

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE BATI BÖLGELERİNDE
HANTAVİRUS ARAŞTIRILMASI:
TRAKYA BÖLGESİ KEMİRİCİLERİNDE
HANTAVİRUS ANTİKORLARININ
PREVALANSININ ARAŞTIRILMASI**

CEYLAN POLAT

MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc- 2010970077

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE BATI BÖLGELERİNDE
HANTAVİRUS ARAŞTIRILMASI:
TRAKYA BÖLGESİ KEMİRİCİLERİNDE
HANTAVİRUS ANTİKORLARININ
PREVALANSININ ARAŞTIRILMASI**

CEYLAN POLAT


Danışman Öğretim Üyeleri: Doç. Dr. İ. Mehmet Ali Öktem
Prof. Dr. Y. Hakan Abacıoğlu

TEZ KODU: DEU.HS1.MSc- 2010970077

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ...Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji... Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi ..Ceylan POLAT.. **“Türkiye Batı Bölgelerinde Hantavirus Araştırılması: Trakya Bölgesi Kemiricilerinde Hantavirus Antikorlarının Prevalansının Araştırılması”** konulu Yüksek Lisans tezini ...11/07/2013....tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Doç. Dr. İ. Mehmet Ali Öktem
BAŞKAN

Doç. Dr. Ö. Alpay Özbek
ÜYE


Doç. Dr. H. Ogün Sercan
ÜYE

Doç. Dr. Cem Ergon
ÜYE
(YEDEK)

Doç. Dr. Bekir Uğur Ergür
ÜYE
(YEDEK)

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hantavirus.....	4
2.1.1. Tarihçe.....	4
2.1.2. Sınıflandırma.....	4
2.1.3. Genom Organizasyonu.....	5
2.1.4. Yaşam Döngüsü.....	6
2.1.5. Rezervuarları ve Bulaş Yolları	7
2.1.6. Klinik.....	8
2.1.7. Epidemiyoloji.....	9
2.1.7.1. Türkiye’de Hantavirus epidemiyolojisi.....	10
2.1.8. İmmunoloji	11
2.1.9. Laboratuvar Tanısı	12
2.1.9.1. Serolojik testler	12
2.1.9.2. Moleküler tanı.....	13
2.1.10. Tedavi ve Korunma	13
2.2. İmmunoserolojik Yöntemler	14
2.2.1. İmmunoserolojik Yöntemlerin Validasyonunda Rol Oynayan Faktörler.....	15
2.2.1.1. Eşik değerinin belirlenmesi.....	16
2.2.1.2. Duyarlılık ve özgüllük.....	16
2.2.1.2.1. Roc analizi.....	17
2.3. Normal Dağılım	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Araştırmanın Tipi	20
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	20

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme	20
3.4. Çalışma Materyali	20
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	20
3.6. Veri Toplama Araçları	20
3.6.1. ELISA Optimizasyonu	20
3.6.2. Eşik Değerinin Belirlenmesi	21
3.6.3. Örneklerin Taranması	22
3.6.4. Immunoblot Optimizasyonu	23
3.6.5. Örneklerin Immunoblot ile Doğrulanması	25
3.6.6. İstatistiksel Analiz	25
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	26
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	26
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	26
3.10. Etik Kurul Onayı	26
4. BULGULAR	27
4.1. ELISA Optimizasyonu	27
4.2. Eşik Değerinin Belirlenmesi	27
4.3. Örneklerin Taranması	27
4.4. Immunoblot Optimizasyonu	27
4.5. Örneklerin Immunoblot ile Doğrulanması	28
4.6. İstatistiksel Analiz	28
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	35
8. EKLER	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. RSKA dönemleri, süresi ve belirtileri.....	9
Tablo 2. HPS dönemleri, süresi ve belirtileri.....	9
Tablo 3. Araştırma planı ve iş süreleri.	26
Tablo 4. Ortalamaya eklenen her bir S için duyarlılık ve özgülük değerleri	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hantavirus genom organizasyonu.....	5
Şekil 2. Hantavirus yaşam döngüsü.....	7
Şekil 3. Antikor yakalayan immunoserolojik testlerin çalışma prensibi.....	15
Şekil 4. Antijen yakalayan immunoserolojik testlerin çalışma prensibi	15
Şekil 5. Duyarlılık ve özgüllük değerlendirme tablosu.....	16
Şekil 6. Duyarlılık ve özgüllüğün farklı değerlerinde ROC eğrisinin görünümü.	17
Şekil 7. Evrenden elde edilen verinin normal dağılım eğrisi	18
Şekil 8. Her σ değeri için değişkenlerin dağılımdaki yüzdesi.	19
Şekil 9. Hantavirus tiplerine göre oluşan IgG yanıtının striplerdeki görünümü.....	24
Şekil 10. Optimal serum ve konjugat dilüsyonlarında striplerdeki bant intensitesi.....	28
Şekil 11. Kırklareli İğneada bölgesinde yakalanan kemirici serumlarının OD değerlerine ait ROC eğrisi.....	30
Şekil 12. Türlerin Anadolu'ya giriş kapıları.....	31

