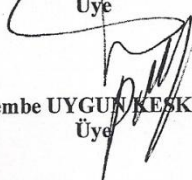

Zehra KINAM
Üye


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye (Topl.Katılmadı)


Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye


Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Prof.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye (Topl.Katılmadı)

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-III

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 02/15/2014

Toplantı Tarihi : 19 Ağustos 2014

Sayın, Doç.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

15/2014 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Türkiye'nin Akdeniz ve İç Anadolu Bölgelerindeki apodemus spp, microtus spp, talpa europaea, rattus rattus ve rattus norvegicus türlerinde Hantavirus varlığının ve dağılımının araştırılması" isimli projede; proje isminin "Türkiye'nin Akdeniz(Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye ve Hatay) ve İç Anadolu Bölgelerindeki (Konya, Aksaray, Niğde, Karaman) bazı illerde yaşayan Apodemus Spp, Microtus Spp, Rattus Spp, Talpa Davidiana türlerinde Hantavirus varlığının ve dağılımının araştırılması" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

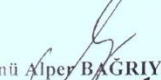

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

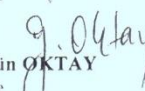

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

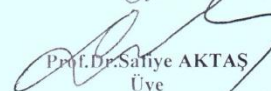
Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye (Topl.Katılmadı)

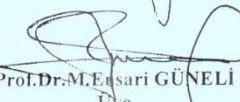
Prof.Dr. Hüseyin BASKIN
Üye (Topl.Katılmadı)


Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye


Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK
Üye


Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye


Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

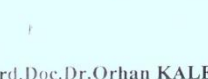

Prof.Dr.M.Ersari GÜNELİ
Üye


Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye


Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye


Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye


Doç.Dr.Metin KARAMAN
Üye


Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI
Üye


Zehra KINAM
Üye


Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-IV



T.C.
ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü



ACELE

Sayı : 72784983-488.04-
Konu: Araştırma İzni

DAĞITIMLI

Üniversiteniz Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. M. Ali ÖKTEM tarafından yürütülecek olan “Türkiye'nin Akdeniz (Antalya, Mersin, Adana, Osmaniye ve Hatay) ve İç Anadolu Bölgelerindeki (Konya, Aksaray, Niğde, Karaman) Bazı İllerde Yaşayan *Apodemus* spp, *Microtus* spp, *Rattus* spp. ve *Talpa davidiana* Türlerinde Hantavirus Varlığının ve Dağılımının Araştırılması ” konulu proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzni Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması,
 - Arazi çalışması öncesinde ve arazide yapılacak her türlü çalışma ile ilgili Orman ve Su İşleri Bakanlığının ilgili İl Şube Müdürlüklerine bilgi verilmesi,
 - Arazi çalışmalarının ilgili Bölge Müdürlüğü elemanlarının denetiminde yapılması,
 - Arazi çalışmalarının milli parklarda olması durumunda ilgili Milli Park Müdürlüğüne süreç ve sonuç hakkında bilgi verilmesi,
 - Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,
 - Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılması ve bu örneklerin Genel Müdürlüğümüz onayı alınmadan yurtdışına çıkarılmaması,
 - Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının ilgili Bölge Müdürlüklerine ve Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,
- koşuluyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, izin belgeleri ekte gönderilmektedir.
- Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

EKLER :
1- 1 Takım İzni Belgesi

DAĞITIM :

Adres : Söğütözü Cad. No:14/E Beştepe 06560 Yenimahalle -
ANKARA
Telefon : 20755571
e-posta : basakkoc@cob.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi : B. KOCA Biyolog
Fax :
Elektronik Ağ: www.ormansu.gov.tr

EK-V

ÖZGEÇMİŞ

CEYLAN POLAT

TC Kimlik No / Pasaport No:	18440646856
Doğum Tarihi ve Yeri:	25/01/1988 Aydın
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. 35340 Narlıdere/İzmir
Telefon :	0555 708 03 19
e-posta :	ceylan_polat@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Mikrobiyoloji	Doktora	2018
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2013
Türkiye	Celâl Bayar Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Haartman Institute, University of Helsinki	Finlandiya	Helsinki	Viral Zoonoses Laboratory, Department of Virology	Misafir araştırmacı	25.09.2014- 22.12.2014
Ege Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıp Fakültesi, Parazitoloji A. D., Moleküler Parazitoloji Laboratuvarı	Stajyer	09.2009- 05.2010
Ege Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A. D., Kordon Kanı Bankası	Stajyer	11.2009- 03.2010
Ege Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A. D., Moleküler Tıp Laboratuvarı	Stajyer	20.07.2009- 26.08.2009
Ege Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıp Fakültesi, Araştırma Ve Eğitim Laboratuvarı (AREL)	Stajyer	09.07.2008- 25.08.2008

Ege Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları A. D., İmmunoloji ve Endokrinoloji Laboratuvarları	Stajyer	27. 06.2007-12.09.2007
------------------	---------	-------	---	---------	------------------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Mikrobiyoloji, Viroloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			9
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Young Scientist Grant	Microbiologia Balkanica Congress	2017
Sözlü Sunum İkinciliği	1.Ulusal Viroloji Günleri ve Kursu	2016
Research Fellowship Grant	Federation of European Microbiological Societies (FEMS)	2014
Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2012-2013 Akademik Yılı Yüksek Lisans Birinciliği	Dokuz Eylül Üniversitesi	2013
ESV Young Scientist Travel Award (5 th European Congress of Virology)	European Society for Virology (ESV)	2013
Meeting Attendance Grant (5 th European Congress of Virology)	Federation of European Microbiological Societies (FEMS)	2013
Sözlü Sunum Birinciliği	Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi)	2012

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Brinkmann A, Dincer E, **Polat C**, Hekimoglu O, Földes K, Ozkul A, Oktem IMA, Nitsche A, Ergunay K. A metagenomic survey of ticks identifies Tamdy orthonairovirus as well as divergent phlebo, rhabdo, chu and flavi-like viruses in Anatolia, Turkey. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.04.017.

Polat C, Sironen T, Plyusnina A, Karatas A, Sozen M, Matur F, Vapalahti O, Oktem IMA, Plyusnin A. Dobrava Hantavirus Variants Found in *Apodemus flavicollis* Mice in Kırklareli Province, Turkey. *J Med Virol* 2018; 90(5): 810-8.

Polat C, Karatas A, Sözen M, Matur F, Abacioglu H, Oktem MA. Yabani kemiricilerde Eski Dünya Hantavirus antikorlarının saptanması için enzim immunoassay ve immunoblot optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2016, 50(2): 245-55.

Kayman T, **Polat C**, Ergör G, Abacioğlu A. Characterization of HCV genotype 4d infections in Kayseri, Turkey. *Turk J Med Sci* 2015; 45: 547-52.

Ciccozzi M, Zehender G, **Polat C**, Lai A, Kayman T, Sorrentino C, Ebranati E, Cella E, Lo Presti A, Abacioglu H. Phylogenetic analysis of HCV-4d in Turkey: the curious case of Kayseri province. *J Med Virol* 2014; 86(3): 454-60.

Can H., Caner A, Döşkaya M, Değirmenci A, Karaçalı S, **Polat C**, Gürüz Y, Üner A. Detection of *Pneumocystis* in the nasal swabs of immune-suppressed rats by use of PCR and microscopy. *Med Sci Monit Basic Res* 2013; 19: 62-7.

Polat C, İz SG, Döşkaya M, Can H, Caner A, Değirmenci A, Balcan E, Gürüz Y. Türkiye'de izole edilen iki farklı *Toxoplasma gondii* suşundan üretilen adjuvanlı takizoit eriyik protein aşılarının uyardığı immun yanıtın karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 122-34.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Polat C, Matur F, Sözen M, Oktem MA. Türkiye'nin Orta ve Güney Anadolu illerindeki yabani kemiricilerde hantavirüs enfeksiyonlarının serolojik olarak taranması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2017; 47(1): 6-10.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Polat C, Brinkmann A, Hekimoglu O, Földes K, Ozkul A, Nitsche A, Oktem IMA, Ergunay K. Türkiye'de yeni bir *Orthonairovirus*: Tamdy virus. 2. Ulusal Viroloji Günleri, 22-24 Mart

2018, İzmir, Türkiye (Sözel Bildiri)
Polat C , Çelebi B, Karataş A, Irmak S, Çolak F, Matur F, Sozen M, Öktem MA. <i>Bartonella taylorii</i> existence in Apodemus mice in Thrace Region of Turkey. 10 th Balkan Congress of Microbiology (Microbiologia Balkanica'2017), 16-18 Kım 2017, Sofya, Bulgaristan (Poster)
Oktem MA, Polat C , Matur F, Irmak S, Cetintas O, Cogal M, Sozen M. New Hantavirus positivity in different <i>Microtus</i> and <i>Crocidura</i> species from Turkey. 8 th European Meeting on Viral Zoonoses, 22-25 Ekim 2017, St. Raphael, Fransa (Poster)
Polat C , Sozen M, Matur F, Cetintas O, Cogal M, Çolak F, Oktem MA. Investigation of Hantavirus existence in Mediterranean and Central Anatolia Regions of Turkey. 8 th European Meeting on Viral Zoonoses, 22-25 Ekim 2017, St. Raphael, Fransa (Poster)
Polat C , Çelebi B, Karataş A, Irmak S, Çolak F, Matur F, Sozen M, Öktem MA. The investigation of <i>Bartonella</i> spp. presence in Thrace Region rodents. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya, Türkiye (Poster)
Gökahmetoğlu S, Polat C , Atalay MA, Sezgin GC, Ergör G, Aygen B, Gürsoy Ş, Abacıoğlu H. Molecular epidemiology of Hepatitis C virus genotype 4 isolates in Kayseri. 32 nd Clinical Virology Symposium, 19-22 Mayıs 2016, Florida, ABD (Poster)
Polat C , Sironen T, Plyusnina A, Karatas A, Sozen M, Matur F, Vapalahti O, Oktem IMA, Plyusnin A. Trakya bölgesindeki kemiricilerde hantavirus varlığı ve moleküler epidemiyolojisi. 1.Ulusal Viroloji Günleri, 26-28 Şubat 2016, Ankara, Türkiye (Sözel Bildiri)
Gökahmetoğlu S, Polat C , Atalay MA, Sezgin GC, Ergör G, Aygen B, Gürsoy Ş, Abacıoğlu H. Kayseri bölgesinde saptanan HCV genotip 4 izolatlarının moleküler epidemiyolojisi. 1.Ulusal Viroloji Günleri, 26-28 Şubat 2016, Ankara, Türkiye (Sözel Bildiri)
Polat C , Sironen T, Plyusnina A, Karatas A, Sozen M, Matur F, Vapalahti O, Oktem IMA, Plyusnin A. Evolution of Hantavirus from rodents in Kırklareli Igneada Region, Turkey. 26 th

Sigrid Juselius Symposium: Emerging Infections, 7-10 Haziran 2015, Espoo, Finlandiya (Poster)

Polat C, Kayman T, Ergör G, Abacıoğlu H. Molecular characterization of HCV genotype 4d infections in Kayseri region. 5th European Congress of Virology, 11-14 Eylül 2013, Lyon, Fransa (Sözel Bildiri)

Polat C, Oktem MA, Karatas A, Sözen M, Matur F, Abacıoğlu H. Optimization of a commercial Hantavirus IgG enzyme immunoassay for human use to screen infection among wild rodents in Kırklareli, Turkey. 5th European Congress of Virology, 11-14 Eylül 2013, Lyon, Fransa (Poster)

Kayman T, **Polat C**, Ergör G, Abacıoğlu YH. Kayseri yöresinde HCV genotip 4d enfeksiyonlarının moleküler karakterizasyonu: *Preliminer veriler*. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 3-7 Kasım 2012, Kuşadası, Türkiye (Sözel Bildiri)

Polat C, İz SG, Döşkaya M, Can H, Caner A, Değirmenci A, Balcan E, Gürüz Y. *Toxoplasma gondii* Ankara ve Ege suşlarından elde edilen eriyik protein aşılarının BALB/c farelerde uyardığı immun yanıt. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu, Kafkas Üniversitesi. 4-10 Eylül 2011, Kars, Türkiye (Poster)

Polat C, İz SG, Döşkaya M, Can H, Caner A, Değirmenci A, Balcan E, Gürüz Y. Türkiye’de izole edilen iki farklı *Toxoplasma gondii* suşundan üretilen adjuvante eriyik protein aşılarının uyardığı immun yanıtın karşılaştırılması. 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 27-30 Ekim 2010, Girne, KKTC (Sözel Bildiri)

Can H., Caner A, Döşkaya M, Değirmenci A, Karaçalı S, **Polat C**, Gürüz Y, Üner A. İmmün sistemi baskılanmış sıçanlara ait doku, kan ve vücut sıvılarında *Pneumocystis carinii*’nin moleküler tekniklerle gösterilmesi. 20.Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi. 21-25 Haziran 2010, Denizli, Türkiye (Poster)

EK-VI

Tezle İlişkili Yayınlar

- I. **Polat C**, Sironen T, Plyusnina A, Karatas A, Sozen M, Matur F, Vapalahti O, Oktem IMA, Plyusnin A. Dobrava Hantavirus Variants Found in *Apodemus flavicollis* Mice in Kırklareli Province, Turkey. *J Med Virol* 2018; 90(5): 810-8.
- II. **Polat C**, Matur F, Sözen M, Oktem MA. Türkiye'nin Orta ve Güney Anadolu illerindeki yabani kemiricilerde hantavirüs enfeksiyonlarının serolojik olarak taranması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2017; 47(1): 6-10.
- III. **Polat C**, Karatas A, Sözen M, Matur F, Abacioglu H, Oktem MA. Yabani kemiricilerde Eski Dünya Hantavirus antikorlarının saptanması için enzim immunoassay ve immunoblot optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(2): 245-55.

Yabani Kemiricilerde Eski Dünya Hantavirus IgG Antikorlarının Saptanması için ELISA ve İmmünoblot Yöntemlerinin Optimizasyonu*

Optimization of ELISA and Immunoblot Methods for the Detection of IgG Antibodies Against Old World Hantaviruses in Wild Rodents

Ceylan POLAT¹, Ahmet KARATAŞ², Mustafa SÖZEN³, Ferhat MATUR³, Hakan ABACIOĞLU⁴, Mehmet Ali ÖKTEM¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

² Niğde Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Niğde.

² Niğde University Faculty of Arts&Sciences, Department of Biology, Niğde, Turkey.

³ Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak.

³ Bülent Ecevit University Faculty of Arts&Sciences, Department of Biology, Zonguldak, Turkey.

⁴ İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁴ İzmir University of Economics, School of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

*Bu çalışma, 5th European Virology Congress (11-14 Eylül 2013, Lyon, Fransa)'de poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 15.01.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 09.03.2016

ÖZ

Hantaviruslar, enfekte kemiricilerin salya, dışkı ve idrar gibi salgılarında bulunan virus partiküllerinin solunması ya da enfekte kemiricilerle direkt temas sonucu insanlara bulaşmaktadır. Ülkemizde, hantavirus tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) viruslarının taşıyıcısı olan kemirici türleri bulunmaktadır. Türkiye'deki kemiricilerde hantaviruslara özgül antikor varlığı, ilk kez 2004 yılında Karadeniz ve Ege bölgelerinden toplanan kemiricilerde gösterilmiştir. İlk renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) olguları ise 2009 yılında yine Karadeniz bölgesinden bildirilmiştir. Yaban hayatı ve sahadaki kemirici popülasyonlarında hantavirus prevalansının önceden belirlenmesi, hantaviruslara bağlı olguların durumu hakkında bilgi edinilmesi ve sahadaki risk durumunun ortaya konması açısından önem taşımaktadır. Kemiricilere ait örneklerin, DOBV ve PUUV gibi Avrasya'da sık görülen ve ülkemizde de görüldüğü bilinen bazı RSKA etkenleri açısından taranmasında kullanılabilecek şekilde optimize edilmiş bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu çalışmada, insan serumlarının taranması için üretilmiş, ticari enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) ve immünoblot testlerine ait antijenler

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Mehmet Ali Öktem, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35340 Narlıdere, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 4501, **E-posta (E-mail):** ali.oktem@deu.edu.tr

kullanılarak, kemirici örneklerinde hantavirusa özgül antikorların taranmasına uygun testlerin optimizasyonu sağlanmıştır. ELISA (Anti-Hantavirus Pool ELISA; Euroimmun, Almanya) ve immüno blot (Euroline Anti-Hanta Profile 1 strips; Euroimmun, Almanya) yöntemlerinin optimizasyonu için, en uygun serum ve konjugat dilüsyonları denenmiş ve ELISA yöntemi tarama, immüno blot yöntemi ise doğrulama amacıyla kullanılmıştır. Belirlenen bu prosedür ile, *Apodemus* ve *Microtus* türlerinden 84 kemiriciye ait serum örnekleri değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar ile optimize edilen ELISA yönteminin eşik değeri, duyarlılık ve özgüllüğü saptanmıştır. ELISA yönteminin optimizasyonu için 1/50, 1/100 ve 1/200 serum dilüsyonları ile 1/10.000, 1/20.000 ve 1/40.000 konjugat dilüsyonları; immüno blot yönteminin optimizasyonu için ise 1/50 ve 1/100 serum dilüsyonları ile 1/5.000 ve 1/10.000 konjugat dilüsyonları değerlendirilmiştir. ELISA için "horseradish" peroksidad enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı, immüno blot için ise alkalin fosfataz ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı kullanılmıştır. İnkübasyon süresi, yıkama sayısı ve substrat seçimi için üretici firmanın protokolü uygulanmıştır. ELISA yöntemi için 1/50 serum dilüsyonu ve 1/10.000 konjugat dilüsyonu, immüno blot için ise 1/100 serum dilüsyonu ve 1/5.000 konjugat dilüsyonu optimal değerler olarak belirlenmiştir. Optimize edilen ELISA yöntemiyle, belirlenen eşik değerine ($OD_{450/620}$: 0.325) göre, kemiricilerin %26.2'sinde (22/84) hantavirusa karşı antikor varlığı saptanmıştır. Doğrulama amacıyla kullanılan optimize immüno blot yöntemiyle ise, ELISA ile pozitif bulunan 22 örneğin -serum yetersizliği nedeniyle- 20'si çalışılmış ve 17'sinde DOBV antikor pozitifliği saptanmıştır. Bu kemiricilerden 11'i *Apodemus flavicollis*, üçü *Apodemus agrarius*, ikisi *Microtus guentheri* ve biri de *Apodemus sylvaticus* türlerine aittir. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, optimize ELISA yönteminin %100 duyarlılık ve %95 özgüllükte olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile kemirici serumlarının taranmasında kullanılabilecek, kolaylıkla ulaşılabilen ticari ürünlerden elde edilen antijenlerin kullanıldığı, hızlı ve güvenilir sonuç veren bir yöntem oluşturulmuştur. Benzer çalışmalar ile farklı türden kemiricilere yönelik olarak optimize edilecek serolojik yöntemler, alanda aktif izlem ve denetleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Hantavirus; kemirici; seroloji; optimizasyon.

ABSTRACT

Hantaviruses infect humans via inhalation of viral particles in infected rodents' secretions such as saliva, urine and faeces or via direct contact with infected rodents. The rodent species that are known as the carriers of Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) and Seoul (SEOV) viruses are found in our country. The presence of specific antibodies against hantaviruses have been demonstrated in rodents collected from Black Sea and Aegean Regions of Turkey in 2004 for the first time. The first hantavirus-related hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) cases were reported in Black Sea region in 2009. The determination of the hantavirus prevalence in wild life and rodent populations in the field is crucial for the information about hantavirus-related cases and to clarify the state of risk. There is no commercial product optimized for the screening of rodent serum samples in terms of HFRS agents like DOBV and PUUV that are widely seen in Eurasia as well as Turkey. In this study, the antigens belonging to the commercial enzyme-linked immunoassay (ELISA) and immunoblot tests that are produced for the screening of human sera were used for the development of antibody screening tests against hantavirus in rodent sera and were optimized. The most appropriate serum and conjugate dilutions were determined for the optimization of ELISA (Anti-Hantavirus Pool ELISA; Euroimmun, Germany) and immunoblot (Euroline Anti-Hanta Profile 1 strips; Euroimmun, Germany) methods. Optimized ELISA method was used for the screening and optimized immunoblot method was used for the confirmation. A total of 84 wild rodent sera that belonged to *Apodemus* and *Microtus* species were evaluated with this procedure and the cut-off value, sensitivity and specificity of optimized ELISA method were determined. For the optimization of ELISA 1/50, 1/100 and 1/200 serum dilutions and 1/10.000, 1/20.000 and 1/40.000 conjugate dilutions were tested. For the optimization of immunoblot, 1/50 and 1/100 serum dilutions and 1/5.000 and 1/10.000 conjugate dilutions were tested. The horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG for ELISA and the alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG for immunoblot were used. We

followed the manufacturer's recommendations for the incubation parameters, substrate and the number of washes. 1/50 serum dilution and 1/10.000 conjugate dilution for ELISA and 1/100 serum dilution and 1/5.000 conjugate dilution for immunoblot were determined as optimal concentrations. By using the optimized ELISA, 26.2% (22/84) of rodents were found positive for hantavirus antibodies according the determined cut-off value ($OD_{450/620}$: 0.325). By using immunoblot as a confirmatory test, 20 out of 22 ELISA positive samples could be studied because of the insufficient amount of sera and 17 of them was found positive in terms of DOBV antibodies. Of these rodents 11 were *Apodemus flavicollis*, three were *Apodemus agrarius*, two were *Microtus guentheri* and one was *Apodemus sylvaticus*. When the results of ELISA were compared to immunoblot results, the optimized ELISA's sensitivity and specificity were found as 100% and 95%, respectively. In this study, a method that can be used in the screening of rodent sera was constituted which uses commercial antigens that can be provided easily, gives fast and reliable results. Similar serological methods optimized for different types of rodents are of great importance for the realization of active follow-up and monitoring of the studies in the field.

Keywords: Hantavirus; rodent; serology; optimization.

GİRİŞ

Hantaviruslar *Bunyaviridae* ailesine ait altı büyük cinsten biri olup, tek iplikli, negatif yönelimli, segmentli RNA genomuna sahip, zarflı viruslardır. Küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olmak üzere üç segmentten oluşan genomda, segmentler sırasıyla, viral nükleokapsid proteini, viral zarf glikoproteinleri ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlar. Bunlardan nükleokapsid proteini ve zarf glikoproteinleri, hantavirusların tanısı için geliştirilen çeşitli serolojik yöntemlerde antijen olarak kullanılmaktadır¹.

Hantaviruslar, asıl konakları kemiriciler ve böcekçiller olmasına rağmen, enfekte kemiricilerin salgılarındaki (salya, dışkı ve idrar) viral partiküllerin solunması ve nadiren enfekte kemiricilerle temas sonucu insanlara bulaşır². Herbir hantavirus tipi, o virusa özgül bir kemirici konak tarafından taşınmaktadır³. Hantaviruslar, kemiricilerde kronik asemptomatik enfeksiyonlara neden olmasına rağmen, insanlarda renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirus pulmoner sendrom (HPS) gibi yüksek mortaliteye sahip klinik tablolar oluşturmaktadır³. Hantavirus enfeksiyonlarında, hastalığın ayırt edici belirtilerinin olmaması ve şiddetinin etkene göre değişiklik göstermesi, tanıyı zorlaştırmaktadır. Virusa karşı etkili bir antiviral ajanın bulunmaması nedeniyle, enfeksiyondan korunma önem taşımaktadır. Bu nedenle yaban hayatı ve sahadaki kemirici popülasyonlarında enfeksiyonun takip edilmesi, hantavirus prevalansının belirlenmesi ve olası salgın bölgelerinin öngörülebilmesi konusunda önemli veriler sunmaktadır.

Hantavirusların pek çok alt tipi bulunmakta ve bunlardan 22 tanesinin klinik bulgulara neden olabileceği bildirilmektedir³. Bu alt tiplerden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) viruslarının taşıyıcısı olarak bilinen *Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus*, *Apodemus agrarius*, *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus* türlerinden kemiriciler, ülkemizde de yayılım göstermektedir⁴⁻⁸. Türkiye'de hantavirusların yaban hayatındaki kemiricilerdeki varlığı, ilk kez 2004 yılında yayınlanmış bir saha çalışmasında bildirilmiştir⁹. İnsanlardaki RSKA olguları ise ilk kez, 2009 yılında Zonguldak-Bartın bölgesinden rapor edilmiştir^{10,11}. 2009 yılından sonra farklı bölgelerde yapılan

saha çalışmalarında hem kemiricilerde hem de RSKA şüphesi olan olgularda hantavirus enfeksiyonları doğrulanmıştır¹²⁻¹⁶.

Eski Dünya hantaviruslarına karşı yaşamları boyunca antikor taşıyan kemiricilerin, serolojik olarak taranmasını ve sahada hızlı sonuç elde edilmesini sağlayacak ticari bir ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, insan serumlarının taranması için üretilmiş olan ticari enzim temelli immünolojik yöntem (enzyme immunoassay; ELISA) ve immüno blot antijenlerinin, kemirici örneklerinde tarama yapılabilmesi için uygun hale getirilmesi ve optimizasyonu amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun onayı (05.06.2009 ve 22.07.2011 tarih ve 41/2009 nolu karar) ile gerçekleştirildi.

Kullanılan Örnekler

Optimizasyon çalışmaları sırasında, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK)'ndan temin edilen, biri DOBV diğeri PUUV ile enfekte 2 kemiriciye (*Apodemus flavicollis* ve *Myodes glareolus* türlerinden) ve negatif oldukları bilinen 17 kemiriciye (*Microtus spp.*, *Apodemus mystacinus*, *Apodemus flavicollis*, *Mus macedonicus*, *Myodes glareolus* türlerinden) ait serum örnekleri kullanıldı. Optimize edilen yöntemin test edilmesi için, Kırklareli bölgesinden "Sherman" tipi tuzak kapanlar ile yakalanan, *Apodemus flavicollis* (n= 49), *Apodemus sylvaticus* (n= 4), *Apodemus agrarius* (n= 16) ve *Microtus guentheri* (n= 15) türlerinden 84 adet kemiriciden alınan serum örnekleri kullanıldı. Kemiricilerin türleri, Krystufek ve Vohralik'in^{7,8} 2005 ve 2009 yıllarında bildirdiği tür anahtarına göre fenotipik özellikleri üzerinden tanımlandı.

ELISA Yönteminin Optimizasyonu

Hantavirusa karşı antikor varlığının belirlenmesi için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı, Anti-Hantavirus Pool ELISA (Euroimmun, Almanya) kitleri kullanıldı. Prosedürün kemirici serumlarına göre optimize edilmesi için farklı serum ve konjugat dilüsyonları sınanırken, inkübasyon süresi, yıkama sayısı ve kullanılan konjugata uygun substrat seçimi için üretici firmanın protokolü uygulandı.

Optimal serum konsantrasyonunun belirlenmesi için, THSK'dan temin edilen, pozitif ve negatif kontrol örnekleri 1/50, 1/100 ve 1/200 oranlarında fosfatlı tampon (PBS) ile seyreltilerek kullanıldı. Optimal konjugat konsantrasyonunun belirlenmesi için ise "horseradish" peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı (Millipore, ABD) 1/10.000, 1/20.000 ve 1/40.000 oranlarında PBS ile seyreltilerek kullanıldı.