KISALTMALAR

AP	Alkalen fosfataz enzimi
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOBV	Dobrava virus
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
ER	Endoplazmik retikulum
HLA	İnsan lökosit antijeni
HPS	Hantavirus pulmoner sendrom
HRP	“Horseradish” peroksidaz enzimi
HTNV	Hantaan virus
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₂SO₄	Sülfirik asit
IFN	İnterferon
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IFA	İndirekt immunofloresans testi
IL	İnterlökin
mRNA	Haberci RNA
N	Nükleokapsid
NBT/BCIP	Nitrobluetetrazoliumklorid/ 5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat
NK	Doğal öldürücü hücre
OD	Optik dansite
PUUV	Puumala virus
PZT	Polimeraz zincir tepkimesi
RdRp	RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	Ribonükleik asit
ROC	“Receiver operating characteristic”
RSKA	Renal sendromlu kanamalı ateş

RT	Ters transkripsiyon
S	Örneklem grubunun standart sapması
SAAV	Saaremaa virus
SEOV	Seoul virus
SNV	Sin Nombre virus
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TNF	Tümör nekrozis faktör
TULV	Tula virus
UV	Ultraviyole ışın
\bar{x}	Örneklem grubunun ortalaması
μ	Evren verisinin ortalaması
σ	Evren verisinin standart sapması

TEŐEKKÜR

Eğitim s¼recim boyunca geliŐmemde b¼y¼k katkısı olan ve bu çalışmanın gerçekleŐtirilmesinde bana her t¼rl¼ desteği veren danışman hocalarım Prof. Dr. Y. Hakan Abacıoğlu ve Doç. Dr. İ. Mehmet Ali Öktem'e, çalıŐmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Alp Ergör, Doç. Dr. Meral Karaman ve Dr. Deniz Utku Altun'a, ayrıca yetişmemde emeği geçen diğer tüm hocalarıma ve aileme teŐekk¼r ederim.

TÜRKİYE BATI BÖLGELERİNDE HANTAVİRUS ARAŞTIRILMASI: TRAKYA BÖLGESİ KEMİRİCİLERİNDE HANTAVİRUS ANTİKORLARININ PREVALANSININ ARAŞTIRILMASI

Ceylan POLAT

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve

Klinik Mikrobiyoloji A.D.

e-posta: ceylanpolat88@gmail.com

Hantavirus, asıl konağı kemiriciler olmasına rağmen temel olarak, enfekte kemiricilere ait sekresyonlardaki (dışkı, idrar, tükürük) partiküllerin solunması yolu ile insanlara bulaşmaktadır. Hantavirusa bağlı vakaların durumu hakkında bilgi edinilmesi ve risk durumunun ortaya konması için, kemirici popülasyonundaki prevalansın belirlenmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışma kapsamında, ticari ELISA ve immunoblot antijenleri, kemirici serumuna göre optimize edilmiş ve Kırklareli İğneada bölgesinde yakalanan kemiricilerde hantavirusa karşı oluşan IgG antikorlarının varlığı, optimize yöntemlerle araştırılmıştır. Her iki yöntemin optimizasyonunda, farklı serum ve konjugat dilüsyonları denenmiştir. Üç farklı bölgede toplanan farklı türlere ait 16 negatif kemirici serumu kullanılarak, optimize ELISA testi için eşik değeri belirlenmiştir.