Her bir kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş serum örneği eklendi ve her serum örneği için çift kuyucuk kullanıldı. Seyreltilmiş serum örneği eklenen plak, 37°C'de bir saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile üçer kez yıkandı. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanıldı ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, tamamen boşaltıldı. Yıkama sonrasında kuyucuklara, 1/10.000, 1/20.000 ve 1/40.000

oranlarında PBS ile seyreltilmiş HRP enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından 100 µL eklendi ve 37°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra, yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit (TMB/H₂O₂) kromojen/substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında substrat solüsyonunun üzerine 100 µL 0.5 M sülfirik asit (H₂SO₄) eklenerek, tepkime durduruldu ve 30 dakika içerisinde örneklerin optik dansiteleri (OD), mikropalak okuyucuda (Thermo Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçüldü.

ELISA yönteminde eşik değerinin belirlenmesi

ELISA yöntemi ile örneklerin taranması sırasında, THSK'dan temin edilen pozitif kontrol örnekleri kullanıldı. *Microtus spp.*, *Apodemus mystacinus*, *Apodemus flavicollis*, *Mus macedonicus*, *Myodes glareolus* türlerinden 16 adet kemiriciye ait negatif kontrol örnekleri, optimize edilen ELISA yöntemi ile iki farklı günde tarandı. Optimize edilen yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü, örneklerin OD değerlerinin ortalamaları ($\bar{x}$) ve ortalamaların 3, 4, 5 ve 6 standart sapma (S) değerleri için hesaplandı. Eşik değeri, istatistiksel verilere dayanarak belirlendi.

İmmünoblot Yönteminin Optimizasyonu

Taranan örneklerin doğrulanması ve antikor varlığının hantavirusun hangi alt tipine karşı olduğunun belirlenmesi için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş Euroline Anti-Hanta Profile 1 şeritleri (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Prosedürün kemirici serumlarına göre optimize edilmesi için farklı serum ve konjugat dilüsyonları sınanırken, inkübasyon süresi, yıkama sayısı ve kullanılan konjugata uygun substrat seçimi için üretici firmanın protokolü uygulandı.

Optimal serum konsantrasyonunun belirlenmesinde, 1/50 ve 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen negatif kontrol örnekleri, optimal konjugat dilüsyonlarının belirlenmesinde ise 1/5.000 ve 1/10.000 oranlarında 1x genel tampon ile seyreltilen alkalen fosfataz (AP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı (Santa Cruz Biotechnology, ABD) kullanıldı.

İnkübasyon tepsisine yerleştirilen şeritler, 1.5 ml bloklama tamponu (Euroimmun, Almanya) içerisinde 15 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International, ABD) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında sıvı aspire edildi ve şerit üzerine 1.5 ml 1/50 ve 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu (Euroimmun, Almanya) ile seyreltilen negatif BALB/c kemiricilere ait serumlar eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında serum örnekleri aspire edildi ve üçer kez beşer dakika 1.5 ml 1x dilüsyon tamponu içerisinde çalkalayıcıda inkübe edilerek, yıkandı. Yıkama sonrasında 1/5.000 ve 1/10.000 oranlarında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen AP enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından 1.5 ml eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında konjugat aspire edildi ve yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında her bir şerit üzerine 1.5 ml NBT/BCIP (nitrobluetetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklenerek, 10 dakika oda sıcaklığında çalka-

layıcıda inkübe edildi. Substrat solüsyonu aspire edildikten sonra her bir şerit, üçer kez birer dakika distile su ile yıkandı ve kuruduktan sonra şerit üzerindeki bantların yoğunluğu değerlendirildi (Şekil 1A).

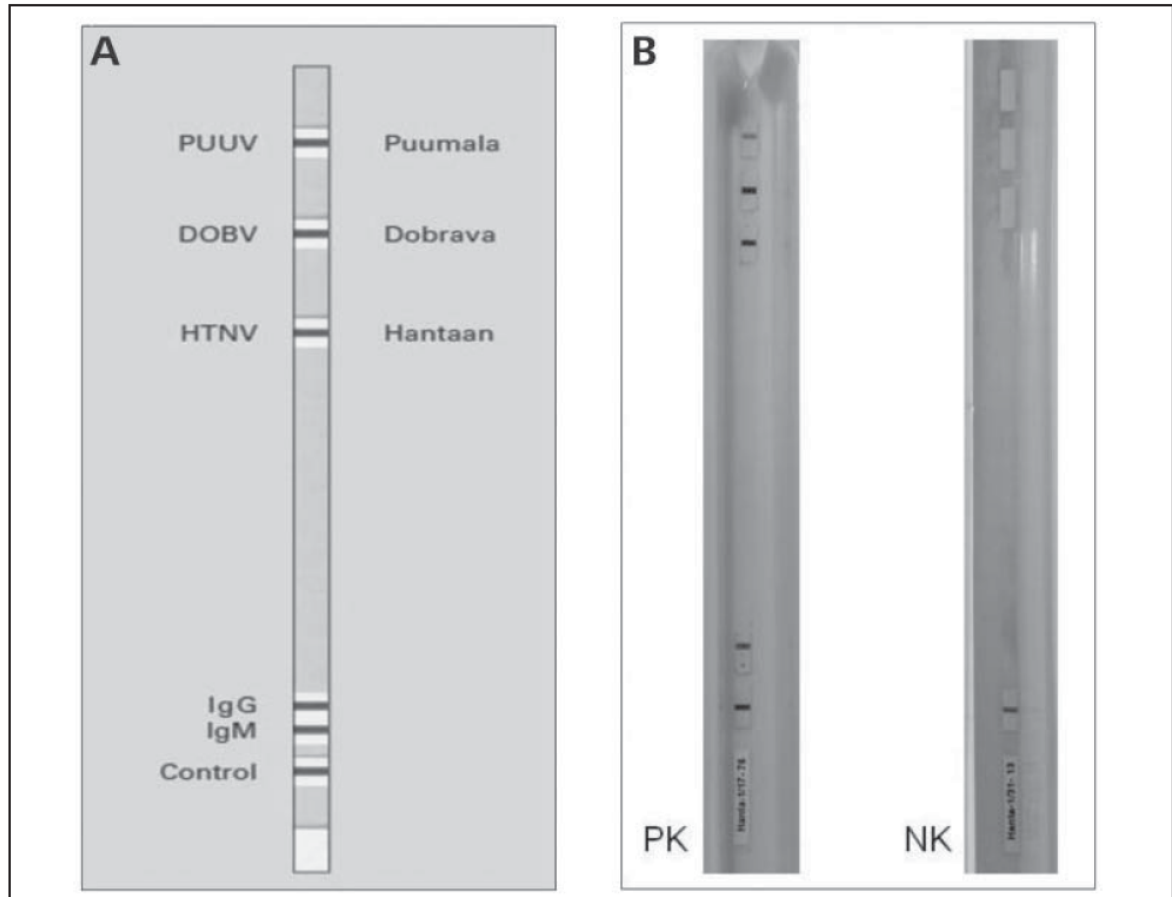
İstatistiksel Analiz

Optimize edilen ELISA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü, kemirici serumlarının taranması sırasında belirlenen her bir standart sapma değeri için hesaplandı. Kırklareli bölgesinden toplanan kemiricilere ait veriler, SPSS 17.0 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve belirlenen eşik değerinin doğruluğu, "Receiver Operating Characteristic" (ROC) analizi ile sınıandı.

BULGULAR

ELISA Optimizasyonu

Pozitif ve negatif kontrol örneklerinin OD değerleri açısından birbirlerinden en belirgin şekilde ayrıldıkları dilüsyonlar olan 1/50 serum dilüsyonu ve 1/10.000 konjugat dilüsyonu, optimal değerler olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. (A) HTNV, DOBV ve PUUV'e karşı antikor varlığında immünoelot şeridinin temsili görünümü. **(B)** Pozitif (PK) ve negatif (NK) kontrol örneklerinin, optimal serum (1/100) ve konjugat (1/5.000) dilüsyonu ile inkübasyonu sonrası bant yoğunlukları.

Daha önce yapılan saha çalışmalarında yakalanan 16 negatif kemiriciye ait serum örneklerinin $\bar{x} + 6S$ 'ye denk gelen 0.325 OD değeri, eşik değer olarak kabul edilmiş ve bu değerin altı negatif, üstü ise pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo I).

Kırklareli bölgesinden toplanan 84 kemiriciye ait serum örnekleri, optimize edilen yöntemle taranmış ve belirlenen eşik değerine göre bunların 22'sinde (%26.2) hantavirusa karşı antikor varlığı saptanmıştır. Bu kemiricilerden 14'ü *A. flavicollis*, 4'ü *A. agrarius*, 3'ü *M. guentheri* ve 1'i de *A. sylvaticus* türlerine aittir.

İmmünoelot Optimizasyonu

Antijen emdirilmiş şeritlerin üzerindeki bantların en yoğun olarak gözlemlendiği 1/100 serum dilüsyonu ve 1/5.000 konjugat dilüsyonu, optimal değerler olarak belirlenmiştir (Şekil 1B).

Optimize ELISA yöntemi ile pozitiflik saptanan Kırklareli bölgesi kemiricilerine ait serum örnekleri, optimize immünoelot yöntemi ile de doğrulanmıştır. Optimize ELISA yöntemi ile pozitiflik saptanan *A. flavicollis* türünden iki kemiriciye ait serum miktarı yetersiz olduğundan, immünoelot testi uygulanamamıştır. Dolayısıyla 20 örnek test edilmiş ve 17'sinde DOBV pozitifliği saptanmıştır. Bu kemiricilerden 11'i *A. flavicollis*, 3'ü *A. agrarius*, 2'si *M. guentheri* ve 1'i de *A. sylvaticus* türlerine aittir.

Tablo I. Ortalamaya eklenen her bir S için duyarlılık ve özgüllük değerleri				
$\bar{x} + 3S$ (OD 0.187)				
		İmmünoelot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %82
		+	-	
ELISA				
	+	17	12	
	-	0	53	
$\bar{x} + 4S$ (OD 0.233)				
		İmmünoelot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %91
		+	-	
ELISA				
	+	17	6	
	-	0	59	
$\bar{x} + 5S$ (OD 0.279)				
		İmmünoelot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %94
		+	-	
ELISA				
	+	17	4	
	-	0	61	
$\bar{x} + 6S$ (OD 0.325)				
		İmmünoelot		Duyarlılık: %100 Özgüllük: %95
		+	-	
ELISA				
	+	17	3	
	-	0	62	

İstatistiksel Değerlendirme

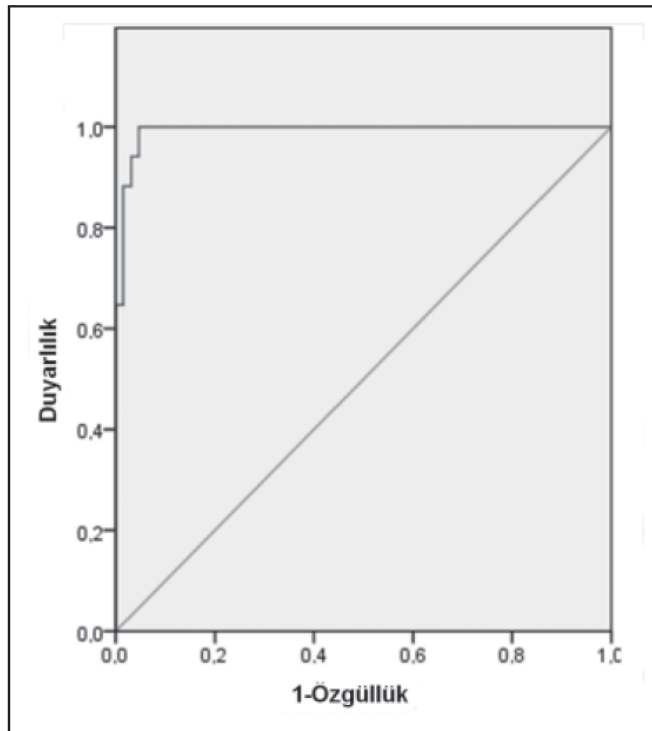
Optimize edilen ELISA yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü, kemirici serumlarının taranması sırasında belirlenen her bir standart sapma değeri için hesaplanmıştır (Tablo I).

ROC analizi ile duyarlılık ve özgüllüğün en yüksek olduğu eşik değeri, 0.326 olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Elde edilen bu değer, daha önce belirlenen eşik değeri ile uyumludur.

TARTIŞMA

Hantavirus enfeksiyonları çok büyük sıklıkla yaban hayatındaki enfekte kemiricilerin dışkı, idrar, salya gibi çıkartılarında bulunan virusların aerosoller aracılığı ile solunum yolundan alınması sonucu insanlara bulaşmaktadır¹⁷. Bu nedenle insanlardaki hantavirus enfeksiyonları, aynı bölgede bulunan kemirici popülasyonlarındaki hantavirus prevalansı ile doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla kemirici popülasyonlarının hantavirus enfeksiyonları açısından taranması, olası salgınların önceden öngörülebilmesi ya da var olan salgınların yaygınlığının tanımlanması için önemlidir. Her ne kadar kemiricilerde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile enfeksiyon tanısının konulabilmesi mümkünse de, her enfekte kemiricide PCR ile pozitif sonuç saptanamayabilmektedir¹⁸. Oysa seropozitifliğin saptanması, hantavirus ile enfekte olduğunda, kronik olarak virusu taşıyan kemiricilerin yaygınlığının doğru bir şekilde belirlenebilmesi için kullanışlı bir yöntem olarak görülmektedir. Bu nedenle bu çalışma ile, hantavirus antikorları açısından kemiricilerin taranmasında kullanılabilecek bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

İmmünofloresans testleri (IFA), hantavirus enfeksiyonlarının tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biridir¹⁹. Ancak IFA'nın üretimi sırasında kullanılan enfekte hücreler, hücre kültürü ortamında üretildiğinden ve bulaş riski yüksek olduğundan, biyogüvenlik düzeyi-3 laboratuvarlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle rekombinant DNA teknikleri ile üretilen hantavirus antijenlerinin kullanıldığı yöntemler tercih edilmektedir²⁰. İnsanda hantavirus antijenlerine karşı oluşan antikorların saptanmasında kullanılan ticari ürünlerin varlığına rağmen, kemiriciler için kullanılabilecek optimize edilmiş ürünler kolay bulunmamaktadır. Nitekim, kemirici örneklerinin özellikle DOBV ve PUUV gibi Avrasya'da sık görülen RSKA



Şekil 2. Kırklareli bölgesinde yakalanan kemirici serumlarının OD değerlerine ait ROC eğrisi (eğrinin altında kalan alan 0.992).

etkeni hantaviruslar açısından taranması amacıyla üretilen herhangi bir ticari serolojik kit mevcut değildir. Ek olarak, ülkemizde de enfeksiyonlara neden olduğu bildirilen DOBV ve PUUV'nin aynı anda değerlendirilmesine yönelik bir optimizasyon çalışmasına da literatürde rastlanamamıştır.

Hantavirus tiplerinin antijenik olarak birbirlerinden farklı olması, aynı anda birden fazla hantavirus tipine karşı antikor varlığının araştırılmasını sağlayan yöntemlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu yöntemler, aynı anda çok sayıda kemirici örneğinin değerlendirilmesini ve hızlı sonuç elde edilmesini sağlamaktadır. Sanada ve arkadaşlarının²¹ yaptığı çalışmada, Amur (AMRV), Hokkaido (HOKV) ve Sin Nombre (SNV) hantavirus rekombinant nükleokapsid antijenleri kullanılarak optimize edilen ELISA yönteminin, sahadan yakalanan kemiricilerde ve bağışıklanmış laboratuvar hayvanlarında virusa karşı antikor varlığını saptayabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, kemiricilerde PUUV'e özgül IgG antikorlarını saptayabilen immünokromatografik bir yöntem geliştirilmiştir; ancak bu yöntem yalnızca *Arvicolinae* ailesinden olan kemirici türlerinde PUUV araştırılmasına yöneliktir^{22,23}. Yee ve arkadaşları²⁴ tarafından yapılan çalışmada ise, arazi çalışmaları sırasında minimum ekipman kullanılarak uygulanabilecek bir immünoelot yöntemi geliştirilmiştir²⁴. Yöntemin Western Blot ve ters transkripsiyon PCR sonuçları ile oldukça uyumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. İmmünoelot şeritleri, HPS etkenlerinden biri olarak bilinen SNV rekombinant nükleokapsid antijeni ile kaplı olduğundan, bu etkenin değerlendirilmesi için uygundur²⁴. Schountz ve arkadaşları²⁵ da, SNV'ye karşı antikor varlığını araştırmak üzere kullanılacak, arazi çalışmaları sırasında hızlı sonuç elde edilmesini sağlayan bir ELISA yöntemi oluşturmuşlardır. Yöntem, yaklaşık bir saatte sonuç vermesi ve tüm memeli türleri için kullanılabilir olması nedeniyle avantaj sağlamaktadır²⁵.

Optimize edilen ELISA ve immünoelot yöntemlerinin, Türkiye'de yapılan çalışmalarla da varlığı gösterilmiş olan DOBV ve PUUV'e özgül antikorların saptanmasında kullanılabilir olması, çalışmanın kısıtlılığıdır⁹⁻¹⁶. Bu nedenle, optimize edilen bu yöntemler, hantavirusların yalnızca bu tipleri için kullanılabilir olacaktır. Taşıyıcısı olan kemirici türünün Türkiye'de yayılım göstermesi sebebiyle, görülmesi beklenen hantavirus tiplerinden SAAV, genetik açıdan DOBV ile oldukça benzerdir^{26,27}. Ancak bu iki hantavirus tipi serolojik yöntemlerle birbirlerinden ayırt edilemediğinden, bu çalışma sırasında optimize edilen ELISA ve immünoelot yöntemleri de yetersiz kalacaktır.

Çalışmamızda, optimize edilen ELISA yöntemi ile pozitif olarak saptandığı halde, optimize immünoelot yöntemi ile negatif olarak saptanan örnekler bulunmaktadır. Bunun nedeni; genetik açıdan birbirleriyle benzer olan ve aynı kemirici ailesi ile taşınan enfeksiyon etkenlerinin çapraz reaksiyona neden olabilmesi, ELISA ile immünoelot yöntemi arasındaki analitik duyarlılık farkı veya enfeksiyon etkeninin immünoelot şeritlerinde antijeni bulunan hantavirus tiplerinin farklı alt tiplerine özgül olması gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Bu nedenle yöntemin daha çok sayıda ve farklı türlerde kemiricilere ait serum örnekleri kullanılarak değerlendirilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir.

Kırklareli bölgesinde yakalanan ve hantavirusa karşı antikor varlığı her iki yöntemle de test edilen 82 kemiriciden 17'sinde (%20.7) DOBV seropozitifliği saptanmıştır. Bu çalış-

ma ile Kırklareli bölgesindeki kemiricilerde ilk defa hantavirus seropozitifliği gösterilmiştir. Çalışmamızda optimize edilen yöntem, Eski Dünya hantaviruslarının kemiricilerde neden olduğu enfeksiyonları saptamayı hedef alan, hızlı sonuç verebilecek ve aynı anda çok sayıda örneğin çalışılmasına olanak sağlayabilecek bir testtir. Yöntem, kemiricilerde hantaviral enfeksiyonların varlığı açısından değerlendirme yapmayı sağlarken, serotiplendirme amacıyla kullanılmamaktadır. Bu çalışmada olduğu gibi, farklı türden kemiricilere yönelik olarak optimize edilecek serolojik yöntemler, özellikle alanda aktif izlem ve denetleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi bakımından pratik öneme sahip olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mir MA. Hantaviruses. Clin Lab Med 2010; 30(1): 67-91.
2. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. Lancet Infect Dis 2003; 3(10): 653-61.
3. Klein SL, Calisher CH. Emergence and persistence of hantaviruses, pp: 217-52. In: Childs JE, Mackenzie JS, Richt J (eds), Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission. 2007, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
4. Kefelioglu H, Tez C, Gündüz İ. The taxonomy and distribution of *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Mammalia: Rodentia) in the European part of Turkey. Turk J Zool 2003; 27(2): 141-6.
5. Yigit N, Colak E, Sozen M, Karatas A. Türkiye'nin Kemiricileri, s: 1-111. Demirsoy A (ed), Rodents of Türkiye: Türkiye'nin Kemiricileri. 2006, Meteksan, Ankara.
6. Krystufek B, Vohralik V. Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: Rodentia) in Anatolia. Zool Middle East 2007; 42(1): 25-36.
7. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia I: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae. 2005. Science and Research Centre of the Republic of Slovenia, Koper, Slovenia.
8. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. 2009. Science and Research Centre of the Republic of Slovenia, Koper, Slovenia.
9. Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, et al. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. J Wildl Dis 2006; 42(3): 672-6.
10. Ertek M, Buzgan T; Refik Saydam National Public Health Agency; Ministry of Health, Ankara, Turkey. An outbreak caused by hantavirus in the Black Sea region of Turkey, January-May 2009. Euro Surveill 2009; 14(20). pii: 19214.
11. Çelebi G, Pişkin N, Öktem MA, et al. Bir salgının anatomisi. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 25-29 Mart 2009, Antalya. Kongre Kitabı, s: 163, SS-11.
12. Kaya S, Çağlayık SY, Uyar Y, et al. Can hantavirus infections be predicted on admission to hospital? J Med Virol 2012; 84(11): 1790-6.
13. Sarıgözel N, Hofmann J, Canpolat AT, et al. Dobrava hantavirus infection complicated by panhypopituitarism, Istanbul, Turkey, 2010. Emerg Infect Dis 2012; 18(7): 1180-3.
14. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, et al. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. Emerg Infect Dis 2011; 17(2): 303-4.
15. Gozalan A, Kalaycioglu H, Uyar Y, et al. Human puumala and dobrava hantavirus infections in the Black Sea region of Turkey: a cross-sectional study. Vector Borne Zoonotic Dis 2013; 13(2): 111-8.
16. Oktem IM, Uyar Y, Dincer E, et al. Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. Emerg Infect Dis 2014; 20(1): 121-5.
17. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. Lancet Infect Dis 2003; 3(10): 653-61.

18. Ryou J, Lee HI, Yoo YJ, et al. Prevalence of hantavirus infection in wild rodents from five provinces in Korea, 2007. *J Wildl Dis* 2011; 47(2): 427-32.
19. Vaheri A, Vapalahti O, Plyusnin A. How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores. *Rev Med Virol* 2008; 18(4): 277-88.
20. Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(2): 412-41.
21. Sanada T, Kariwa H, Saasa N, et al. Development of a diagnostic method applicable to various serotypes of hantavirus infection in rodents. *J Vet Med Sci* 2012; 74(9): 1237-42.
22. Hujakka H, Koistinen V, Eerikainen P, et al. New immunochromatographic rapid test for diagnosis of acute Puumala virus infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2146-50.
23. Sirola H, Kallio ERK, Koistinen V, et al. Rapid field test for detection of hantavirus antibodies in rodents. *Epidemiol Infect* 2004; 132(3): 549-53.
24. Yee J, Wortman IA, Nofchissey RA, et al. Rapid and simple method for screening wild rodents for antibodies to Sin Nombre hantavirus. *J Wildl Dis* 2003; 39(2): 271-7.
25. Schountz T, Calisher CH, Richens TR, et al. Rapid field immunoassay for detecting antibody to Sin Nombre virus in deer mice. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(10): 1604-7.
26. Plyusnin A, Vaheri A, Lundkvist A. Genetic interaction between Dobrava and Saaremaa hantaviruses: now or millions of years ago? *J Virol* 2003; 77(12): 7157-8.
27. Sjölander KB, Golovljova I, Vasilenko V, et al. Serological divergence of Dobrava and Saaremaa hantaviruses: evidence for two distinct serotypes. *Epidemiol Infect* 2002; 128(1): 99-103.

Türkiye'nin Orta ve Güney Anadolu İllerindeki Yabani Kemiricilerde Hantavirüs Enfeksiyonlarının Serolojik Olarak Taranması

Ceylan POLAT*, Ferhat MATUR**, Mustafa SÖZEN***, Mehmet Ali ÖKTEM*

*Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir

***Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak

ÖZ

Amaç: Hantavirüsler, enfekte kemirici ve bazı böcekçilere ait sekresyonlardaki viral partiküllerin solunması yolu ile insanlara bulaşmaktadır. Renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) etkeni olan Hantavirüs alt tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) virüslerin taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türleri ülkemizde de yayılım göstermektedir. Hantavirüs enfeksiyonlarında grip benzeri bulguların görülmesi ve hastalığın hızla ilerlemesi, erken tanı konulmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle saha çalışmaları ile alandaki Hantavirüs prevalansı belirlenmekte ve olası salgın bölgeleri öngörülerek, bölgedeki halk ve yetkili kişiler önceden uyarılabilmektedir. Bu çalışmada, saha araştırması ile bölge taraması yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma ile Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay illerinden yakalanan *Apodemus* spp., *Microtus* spp. ve *Mus* spp. türlerinden 193 kemiriciye ait serum örnekleri serolojik olarak tarandı.

Bulgular: Bu kemiricilerde Hantavirüse özgül antikor varlığı saptanmadı.

Sonuç: Türkiye’de Hantavirüs açısından taranmamış pek çok bölge bulunmaktadır. Yapılacak yeni çalışmalar ile diğer bölgelerde Hantavirüs prevalansının ve bölgelerin risk durumunun belirlenmesi önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Hantavirüs, kemirici, seroloji

ABSTRACT

The Serological Screening of Wild Rodents for Hantavirus Infections in the Middle and Southern Anatolia Region of Turkey

Objective: Hantaviruses infect humans via inhalation of the viral particles in the secretions of some rodents and insectivores. The rodent species which known as reservoirs of Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) and Seoul (SEOV) viruses of Hantavirus subtypes which cause hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) are also found in Turkey. Early diagnosis of Hantavirus infections is difficult, because of the flu-like symptoms and rapid progression of the disease. However, the prevalence of hantavirus seropositivity in rodents from the field works could predict and warn authorities for possible human outbreaks. In this study field research and regional screening were aimed.

Material and Methods: In the present study serum samples of 193 rodents of *Apodemus* spp., *Microtus* spp. and *Mus* spp. collected from Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay Provinces were screened using serological methods.

Results: The presence of antibody against Hantaviruses were not detected in these rodents.

Conclusion: There are a large number of geographical areas in Turkey that have not screened for hantaviruses. Determination of Hantavirus prevalence and the risk status of other regions in further studies to be performed conveys importance.