ELISA testi ile örneklerin % 26,2'sinde, immunoblot testi ile % 20,7'sinde hantavirus pozitifliği saptanmıştır. Örneklerin % 94'ünde DOBV pozitifliği, % 6'sında ise PUUV pozitifliği tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, testin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 95 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada olduğu gibi farklı türden kemiricilere yönelik olarak optimize edilen serolojik yöntemler, alanda aktif izlem ve denetleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Ülkemizde farklı bölgelerdeki kemiricilerde hantavirus seroprevalansının belirlenmesi ile risk haritaları oluşturulabilecek ve gerekli önlemler alınabilecektir. Ayrıca ülkemizde dolaşmakta olan tüm hantavirus alt tipleri ve hantavirus taşıyıcısı olan kemirici türleri belirlenebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Hantavirus; kemirici; seroprevalans; İğneada

INVESTIGATION OF HANTAVIRUS IN EAST REGIONS OF TURKEY: ANALYSIS OF HANTAVIRUS ANTIBODY PREVALENCE IN RODENTS IN THRACE REGION OF TURKEY

Ceylan POLAT

Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Clinical Microbiology

e-mail: ceylanpolat88@gmail.com

The rodents are a major reservoir of hantavirus. Hantavirus mainly infects human via inhalation of particles infected by rodents' secretions. Determination of its prevalence in rodent populations is vital to get information about hantavirus related cases and to clarify the state of risk.

In this study we optimized a commercial ELISA and immunoblot antigens used for the detection of hantavirus specific antibodies in rodent sera which collected from the rodents in Kırklareli Igneada region. We tested different dilutions of serum and conjugate for optimization. To determine the cut-off value for optimized ELISA, 16 negative rodent sera from different species were used which collected from three distinct areas.

Hantavirus seropositivity rates among the samples were found as 26.2% with ELISA and 20.7% with immunoblotting. 94% of the samples were DOBV positive and 6% were PUUV positive. As a result of the statistical analysis, the sensitivity and specificity of the test were found as 100% and 95%, respectively.

We constituted a procedure that gives reliable results to be used in serological screening of rodent samples. It's a fact that the presence of dependable and optimized serological procedures targeting various rodent types have a major importance to accomplish the mission when an active screening in a fieldwork is going on. By doing similar research activities in different regions of Turkey, it will be possible to create risk maps and to take preventive measures. Moreover these researches are important with regards to determining all hantavirus types and the rodent species known as their carriers in Turkey.

Keywords: Hantavirus; rodent; seroprevalence; Igneada

1. GİRİŞ VE AMAC

Bunyaviridae ailesinin üyesi olan Hantaviruslar, zarflı, negatif polariteli, tek iplikli ve üç segmentten oluşan RNA genomuna sahiptirler. Bu virusların asıl konağı, genel olarak kemiriciler ve bazı böcekçiller iken, insan tesadüfi konaktır. Bulaşma, enfekte kemiricilere ait sekresyonlardaki (salya, feçes ve idrar) viral partiküllerin solunması ya da nadiren enfekte kemiricilerle temas sonucunda olmaktadır.

Hantaviruslar konakları olan kemiriciler ile birlikte evrimleştiklerinden, her virus tipi yalnızca belirli kemirici tipi/typleri tarafından taşınmaktadır. Bu nedenle, belirli kemirici türlerinin görüldüğü bölgelerde, taşıdıkları Hantavirus tipleri görülmektedir. Bu dağılıma göre Yeni Dünya hantavirusları ve Eski Dünya hantavirusları olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Yeni Dünya Hantavirusları ise Amerika kıtasında görülmektedir. Sigmodontinae alt ailesinin üyesi olan kemiriciler tarafından taşınan hantavirus tipleri, Hantavirus pulmoner sendroma (HPS) neden olmaktadır. Eski Dünya Hantavirusları ise Avrupa ve Asya'da görülmektedir. Murinae ve Arvicolinae alt ailelerinin üyesi olan kemirici türleri tarafından taşınan hantavirus tipleri, renal sendromlu kanamalı ateş (RSKA) etkenidir.

Hantavirusun alt tiplerinden Dobrava (DOBV), Puumala (PUUV), Saaremaa (SAAV), Tula (TULV) ve Seoul (SEOV) virusların taşıyıcısı olan kemirici türlerinden *Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius* (Avrupa tipi), *Microtus arvalis* ve *Rattus norvegicus* ülkemizde de bulunmaktadır. Daha önceden yapılan çalışmalarda kemiricilerde ve insanlarda seropozitifliği gösterilen hantavirusların 2009 yılında Zonguldak-Bartın bölgesinden bildirilen RSKA vakaları ile birlikte ülkemiz coğrafyasında da salgınlar yaptığı gösterilmiştir.

Kemirici populasyonundaki hantavirus prevalansının belirlenmesi, yerel salgınlar ve belirli bir bölgedeki ve dönemdeki hantavirusa bağlı vakaların durumu hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. Bu çalışma ile Kırklareli İğneada bölgesinden toplanan kemiricilerde Hantavirus antikorlarının prevalansının araştırılması ve bölgenin hantavirus enfeksiyonları açısından risk durumunun ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla toplanan kemiricilere ait serum örneklerinde hantavirus rekombinant nükleokapsid antijenlerine özgü antikorların varlığı "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) yöntemi ile araştırılmış ve immunoblot yöntemi ile doğrulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hantavirus

2.1.1. Tarihçe

İlk kez 1976 yılında izole edilmesine rağmen kanamalı ateş ve böbrek yetmezliği ile seyreden klinik bulgular, yaklaşık bin yıl önce tanımlanmaya başlamıştır. Özellikle 1900-1950 yılları arasında pek çok salgın oluşturmuş ve farklı isimlerle anılmıştır (1). Kore Savaşı (1950-1953) sırasında ortaya çıkan salgında 3000'den fazla askerde ateş ve akut böbrek yetmezliği görülmesi ile dikkat çekmiş ve "Kore Kanamalı Ateşi" olarak adlandırılmıştır (2).

1976 yılında Dr. Lee ve ark. *Apodemus agrarius coreae*'nin akciğer dokusunda virusa özgü antijeni bulmuş ve 1977 yılında da virusu izole etmiştir (3). İlk prototip virus, adını Kore'deki Hantaan nehrinden alan Hantaan virustur (HTNV). Asya ve Avrupa'da da farklı hantavirus tiplerinin izole edilmesi ile bu hantavirus tiplerinin oluşturduğu hastalık, 1983 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından renal sendromlu kanamalı ateş olarak adlandırılmıştır (4).

1993 yılında ABD'nin güneybatısında salgına neden olan pulmoner hastalığın etkeninin hantavirus olabileceği düşünülmüş ve etken bir süre sonra izole edilmiştir. Asya ve Avrupa'da görülen klinik tablodan daha farklı bir tablo oluşturan bu hastalık, hantavirus pulmoner sendrom olarak adlandırılmıştır.

Türkiye'de ilk çalışma ise 1993 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde yapılmıştır (5).

2.1.2. Sınıflandırma

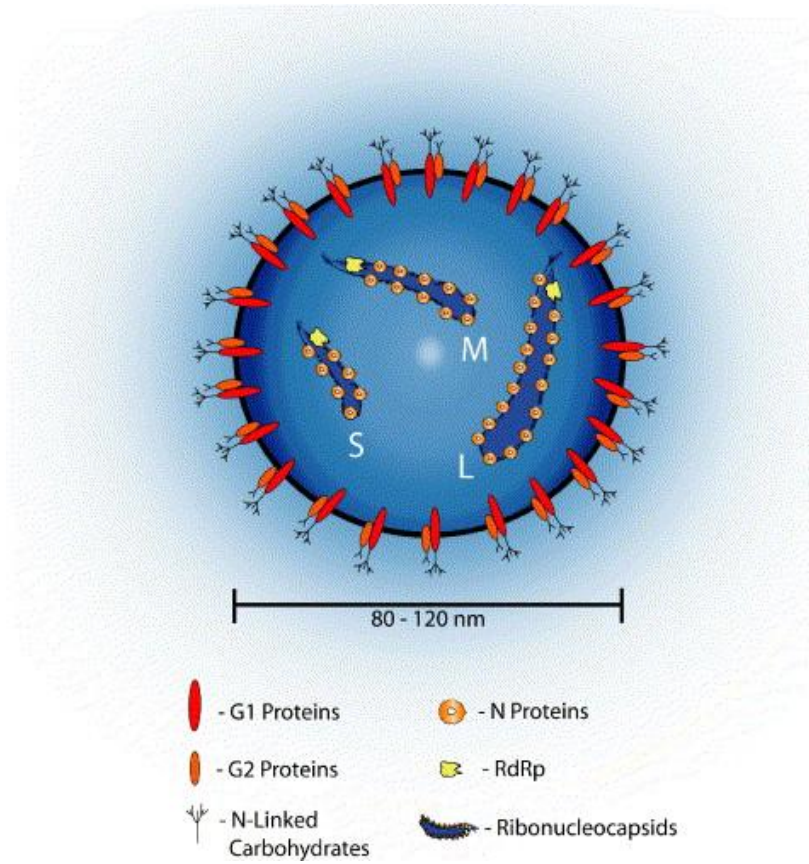
Bunyaviridae ailesinin beş üyesinden (Orthobunyavirus, Nairovirus, Phlebovirus, Tosopovirus, Hantavirus) biridir. Hantavirus, artropod kaynaklı olmaması ile diğer cinslerden ayrılmaktadır.