Keywords: Hantavirus, rodent, serology

GİRİŞ

Hantavirüs cinsi, *Bunyaviridae* ailesindeki beş

cinsten biri olup, “International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)” 2015 yılı verilerine göre 24 tür içermektedir. Hantavirüsler, tek

Alındığı tarih: 19.01.2017

Kabul tarihi: 04.03.2017

Yazışma adresi: Ceylan Polat, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir

e-posta: ceylanpolat88@gmail.com

iplikli, negatif polariteli, üç segmentli genoma sahip zarflı RNA virüsleridir. Renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) ve hantavirüs pulmoner sendrom (HPS) gibi klinik tablolar oluşturmaları nedeniyle tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hantavirüsler, kemiriciler ve bazı böcekçiller ile taşınmaktadır⁽¹⁾. İnsanlara bulaş, enfekte kemirici ve böcekçillere ait sekresyonlardaki (dışkı, idrar, tükürük vb.) viral partiküllerin solunması yolu ile gerçekleşmektedir⁽¹⁾. Her bir hantavirüs tipi, belli bir kemirici türü ile taşındığından, etkenlerin yayılım alanları da bu kemiricilerin yayılım alanları ile sınırlı kalmaktadır⁽¹⁾. Bu nedenle RSKA olguları Avrasya'da görülürken, HPS olguları Amerika'da görülmektedir⁽²⁾.

RSKA etkeni olan hantavirüs alt tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) virüslerin taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türlerinden *Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus*, *Apodemus agrarius*, *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus* ülkemizde de yayılım göstermektedir⁽³⁻⁶⁾. Şimdiye kadar hem RSKA şüphesi olan hastalara ait serum örnekleri ile hem de kemiricilere ait doku ve serum örnekleri ile yapılan çalışmalarda, Hantavirüs enfeksiyonları gösterilmiştir⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Hantavirüs enfeksiyonlarında, enfeksiyona neden olan hantavirüs tipine bağlı olarak, yüksek mortalite oranları görülebilmektedir. Bu nedenle erken tanı koyulması önem taşımaktadır. Ancak hastalığın grip benzeri bulgular vermesi, erken dönemde tanı koyulmasını güçleştirmektedir. Ayrıca virüse karşı doğrudan etkili bir antiviral ajan da bulunmadığından enfeksiyondan korunma daha da önem kazanmaktadır. Yapılan saha çalışmaları ile yaban yaşamındaki kemirici popülasyonlarında enfeksiyonun takibi sağlanmakta, alandaki Hantavirüs prevalansı belirlenmekte ve olası salgın bölgeleri öngörülebilmektedir. Ancak kemiricilere ait örneklerin

DOBV ve PUUV gibi Avrasya'da sık görülen ve ülkemizden de bildirilen RSKA etkenleri açısından serolojik olarak taranmasında kullanılabilecek bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle insan serumlarının taranması için üretilmiş, ticari enzim temelli immünolojik yöntem (ELISA) ve immunoblot testleri, Polat ve ark.^(11,12) tarafından kemirici örneklerinde hantavirüse özgül antikorların taranmasına uygun olarak optimize edilmiştir.

Bu çalışma ile Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin, Hatay illerinden yakalanan, farklı türlerden 193 kemiriciye ait serum örnekleri, optimize edilen ELISA testi ile^(11,12) taranmış ve immunoblot testi ile ülkemizde de görülen PUUV, DOBV ve Asya'da RSKA olgularına neden olan Hantaan virüse (HTNV) özgül antikor varlığı açısından değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun onayı (19.08.2014 tarih ve 15/2014 no'lu karar) ile gerçekleştirildi.

Kullanılan Örnekler: Kemiriciler, hayvanları canlı olarak yakalamayı sağlayan "Sherman" tipi kapan tuzaklar ile 2015-2016 yıllarında Muğla, Antalya, Niğde, Aksaray, Konya, Karaman, Mersin ve Hatay illerinde yapılan arazi çalışmaları sırasında toplandı. Kemiricilerin tür tayinleri, arazi çalışmaları sırasında fenotipik olarak yapıldı. Çalışma sırasında kemiricilerin serum örnekleri kullanıldı. Pozitif (DOBV ve PUUV) ve negatif kontrol olarak kullanılan kemirici serum örnekleri, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan temin edildi.

Kemirici Serumlarının ELISA ile Taranması: Hantavirüse karşı antikor varlığının belirlenmesi için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı ELISA plakları

(Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Örnekler, Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından kemirici serumlarına göre optimize edilen prosedür uygulanarak tarandı.

Her bir kuyucuğa 100 µL 1/50 oranında fosfatlı tampon (PBS) ile seyreltilen serum örneği eklendi ve her bir örnek için çift kuyucuk kullanıldı. Plak, 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra boşaltılan kuyucuklar, deterjan içeren yıkama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile üçer kez yıkandı. Yıkama sırasında her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanıldı ve 30 saniye hafifçe çalkalandı. Yıkama sonrasında boşaltılan kuyucuklara, 100 µL 1/10.000 oranında PBS ile seyreltilmiş horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore, ABD) eklendi. Plak, 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra yukarıda anlatılan şekilde yine yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µL 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit (TMB/H₂O₂) kromojen/substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 100 µL 0.5 M sülfirik asit (H₂SO₄) eklendi. Örneklerin optik dansiteleri (OD), 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçüldü.

Kemirici Serumlarının İmmunoblot ile Doğrulanması: Hantavirüse karşı antikor varlığının doğrulanması için, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş immunoblot şeritleri (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. ELISA sonuçları, Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından kemirici serumlarına göre optimize edilen immunoblot prosedürü uygulanarak doğrulandı. İmmunoblot şeritleri, inkübasyon tepsisine yerleştirilip, 1.5 ml blokama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında inkübasyon tepsisinde bulunan sıvı aspire edildikten sonra, her bir örneğe ait şerit üzerine 1.5

ml 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu (Euroimmun, Almanya) ile seyreltilen kemirici serumu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Serum örnekleri aspire edildikten sonra üçer kez beşer dakika 1.5 ml 1x dilüsyon tamponu ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında 1.5 ml 1/5.000 oranında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen alkalen fosfataz (AP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Santa Cruz Biotechnology, ABD) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yukarıda anlatılan şekilde yeniden yıkama yapıldı. Her bir şerit üzerine 1.5 ml NBT/BCIP (nitrobluetetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir şerit, üçer kez birer dakika distile su ile yıkandı. İmmunoblot şeritleri üzerindeki bant yoğunlukları, şeritler kuruduktan sonra değerlendirildi.

BULGULAR

Yakalanan Kemiriciler: Çalışma sırasında yakalanan 193 kemiriciden 89'u *Apodemus* spp. (%46.1), 55'i *Microtus* spp. (%28.5) ve 49'u *Mus* spp. (%25.4) olarak belirlendi.

Kemirici Serumlarının Serolojik Test Sonuçları: Polat ve ark.⁽¹²⁾ tarafından optimize edilen prosedüre göre OD değeri 0.326 ve üzerinde olan örnekler, pozitif olarak değerlendirildi. Sekiz ilden toplanan 193 kemiriciden 33'ünde (%17.1) hantavirüs açısından düşük seropozitiflik (saptanan en düşük OD değeri 0.326 ve en yüksek OD değeri 0.846) saptandı. Bu kemiricilerden 18'i (% 54.5) *Mus* spp. ve 15'i (%45.5) *Apodemus* spp. türlerindendi.

Seropozitif olarak belirlenen kemiricilere ait serum örneklerinin tümü, immunoblot testi ile negatif olarak saptandı.

TARTIŞMA

Hantavirüs enfeksiyonları, enfekte kemirici ve böcekçillerin sekresyonlarındaki viral partiküllerin solunması ile insanlara bulaşmaktadır. Kemiricilerde kronik bir enfeksiyona neden olan virüs, viral partikülleri içeren sekresyonlar ile ömür boyu çevreye saçılırken, enfekte kişilerde akut enfeksiyon sonucunda RSKA ve HPS gibi mortalitesi yüksek klinik tablolara neden olabilmektedir. Bu nedenle Hantavirüs enfeksiyonlarından korunabilmek için, alandaki Hantavirüs prevalansının ve olası salgın bölgelerinin belirlenmesi önem taşımaktadır⁽¹⁾.

Hantavirüslerin Türkiye'deki yaban yaşamı kemiricilerindeki varlığı ilk kez 2004 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir⁽⁷⁾. Türkiye'deki ilk Hantavirüs salgını ise 2009 yılında Batı Karadeniz bölgesindeki RSKA olgular ile bildirilmiştir^(8,9). Bu salgının ardından aynı bölgede gerçekleştirilen saha çalışmaları ile Türkiye'deki kemiricilerde ilk kez PUUV izolasyonu gerçekleştirilmiş ve DOBV varlığı gösterilmiştir⁽¹⁰⁾.

Kemiricilerin serolojik olarak taranabilmesini sağlayacak testlerin varlığı, saha çalışmaları sırasında yakalanan kemiricilerin hızlıca taranarak, birkaç saat içerisinde sonuç alınmasını ve elde edilen veriler ışığında saha çalışmasının yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Ancak Avrasya'da sık görülen ve ülkemizden de bildirilen RSKA etkenleri açısından kemiricilerin serolojik olarak taranmasında kullanılabilecek bir ticari ürün bulunmamaktadır. Bu nedenle, Polat ve ark.^(11,12) tarafından insan serumlarında Hantavirüse özgül antikor varlığının araştırılması amacıyla üretilmiş, ticari ELISA ve immunoblot testleri (Euroimmun, Almanya), kemirici örneklerinin taranabilmesi için optimize edilmiştir. Bu çalışmada da, kemirici serumlarının taranması için optimize edilmiş olan ELISA ve immunoblot yöntemleri

uygulanmıştır⁽¹²⁾.

Serolojik taraması yapılan 193 kemiricide hantavirüs antikor varlığı saptanamamıştır. Pozitif kontrol örneklerinde saptanan OD değerleri 1.000 ve üzerinde olduğundan, eşik OD değeri 0.326 olan ELISA testi ile 33 kemiricide (33/193) düşük düzeyde seropozitiflik (saptanan en düşük OD değeri 0.326 ve en yüksek OD değeri 0.846) saptanmıştır. Ancak immuno-blot yöntemi ile doğrulanamamıştır. Bunun nedeni, ELISA için belirlenen eşik değerinin taraması yapılan kemirici türleri için düşük kalmış olabileceğidir. Bu yüzden örnekler, yalnızca ELISA testi sonucuna göre negatif ya da pozitif olarak değerlendirilmemiş, altın standart olarak kabul edilen immunoblot testi de dikkate alınmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen kemiricilerin bir kısmının yakalandığı illerden olan Konya, Aksaray ve Hatay'dan RSKA olguları bildirilmiştir. Ancak bu illerden yakalanan kemiricilerde seropozitiflik saptanamamıştır. Bunun nedeni, hastaların başka illerde enfekte olduktan sonra Konya, Aksaray ve Hatay'daki hastanelere başvurmuş olmaları ya da örneklem alanın hastaların yaşadığı bölgeden farklı bir alan olması olabilir.

Türkiye'nin pek çok ilinde henüz Hantavirüs açısından saha çalışması yapılmamıştır. Güncel durum bilgisine sahip olmadan ve olguların görülebileceği riskli bölgeler belirlenmeden, Hantavirüs enfeksiyonlarından korunmanın sağlanabilmesi olası değildir. Bu nedenle, henüz tarama yapılmamış alanlarda da saha çalışmaları planlanması önem taşımaktadır.

Teşekkür

Çalışmada serolojik taramalarda laboratuvar işlemlerine katkıda bulunan Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğrencisi Mert

Erdin'e teşekkürlerimizi sunarız. Bu çalışma, Tübitak 1001 Araştırma Destek Programı tarafından desteklenen SBAG214S276 numaralı proje kapsamında yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O. Hantavirus infections Europe and their impact on public health. *Rev Med Virol* 2013; 23:35-49.
<https://doi.org/10.1002/rmv.1722>
2. Jonsson CB, Figueriedo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:412-41.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
3. Kefelioglu H, Tez C, Gündüz İ. The taxonomy and distribution of *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Mammalia: Rodentia) in the European Part of Turkey. *Türk J Zool* 2003; 27:141-6.
4. Yiğit N, Çolak E, Sözen M, Karataş A. Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Ankara: Meteksan Yayınevi, 2006.
5. Krystufek B, Vohralik V. Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: Rodentia) in Anatolia. *Zool Middle East* 2007; 42:25-36.
<https://doi.org/10.1080/09397140.2007.10638243>
6. Krystufek B, Vohralik V. Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. Slovenia: Koper, 2009.
7. Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, et al. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *J Wildl Dis* 2006; 42:672-6.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.3.672>
8. Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by Hantavirus in the Black Sea Region of Turkey, January-May 2009. *Euro Surveill* 2009; 14:pii:19214.
9. Celebi G, Piskin N, Öktem MA, ve ark. Bir salgının anatomisi. 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı; 25-29 Mart 2009; Antalya: Türkiye, 2009:163.
10. Oktem IM, Uyar Y, Dincer E, et al. Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:121-5.
<https://doi.org/10.3201/eid2001.121024>
11. Polat C, Oktem MA, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacıoglu H. Optimization of a commercial Hantavirus IgG enzyme immunoassay for human use to screen infection among wild rodents in Kırklareli, Turkey. "5th European Congress of Virology" Kongresi Kitabı; 11-14 Eylül 2013; Lyon: Fransa, 2013:193.
12. Polat C, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacıoglu H, Öktem MA. Yabani kemiricilerde Eski Dünya Hantavirüs IgG antikorlarının saptanması için ELISA ve immunoblot yöntemlerinin optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:245-55.
<https://doi.org/10.5578/mb.23161>

Dobrava hantavirus variants found in *Apodemus flavicollis* mice in Kırklareli Province, Turkey

Ceylan Polat¹  | Tarja Sironen² | Angelina Plyusnina² | Ahmet Karatas³ | Mustafa Sozen⁴ | Ferhat Matur⁴ | Olli Vapalahti² | I. Mehmet Ali Oktem¹ | Alexander Plyusnin²

¹Department of Medical Microbiology, Medical School, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey

²Department of Virology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

³Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Ömer Halisdemir University, Niğde, Turkey

⁴Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Bülent Ecevit University, Zonguldak, Turkey

Correspondence

Ceylan Polat, Department of Medical Microbiology, Medical School, Dokuz Eylül University, 35340 İzmir, Turkey.
Email: ceylanpolat88@gmail.com

Funding information

Federation of European Microbiological Societies FEMS Research Fellowship

Hantaviruses infect humans via inhalation of viral particles within secretions of infected rodents or rarely through direct contact with infected rodents. Determining the prevalence of hantavirus infections among rodent populations is of vital importance to obtain information on hantavirus-related cases and to predict possible outbreaks. We hypothesized that DOBV strains circulating in the Thrace Region in Turkey would be related to other Balkan DOBV strains. In this study, hantavirus infections in the rodent population of the Kırklareli-İğneada Region (north-western Turkey, near the Bulgarian border) were investigated. This region is of particular importance, as it is located in the south-eastern margin of the European continent and was used as an entrance point of Asian faunal elements into Europe. DOBV infection was detected in eight of 73 rodents; all were of the *Apodemus flavicollis* species. Partial sequences of the viral S-, M-, and L-genome segments were recovered and compared with previously reported DOBV sequences. The newly characterized Turkish strains were similar to other DOBV variants. Silent nucleotide mutations were dominant. The hantavirus prevalence in the İğneada region was similar to what has been reported in Greece and Bulgaria. For the first time, the M-segment sequences of DOBV from Turkey were recovered and genetic data of hantaviruses from Thrace region of Turkey were obtained.

KEYWORDS

DOBV, Hantavirus, phylogenetic analysis, rodent, Turkey, Zoonosis

1 | INTRODUCTION

Hantaviruses belong to the *Bunyaviridae* family and *Hantavirus* genus.¹ Enveloped virions have a negative-sense, single-stranded RNA genome consisting of S (small), M (medium), and L (large) segments.²

Hantaviruses are rodent-borne but are also carried by insectivores and bats. Several members of the Hantavirus genus cause infections in humans via inhalation of viral particles found within contaminated secretions of rodents (such as saliva, urine, or faeces).³ Generally, each member of the genus is carried by a specific host species. Hantaviruses are known to be the causative agent of two diseases, namely

haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), and hantavirus pulmonary syndrome (HPS). These diseases are a significant public health problem in Eurasia and the Americas⁴; following the distribution of hantavirus-carrying rodent species. HFRS is mainly observed in Eurasia while HPS mainly occurs in America.^{4,5}

In geographic areas where the hantavirus infections are rare, the diagnosis is very challenging due to nonspecific, flu-like symptoms.⁶ Prevention is important due to the lack of effective antivirals.⁴ Surveillance offers important data on the infection in wildlife and hantavirus prevalence and thus facilitates prediction of possible outbreaks.^{7–14}

The presence of hantaviruses in wild rodents in Turkey was reported for the first time in 2006.⁷ The first HFRS cases were reported from the Western Black Sea Region in 2009.¹⁵ Follow-up studies described more hantavirus infections in rodents⁸ and suspicious HFRS cases in humans in different regions of Turkey.^{16–19} Several rodent hosts have been identified to carry hantaviruses, namely *Apodemus flavicollis* (Dobrava-Belgrade virus [DOBV]), *Myodes glareolus* (Puumala virus [PUUV]), *Apodemus agrarius* (Saaremaa virus [SAAV]), *Microtus arvalis* (Tula virus [TULV]), and *Rattus norvegicus* (Seoul virus [SEOV]); these rodent species are all found in Turkey.^{20–23}

Apodemus flavicollis (the yellow-necked field mouse) is distributed throughout most of Europe, Turkey, Syria, Jordan, Israel, and Iran.²⁴ During the last glaciation, the Balkans and Turkey played an important role for *A. flavicollis* as refugia.²⁵ The yellow-necked field mouse population in the İğneada Region in Kırklareli Province-located in Turkish Thrace (neighboring Bulgaria)-, represents the most eastern margin of the European lineage in the Balkans. *A. flavicollis* in Thrace lives sympatrically with *A. sylvaticus* and *A. agrarius*.^{21,26}

In this study, we searched for hantavirus markers in wild rodents from the Kırklareli İğneada region, with the objective to map natural foci of infection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Samples

In July 2009, a total of 73 rodents were collected from the Kırklareli İğneada Region of Turkey located at the Bulgarian border; using

Sherman-type traps (H.P. Sherman Traps Inc.) (Figure 1). Live rodents were collected at five different locations using 100 Sherman-type traps for four trap-nights. Traps were set at 10-m intervals on the field. Rodents were sacrificed by cervical dislocation. Whole blood samples were collected by intracardiac intervention via a fine needle; followed by centrifugation at 3000 rpm at 4°C for 15 min to collect the serum. Lung and serum samples of all rodents were used in this study. Lung samples were preserved with a RNA stabilization solution (RNAlater, Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored at –80°C.

Study design and all experimental approaches were approved by Dokuz Eylül University, Local Ethical Committee of Animal Experiments (No: 41/2009).

2.2 | Enzyme immunoassay (EIA) and immunoblot assay (IBA)

The antigen-coated microplates of a commercially available enzyme immunoassay kit (Anti-Hantavirus Pool ELISA IgG, Euroimmun, Lübeck, Germany) was used in the optimization process of EIA for rodent serum. Similarly, immunoblot strips of an immunoblot assay (Hantavirus Profile 1 Euroline IgG, Euroimmun) were used for the optimization process of IB. The EIA microplates and IBA strips coated with Hantaan virus (HTNV), PUUV, and DOBV recombinant nucleocapsid antigens were used for the detection of antibodies in rodent sera. Positive and negative control serum samples were provided by the Public Health Institution of Turkey. The serum samples of 73 rodents were screened.²⁷

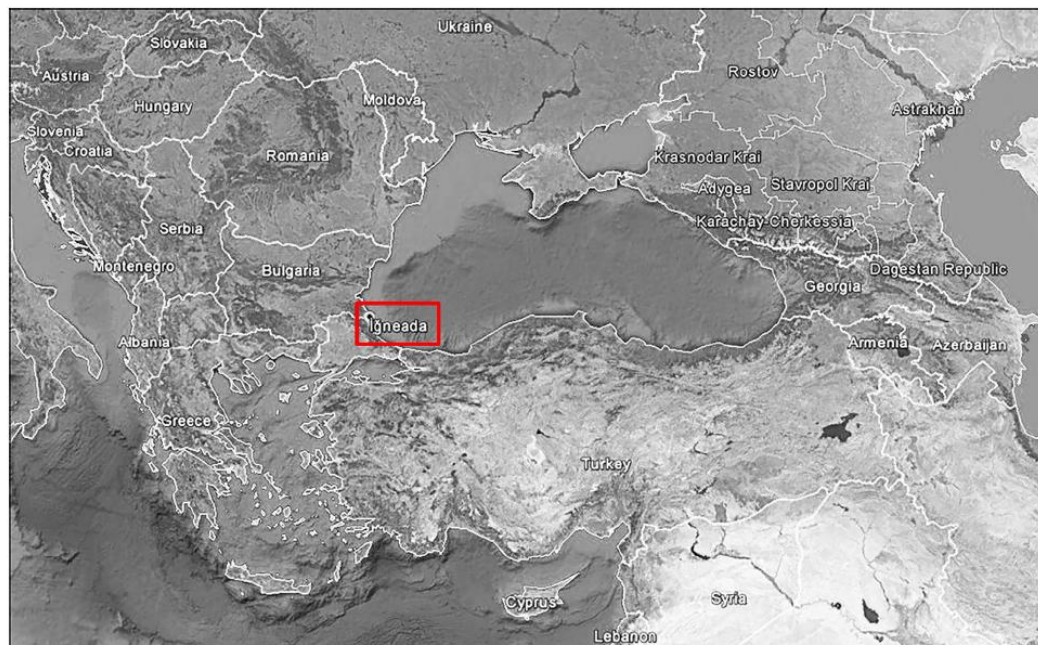


FIGURE 1 Map of the Kırklareli İğneada region of Turkey

For EIA, 100 μ L of 1:50 phosphate-buffered saline (PBS) diluted rodent sera were added into each well, in duplicate. Microplates were incubated for 60 min at 37°C, followed by three times washing with 300 μ L 1x wash buffer for 30–60 s. A 100 μ L of 1:10 000 PBS diluted horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG (Millipore, Billerica, MA) were added to the wells after the washing cycle. Microplates were then incubated for 60 min at 37°C. After incubation, the washing step was repeated as described above. 100 μ L of 3,3',5,5'-tetraamethylbenzidine/hydrogen peroxide (TMB/H₂O₂) were added and incubated in the dark at room temperature for 15 min. After incubation the reaction was stopped by the addition of 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄). The optical density (OD) of the samples was measured at 450 nm wavelength (reference wavelength 620 nm). Serum samples that had OD values higher than 0.325 were considered positive.²⁷

For IBA, the strips were incubated in 1500 μ L blocking buffer on a shaker at room temperature for 15 min. The blocking buffer was removed and 1500 μ L of 1:100 1x universal buffer diluted rodent sera were added followed by incubation at room temperature for 30 min (on a shaker). Diluted rodent sera was removed and the strips were washed three times in 1500 μ L 1x universal buffer for 5 min. A 1500 μ L of 1:5000 (diluted with 1x universal buffer) alkaline phosphatase (AP) conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) were added and incubated on a shaker at room temperature for 30 min. Following incubation, the washing step was repeated as described above. A 1500 μ L of nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) substrate solution were added to each strip and incubated on a shaker, at room temperature for 10 min. The substrate solution was removed and the strips were washed three times with distilled water for 1 min.²⁷

2.3 | Immunofluorescence assay (IFA)

Serum samples of seropositive wild rodents were further tested with IFA against the DOBV strain Greece/Ano Poroia. Vero E6 cells were infected with DOBV for 14 days, detached with trypsin, mixed with uninfected Vero E6 cells (in a ratio of 1:3), and washed with PBS. The slides were allowed to dry overnight before fixing with ice-cold acetone for 7 min. Serum samples were diluted 1:20 in PBS. A 20 μ L of each diluted sample were added to an IFA slide well. The slides were incubated for 30 min at 37°C followed by a washing procedure, three times with PBS for 5 min and once with distilled water for 5 min to remove any unbound antibodies. After drying, 25 μ L of 1:30 PBS diluted polyclonal rabbit anti-mouse FITC conjugate (Dako A/S, Glostrup, Denmark) were added to each well of the IFA slides. The slides were incubated for 45 min at 37°C. Excess antibody was removed by washing three times with PBS for 5 min and once with distilled water for 5 min. After drying, cover slips were placed on the IFA slides with mounting medium, and the slides were evaluated with a fluorescence microscope.²⁸

2.4 | RNA/DNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA and DNA extraction from lung tissues of rodents was performed with TriPure Isolation Reagent (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions.

RNA from tissue samples were reverse-transcribed with random hexamers using RevertAid Premium reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to manufacturer's instructions.

2.5 | Pan-Hanta L segment-specific PCR

A semi-nested PCR approach was adopted to amplify the 390-base pair (bp) stretch of the hantavirus L segment (encoding the RNA-dependent RNA polymerase). PCR reactions were performed in a 20- μ L volume using Phusion Flash high-fidelity PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) and 100 pmol of primers. The sequences of HanLF1 and HanLR1 primers (first reaction) and HanLF2 and HanLR2 primers (second reaction) are given in Table 1.²⁹

Cycling parameters for the first reaction are as follows: pre-denaturation at 98°C for 1 min, 7 cycles of denaturation at 98°C for 1 s, annealing at 45°C for 5 s and extension at 72°C for 15 s; followed by 35 cycles of denaturation at 98°C for 1 s, annealing at 55°C for 5 s and extension at 72°C for 15 s; and a final extension step of 72°C for 5 min. For the second reaction is pre-denaturation at 98°C for 1 min, 40 cycles of denaturation at 98°C for 1 s, annealing at 61°C for 5 s and extension at 72°C for 15 s and a final extension at 72°C for 1 min. PCR products were loaded onto 2% agarose gels, separated by electrophoresis and visualized. Positive samples were extracted from the gel using a gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed by the Sanger method.