Hantaviruslar, konağı olan kemirici türlerinin üyesi olduğu Murinae, Arvicolinae, Neotominae ve Sigmodontinae alt ailelerine göre sınıflandırılmaktadır. Murinae ve Arvicolinae alt ailesine mensup kemiriciler ile taşınan hantavirus tipleri RSKA etkeni iken,

Neotominae ve Sigmodontinae alt ailelerine mensup kemiriciler ile taşınan hantavirus tipleri HPS etkenidir (6).

2.1.3. Genom Organizasyonu

80-210 nm çapında sferik partiküllerdir. Tek zincirli, negatif polariteli, zarflı RNA viruslarıdır. Genom büyüklüğü, yaklaşık 12 kb'dır. Genom, küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olmak üzere üç segmentten oluşur (7) (Şekil 1).



Şekil 1. Hantavirus genom organizasyonu (8).

S segment (~ 1.8 kb), viral nükleokapsid (N) proteinini kodlamaktadır. Kapsidasyon ve viral genomun paketlenmesinden sorumlu olan N proteini, viral RNA'yı korumaktadır. En çok enfekte hücrelerin sitoplazmasında bulunmaktadır. N proteini, erken bağışık yanıt boyunca etkili olan esas antijendir. Bu nedenle tanısal amaçlı antijen olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar ile N proteinlerinin antijenik determinantları haritalanmış ve pek çok hantavirus tipinin amino ucunun immunodominant B hücre epitopu içerdiği saptanmıştır (9, 10).

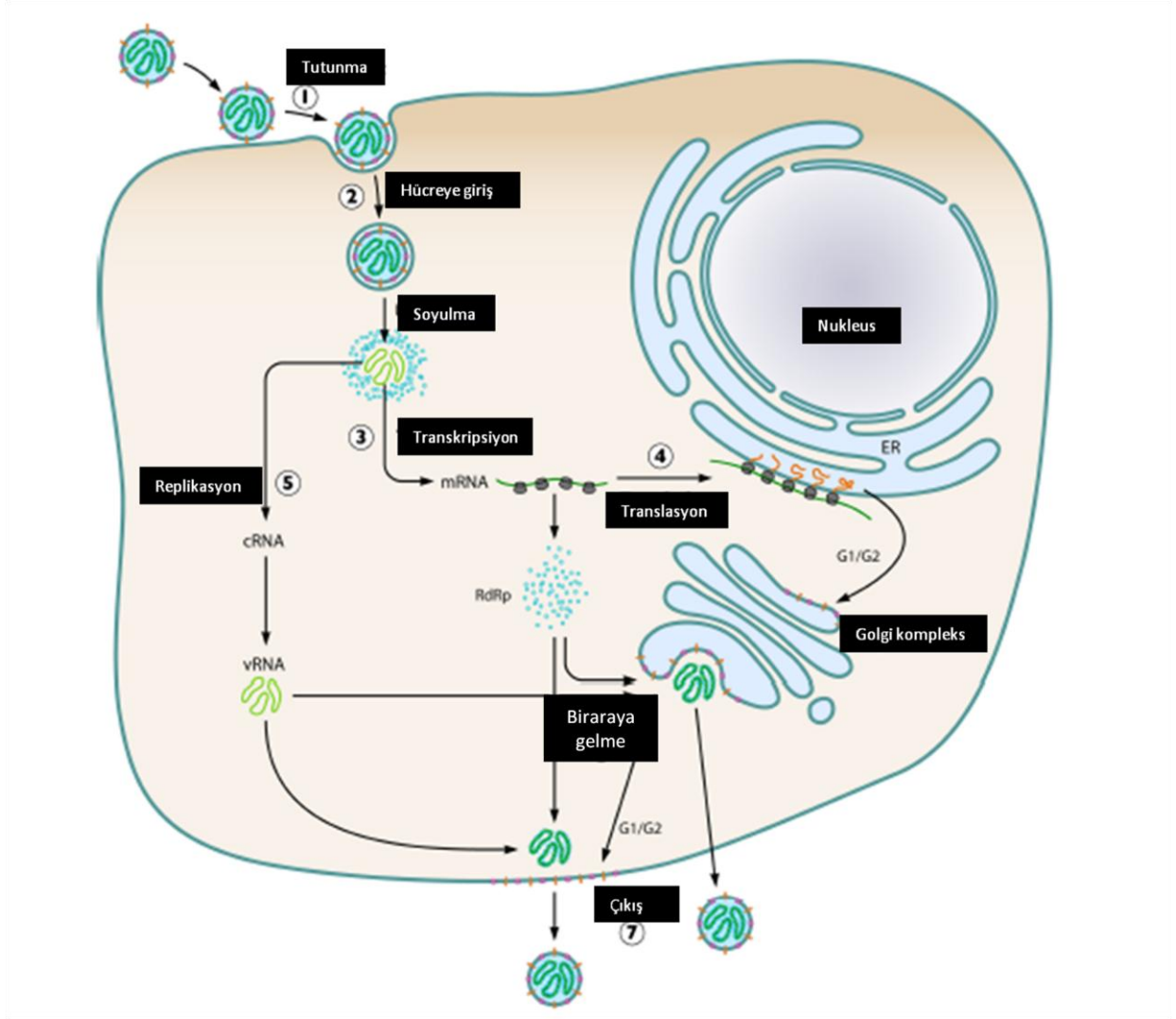
M segment (~ 3.7 kb), G1 (G_n) ve G2 (G_c) olarak adlandırılan zarf glikoproteinlerini kodlamaktadır. Bu glikoproteinler sistein rezidüleri bakımından zengindir. Hücreye girişte ve patogeneizde rol oynamaktadır. Konak hücre yüzeyindeki integrin reseptörleri ile etkileşime girmektedir. Nötralizan antikor yanıtını indüklemektedir.