2.6 | Cytochrome-b gene analysis

Cytochrome-b gene analysis was performed on pan-hanta L-segment PCR-positive rodents to determine species. The PCR reaction was performed in 20 μ L using Phusion Flash high-fidelity PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) and 20 pmol of sense (Cytb-F: 5'-CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G-3') and antisense (Cytb-R: 5'-CTG GTT TAC AAG ACC AGA GTA AT-3') primers.³⁰ Cycling parameters for the reaction were as follows: pre-denaturation at 98°C for 1 min, 40 cycles of denaturation at 98°C for 1 s, annealing at 53°C for 5 s, extension at 72°C for 15 s and the final extension step of 72°C for 1 min. PCR products were loaded onto 2% agarose gels, separated by electrophoresis and visualized. Positive samples were purified using a PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed by the Sanger method. The recovered sequences were analysed by BLAST.³¹

2.7 | DOBV S- and M-segment PCR

A 1215-bp stretch from the DOBV S segment was amplified in L-segment RT-PCR positive samples by a hemi-nested PCR protocol. The PCR reaction was performed in a volume of 20 μ L using Phusion Flash high-fidelity PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) and 20 pmol of primers. DOBV-1F primer (first reaction) and DOBV-2F (second reaction) were used as sense primers; whereas the Dob/S/1440/R primer⁸ was used as an antisense primer for both reactions (Table 1). Cycling parameters were the following: pre-denaturation at 98°C for

TABLE 1 Primers for PCR and sequencing

Segment	Primer	Polarity	Sequence	Positions (According to DOBV Greece/ Ano-Poroia, Accession Numbers: NC_005233, NC_005234, NC_005235)
L segment	HanLF1 ²⁹	Sense	5'-ATG TAY GTB AGT GCW GAT GC-3'	2936-2955
	HanLR1 ²⁹	Antisense	5'-AAC CAD TCW GTY CCR TCA TC-3'	3368-3387
	HanLF2 ²⁹	Sense	5'-TGC WGA TGC HAC IAA RTG GTC-3'	2947-2967
	HanLR2 ²⁹	Antisense	5'-GCR TCR TCW GAR TGR TGD GCA A-3'	3315-3336
S segment	DOBV/1F (This study)	Sense	5'-ATG GCA ACA YTA GAR GAA CTC CA-3'	36-58
	DOBV/2F (This study)	Sense	5'-CAG CTR GCT GAY CGT GTG-3'	225-242
	Dob/S/1440/R ⁸	Antisense	5'-CCA ACC CAA CCC CTA GTG TA-3'	1421-1440
M segment	DOBV-M1F (This study)	Sense	5'-GAR GTK GCA ACW TAT TCA ATT G-3'	901-922
	DOBV-M1R (This study)	Antisense	5'-CAA ACC ART GRC CTA AWG CAT-3'	2190-2212
	DOBV-M2F (This study)	Sense	5'-CAY ACT GCA AAT GCA GCA A-3'	949-967
	DOBV-M2R (This study)	Antisense	5'-CCA TGT GCR TTR TCA TTC CA -3'	2008-2027

Y: C, T B: C, G, T W: A, T D: A, G, T R: A, G H: A, C, T K: G, T I: Inosine

1 min, 40 cycles of denaturation at 98°C for 1 s, annealing at 58°C for the first reaction and 55°C for the second reaction for 5 s, extension at 72°C for 1 min and a final extension step of 72°C for 1 min.

We attempted to amplify a 1078-bp stretch of the M segment by a semi-nested PCR protocol. This reaction was performed in a volume of 20 µL using Phusion Flash high-fidelity PCR master mix (Thermo Scientific) and 100 pmol of primers DOBV-M1F and DOBV-M1R (first reaction) and DOBV-M2F and DOBV-M2R (second reaction) (Table 1). The cycling parameters for the first reaction were: pre-denaturation at 98°C for 1 min, 40 cycles of denaturation at 98°C for 1 s, annealing at 60°C for the first reaction and 61°C for the second reaction for 5 s, extension at 72°C for 15 s and a final extension step of 72°C for 5 min. PCR products were loaded onto 1% agarose gels, separated by electrophoresis and visualized. Positive samples were extracted from the gel using a gel extraction kit (Qiagen). Sequencing was performed by the Sanger method.

2.8 | Genetic characterization and phylogenetic analysis

The sequences of Kırklareli İğneada DOBV strains were compared with related sequences of other hantaviruses retrieved from existing databanks. The sequences were aligned using Clustal W modality provided in MEGA 6.06 software.³² Between-group and within-group distances for each segment were calculated by MEGA 6.06 software.³²

The newly recovered sequences of the Kırklareli İğneada DOBV strains were subjected to phylogenetic analyses. The corrected Akaike's information criterion (AICc) was chosen to estimate the best nucleotide substitution models for each segment by jModeltest v2.1.6.³³ Phylogenetic trees were constructed using MEGA 6.06 software for Maximum Likelihood (ML) method.³² Bootstrap support values were calculated using 1000 replicates for the trees.

3 | RESULTS

3.1 | Detection of hantaviruses in Turkish rodents

A total of 73 *Apodemus* species were collected and identified by phenotype as *A. flavicollis* (51/69.9%), *A. agrarius* (18/24.6%), *A. sylvaticus* (3/4.1 %), and *A. witherby* (1/1.4%). All 73 rodents were screened with optimized EIA and IBA methods and pan-hantavirus L-segment PCR. Fourteen rodents were found to be seropositive by optimised EIA and IBA. Of these 14 rodents, eight were also positive by IFA (Table 2 and Figure 2).

Eight out of the 73 rodent lung tissue samples were shown to be positive for DOBV RNA after screening with pan-hanta L-segment primers. Based on *cytochrome-b* gene sequences, these eight DOBV RNA-positive rodents belong to *A. flavicollis* species (Table 2). Partial S-segment sequences were amplified from all eight rodents while partial M-segment sequences were amplified from four (Table 2). All the Kırklareli İğneada DOBV strains reported in this study are deposited into GenBank. The strains were assigned the accession numbers KT315635 to KT315642 for the S-segment sequences, KT315623 to KT315626 for the M-segment sequences and KT315627 to KT315634 for the L-segment sequences.

3.2 | Genetic characterization and phylogenetic analysis of the Kırklareli strains of DOBV

Eight partial S segments, four partial M segments and eight partial L segments of Kırklareli sequences were aligned with the corresponding sequences of the DOBV strain Greece/Ano-Poroia.

At the nucleotide level, Kırklareli DOBV strains differ from each other by 1.2% for the S segment, 0.4% for the M segment and 1.3% for the L segment. At the nucleotide level, the distances of Kırklareli strains from the DOBV strain Greece/Ano-Poroia were 3.2%, 3.4%, and 5.4% for the S, M and L segments, respectively.

TABLE 2 Analysis of 14 rodents (presumably *Apodemus* spp.†) identified as positive by EIA and IBA pre-screening

Identification number	Rodent species identification by genotyping	EIA	IBA	IFA DOBV	L segment	DOBV S segment	DOBV M segment
1	ND	0.857	+	–	–	–	–
2	<i>Apodemus flavicollis</i>	1.343	+	+	+	+	–
3	<i>Apodemus flavicollis</i>	1.157	+	+	+	+	–
5	ND	1.041	+	–	–	–	–
9	<i>Apodemus flavicollis</i>	1.430	+	+	+	+	+
13	<i>Apodemus flavicollis</i>	1.649	+	+	+	+	+
32	<i>Apodemus flavicollis</i>	0.947	+	+	+	+	–
48	ND	0.340	+	–	–	–	–
56	ND	0.381	+	–	–	–	–
57	<i>Apodemus flavicollis</i>	1.018	+	+	+	+	+
58	ND	0.500	+	–	–	–	–
83	ND	0.418	+	–	–	–	–
84	<i>Apodemus flavicollis</i>	1.100	+	+	+	+	–
89	<i>Apodemus flavicollis</i>	1.069	+	+	+	+	+
Total: 14	8 <i>A. flavicollis</i>	14	14	8	8	8	4

ND: Not determined.

†The rodents were identified as *Apodemus* spp. according to their morphological characteristics, such as back and belly colours, collar existence, medial stripe and supraorbital ridges, weight and the length of body, tail, hindfoot, ear, and maxillary tooth row.²³ Hantavirus carrier rodents were identified with cytochrome-b sequencing.³⁰

Total of eight S (627 bp), four M (834 bp), and eight L (257 bp) partial segments of the İğneada strains were analyzed phylogenetically. When the Kırklareli İğneada sequences were compared with the prototype DOBV strain Greece/Ano-Poroia, 37, 66, and 20 point mutations at the nucleotide level in addition to three (Q151R, G154E, I182R), five (I11V, P19 K, I28V, L173P, V181A) and two (R1 K, G84R)

amino acid substitutions were detected in the S, M, and L segments, respectively. The majority of point mutations were silent mutations for all three segments.

The S, M, and L segment sequences of the Kırklareli İğneada strains clustered into a separate clade within the Dobrava genotypes of DOBV, distinct from strains of Saaremaa virus (found in *A. agrarius*) and

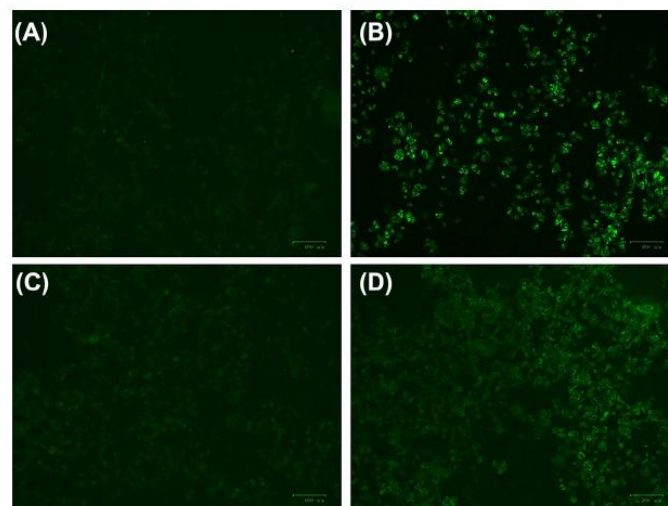


FIGURE 2 Detection of antibodies by IFA. A slide spot stained with no primary antibody (A) shows no unspecific staining, while a spot stained with a known positive serum (B) shows a clear signal. The blood sample from mouse number 73 (C) is negative for anti-DOBV antibodies, while the sample from mouse number 89 (D) is positive. The pictures have been taken with ZOE™ fluorescent cell imager (BioRad)

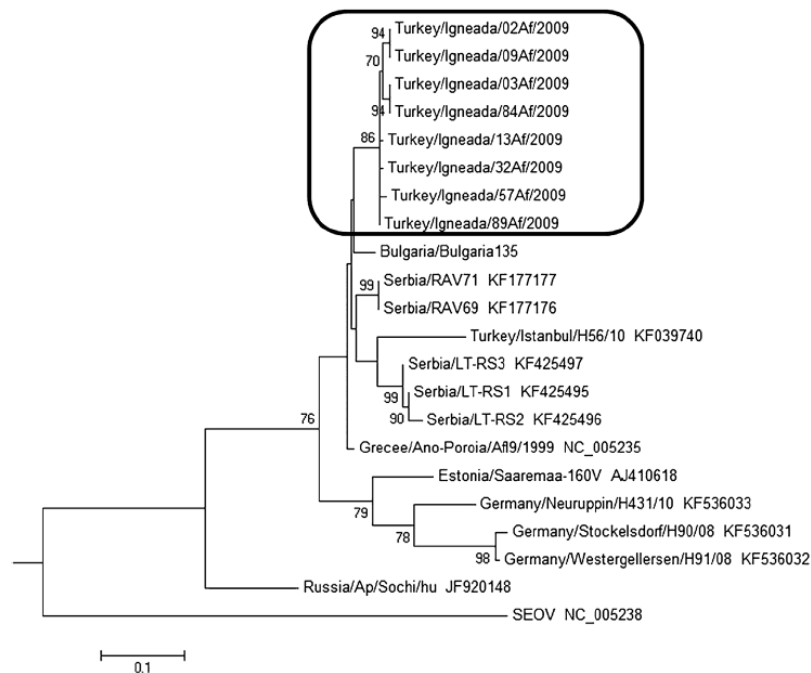


FIGURE 3 The L-segment tree (257 nucleotides) was generated by the ML method under the best-fit GTR + G model of evolution based on partial sequences of the L segments of DOBV Dobrava, Saaremaa, and Sochi strains and SEOV as an outgroup. Only bootstrap values of $\geq 70\%$ were indicated for the trees

Sochi virus (found in *A. ponticus*) (Figure 3-5). The Kırklareli İğneada L and S segment sequences were found to be close to Balkan strains (especially Bulgaria) (Figures 3 and 5); while the Kırklareli İğneada M-segment sequences were equally distant from the other Dobrava genotypes of DOBV (Figure 4). Of note, the DOBV strain from Istanbul is distant and ancestral when compared with the newly recovered Turkish DOBV sequences (however, with a bootstrap support value that is not remarkably high).

4 | DISCUSSION

The İğneada region in Turkish Thrace is located at the south-eastern border of Europe. The Marmara Sea, Dardanelle, and Bosphorus separate Asia and Europe and its faunas. Accordingly, these geographical elements have sometimes (but not always) played a role as a barrier³⁴; even though historical and geographical events sometimes allow faunas to cross both sides. Thus, some rodent species and their parasites cross from the Asian side to the European side or vice versa. As a result of such migratory events, these areas contain genetic lineages that represent both continents. It is particularly important to study such bridge areas with the aim to follow the present and past movements and distribution of parasites and their hosts.

The *Apodemus* species is important for hantavirus infections in the Balkan Peninsula. Both *A. flavicollis* and *A. agrarius* are responsible for the transmission of DOBV and SAAV hantavirus strains, respectively. In this study, the majority of the rodents were *A. flavicollis*, which are reservoirs for DOBV.³⁵ The distribution and prevalence of rodent species and hantavirus type were similar among the Kırklareli region and other Balkan regions.^{36,37}

After the end of the last glaciation, the *A. flavicollis* population that formed the Italo-Balkan refugia, recolonized Europe including the Turkish Thrace. On the other hand the *A. flavicollis* population from the Anatolian refugium, colonized Anatolia and the Middle East. These represent genetically different lineages.²⁵ As expected from these evolutionary migration and recolonization events, the sequences isolated from DOBV-positive *A. flavicollis* mice from the Turkish Thrace are similar to the sequences of Balkan and European mice. This finding in itself is a reflection of the coevolutionary history of mice and the virus.

DOBV infections in rodents have been reported from Balkan countries and Turkey. A total of 173 rodents were captured in 2009, from the Bartin province (an outbreak region) of the Western Black Sea Region of Turkey. Twenty-one percent were found to be anti-hantavirus IgG positive. Hantaviral RNA was detected in 13.3% of these rodents. Two DOBV strains in *A. flavicollis* and *A. uralensis* were reported.⁸ In this study, 73 *Apodemus* spp. rodents were collected from the Kırklareli İğneada region of Turkey in 2009.

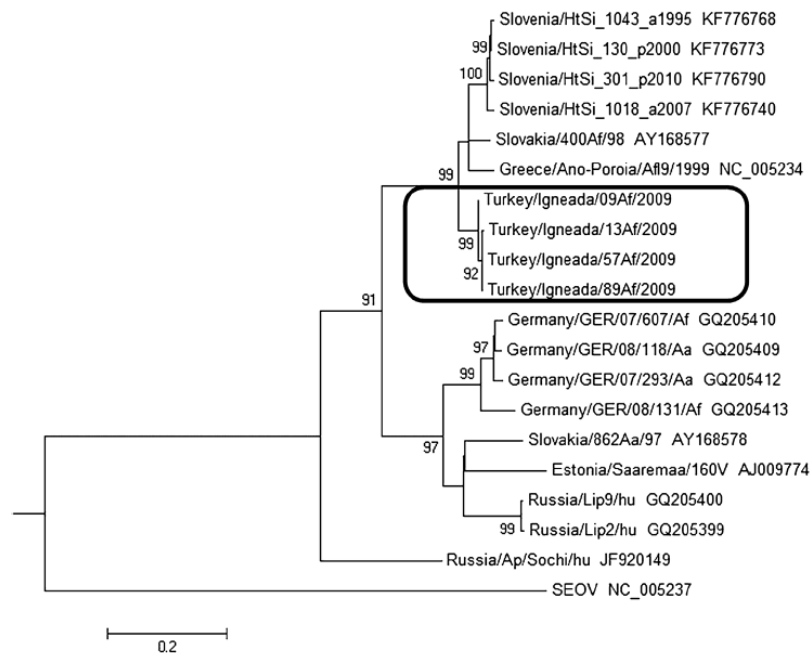


FIGURE 4 The M-segment tree (834 nucleotides) was generated by ML method under the best-fit GTR + G + I model of evolution based on partial sequences of the M segments of DOBV Dobrava, Saaremaa, and Sochi strains and SEOV as an outgroup. Only bootstrap values of $\geq 70\%$ were indicated for the trees

Hantaviral RNA was detected in 11% of these rodents. All the positive rodents were infected with DOBV, and all rodents were *A. flavicollis*.

The first paper from Greece on hantavirus infections in rodents reported that 13.1% of 61 *A. flavicollis* rodents were positive by serological or molecular methods.⁹ In 2001, DOBV was isolated from an *A. flavicollis* rodent captured in Ano Poroia (a village near the Bulgarian border) where HFRS is endemic.¹⁰ In Bulgaria, 691 rodents were captured by traps in three different HFRS-endemic locations during 2011–2012. Eight rodents were found to be infected (7 were *A. flavicollis* and 1 was *A. agrarius*). Similar to the Igneada strains, the sequences clustered with the sequences from Bulgaria, Greece, Slovenia, and Slovakia.¹¹ Hantavirus prevalence in rodents of the Kırklareli Igneada region is comparable with the prevalence in neighboring countries, such as Greece and Bulgaria. In Serbia, 185 *A. flavicollis* rodents were captured between 2008 and 2010 and approximately 12% of them were tested to be seropositive. The hantaviral genome was detected in three of 22 seropositive rodents in this study.¹² In Romania, 83 rodents were captured in 2007 and 2008, from two different locations where confirmed DOBV infections have been reported. Three *A. flavicollis* rodents were infected with DOBV and the sequences were very similar to those from reported HFRS cases. Phylogenetic analysis revealed that two variants of DOBV circulate in Romania.¹³ In Albania, 263 small mammals were trapped

during 2006–2007; 10 of 148 *A. flavicollis* rodents were found to be infected with DOBV.¹⁴

When the existence of anti-hantavirus IgG antibody and hantaviral RNA were compared, 42.8% of the combined EIA and IBA method results were false positive. The combined EIA and IBA methods, which were used in this study, have high sensitivity and low specificity. These methods are thus used for the rapid screening and detection of possible hantavirus carrier rodents. After this serological screening, the lung tissue samples of potentially infected rodents were always screened with pan-hantavirus PCR and IFA yielding eight rodents confirmed positive.

M segment sequences were not obtained from all DOBV-positive rodents. M segment sequences are likely to be divergent, and our primers did not sufficiently capture all eight M segment sequences. Therefore, L segment and S segment amplifications should be preferred in screening.

The M segment and S segment sequences of Kırklareli strains could not be compared with other DOBV strains found in Turkey. The different regions of the M segment were amplified for Istanbul and Kırklareli strains, so they did not overlap with each other. Also, the S segment sequences of the Bartın strains (as reported by Oktem et al) from Turkey only partially overlapped with the sequences of Kırklareli strains.⁸ Bartın DOBV sequences were obtained from an outbreak region in the Western Black Sea Region of Turkey. These sequences formed a separate cluster in the Dobrava genotype of DOBV and

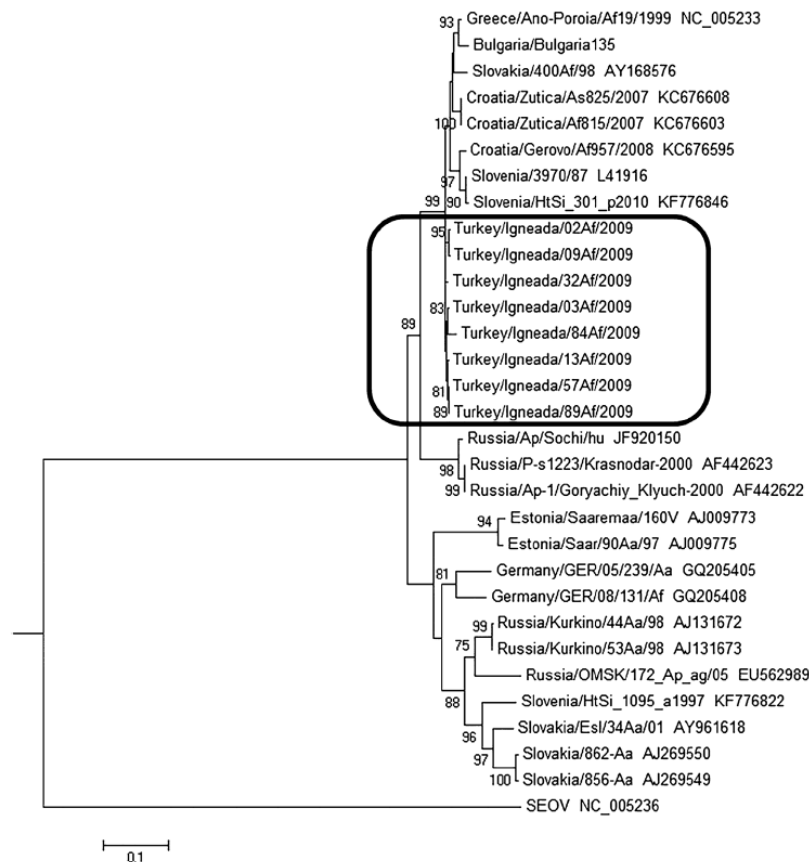


FIGURE 5 The S-segment tree (627 nucleotides) was generated by ML method under the best-fit GTR + G + I model of evolution based on partial sequences of the S segments of DOBV Dobrava, Saaremaa and Sochi strains and SEOV as an outgroup. Only bootstrap values of $\geq 70\%$ were indicated for the trees

shared ancestry with strains from Greece, Slovenia, and Slovakia (similar to Kırklareli strains).

Interestingly, although the Kırklareli and Istanbul provinces are very close geographically, the Kırklareli and Istanbul strains did not cluster together on the L-segment phylogenetic tree. In contrast to the Kırklareli strains isolated from infected rodents, the Istanbul strain sequence was recovered from humans. The exact location where the infection was transmitted remains unknown. Kırklareli and Istanbul strains might be carried by different *A. flavicollis* populations evolutionarily, suggesting that this region might indeed represent the zone where DOBV variants originating from the two different refugia meet, thus warranting further studies in nearby regions.

This study demonstrates the existence of hantavirus-infected rodents in the European part of Turkey. Further genetic information about hantaviruses is needed to evaluate the spread and distribution of this infection in Turkey.

ACKNOWLEDGMENTS

Ceylan Polat was funded by a Federation of European Microbiological Societies FEMS Research Fellowship. We thank Mira Utriainen, Sanna Mäki for performing the IFA technique, Jiaxin Ling for cloning of the S segment.

ORCID

Ceylan Polat  <http://orcid.org/0000-0003-1511-4177>

REFERENCES

1. Plyusnin A, Beaty BJ, Elliott RM, et al. Bunyaviridae. In: King AMQ, Lefkowitz EJ, Adams MJ, Carstens EB, eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier, 2012:725–741.

2. Schmaljohn CS, Nichol ST. Bunyaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007:1741–1789.
3. Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O. Hantavirus infections Europe and their impact on public health. *Rev Med Virol*. 2013;23:35–49.
4. Jonsso CB, Figueriedo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:412–441.
5. Plyusnin A, Sironen T. Evolution of hantaviruses: co-specification with reservoir hosts for more than 100 MYR. *Virus Res*. 2014;187:22–26.
6. Vapalahti O, Mustonen J, Lundqvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:653–661.
7. Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Oktem MA, et al. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *J Wildl Dis*. 2006;42:672–676.
8. Oktem IMA, Uyar Y, Dincer E, et al. Dobrava-Belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:121–125.
9. Papa A, Mills JN, Kouidou S, Ma B, Papadimitriou E, Antoniadis A. Preliminary characterization and natural history of hantaviruses in rodents in Northern Greece. *Emerg Infect Dis*. 2000;6:654–655.
10. Papa A, Nemirov K, Henttonen H, et al. Isolation of Dobrava virus from *Apodemus flavicollis* in Greece. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2291–2293.
11. Christova I, Plyusnina A, Gladnisha T, et al. Detection of Dobrava hantavirus RNA in *Apodemus* mice in Bulgaria. *J Med Virol*. 2015;87:263–268.
12. Stamenković G, Nikolić V, Blagojević J, et al. Genetic analysis of Dobrava-Belgrade virus from Western Serbia: a newly detected focus in the Balkan Peninsula. *Zoonoses Public Health*. 2014;62:141–150.
13. Panculescu-Gatej RI, Sirbu A, Dinu S, et al. Dobrava virus carried by yellow-necked field mouse *Apodemus flavicollis*, causing hemorrhagic fever with renal syndrome in Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014;14:358–364.
14. Papa A, Rogozi E, Velo E, Papadimitriou E, Bino S. Genetic detection of hantaviruses in rodents, Albania. *J Med Virol*. 2016;88:1309–1313.
15. Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by hantavirus in the black sea region of Turkey. *Euro Surveill*. 2009;14:pii: 19214.
16. Kaya S, Caglayik SY, Uyar Y, et al. Can Hantavirus infections be predicted on admission to hospital? *J Med Virol*. 2012;84:1790–1796.
17. Sarıgözel N, Hofmann J, Canpolat AT, et al. Dobrava hantavirus infection complicated by panhypopituitarism, İstanbul, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2010;18:1180–1183.
18. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, et al. Hantavirus infection in İstanbul, Turkey. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:303.
19. Gozalan A, Kalaycioglu H, Uyar Y, et al. Human puumala and Dobrava hantavirus infections in the black sea region of Turkey: a cross-sectional study. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13:111–118.
20. Kefelioglu H, Tez C, Gunduz I. The taxonomy and distribution of *apodemus agrarius* (Pallas, 1771) (Mammalia: rodentia) in the European part of Turkey. *Turkish J Zoo*. 2003;27:141–146.
21. Yigit N, Çolak E, Sözen M, Karataş A. *Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri*. Ankara: Meteksan Yayınevi; 2006.
22. Kryštufek B, Vohralik V. Distribution of field mice (*Apodemus*) (Mammalia: rodentia) in Anatolia. *Zoo Middle East*. 2007;42:25–36.
23. Kryštufek B, Vohralik V. *Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae*. Koper: University of Primorska, Science and Research Centre; 2009. 371.
24. Wilson DE, Reeder DM. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd ed. Baltimore: John Hopkins Univ. Press; 2005. 142.
25. Michaux JR, Libois L, Paradis E, Filippucci MG. Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Mol Phylogenet Evol*. 2004;32:788–798.
26. Kryštufek B, Vohralik V. *Mammals of Turkey and Cyprus. Rodentia II: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvicolinae*. Koper: University of Primorska, Science and Research Centre; 2005.
27. Polat C, Oktem MA, Karatas A, Sozen M, Matur F, Abacioglu H. Optimization of an IgG enzyme immunoassay and immunoblot for the detection of old world hantaviruses in wild rodents. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50:245–255.
28. Kallio-Kokko H, Laakkonen J, Rizzoli A, et al. Hantavirus and arenavirus antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy. *Epidemiol Infect*. 2006;134:830–836.
29. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:838–840.
30. Kang HJ, Bennett SN, Dizney L, et al. Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). *Virology*. 2009;388:8–14.
31. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–410.
32. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725–2729.
33. Posada D. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253–1256.
34. Chobanov DP, Kaya S, Grzywacz B, Warchałowska-Słiwa E, Çıplak B. The Anatolia-Balkan phylogeographic fault: a snapshot from the genus *Isophya* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Zoologica Scripta*. 2016;46:165–179.
35. Avsic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, van der Groen G, LeDuc JW. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol*. 1992;38:132–137.
36. Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W, et al. *The Atlas of European Mammals*. London: The Academic Press; 1999.
37. Avsic-Zupanc T, Korva M, Marcotic A. HFRS and hantaviruses in the Balkans/South-East Europe. *Virus Res*. 2014;187:27–33.

How to cite this article: Polat C, Sironen T, Plyusnina A, et al. Dobrava hantavirus variants found in *Apodemus flavicollis* mice in Kırklareli Province, Turkey. *J Med Virol*. 2018;1–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.25036>