L segment (~ 6.5 kb), virusun replikasyon döngüsünde görevli viral RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodlamaktadır. Polimeraz aktivitesinin yanı sıra helikaz, endonükleaz ve transkriptaz aktivitelere de sahiptir.

2.1.4. Yaşam Döngüsü

Hantaviruslar, pulmoner endotel hücrelerini, monositleri ve makrofajları enfekte etmektedirler (11, 12). Sahip oldukları viral glikoproteinler (G1 ve G2) ile konağın hücre yüzey reseptörlerine (integrinler ve adezyon molekülleri) tutunmaktadır. Patojenik hantavirus tipleri hücreye girişte $\beta 3$ integrinleri tercih ederken, patojenik olmayan hantavirus tipleri $\beta 1$ integrinleri tercih etmektedir (13, 14). Viral partikülün reseptörlere bağlanması ile endositoz başlar. Bu sırada endozom içerisinde pH'a bağlı olarak zarf glikoproteinlerinin konformasyonu değişir ve soyulma gerçekleşir. Viral genomu oluşturan üç segment ve RdRp'nin etkileşimi sonucunda viral RNA mRNA'ya dönüştürülerek, primer transkripsiyon tamamlanır. S ve L segmentlerine ait transkribe edilen mRNA'lar serbest ribozomlarda, M segmente ait transkribe edilen mRNA ise endoplazmik retikulum (ER) bağılı ribozomlarda translasyona uğrar. Zarf glikoproteinleri ER'de glikozillendikten sonra golgi kompleksine taşınmaktadır (14). Üretilen tüm komponentler, golgi kompleksinde birleşmektedir. Plazma membranında olgun virionlar haline geldikten sonra golgi veziküllerinden füzyon yoluyla salınır.

Transkripsiyondan sonra RdRp, S, M ve L segmente ait komplementer RNA'lardan viral RNA'ların replikasyonunu yapmaya başlar. Sentezlenen viral RNA'lar, N proteini tarafından kapsid ile çevrilir (14).



Şekil 2. Hantavirus yaşam döngüsü (14).

2.1.5. Rezervuarları ve Bulaş Yolları

Her bir hantavirus tipi belli bir kemirici türü ile taşınmakta ve bu kemirici türleri ile birlikte evrimleşmektedir. Dolayısıyla virusun yayılım alanı, taşıyıcısı olan kemirici türünün yayılım alanı ile sınırlıdır (15).

Hantaviruslar, Murinae ailesinin Murinae, Arvicolinae, Neotominae ve Sigmodontinae alt ailelerine mensup kemirici türleri ve bazı böcek yiyici türleri ile taşınmaktadır. Bunların yanı sıra kuşlar, kediler, tavşanlar ve iki farklı yarasa türünden de izole edilmiştir. Ancak kemiriciler dışındaki canlılardan izole edilen virus tiplerinin enfeksiyona neden olup olmadığı tam olarak açıklanamamıştır (16).

Hantaviruslar kemiricilerde asemptomatik kronik bir enfeksiyona neden olmaktadır. Enfeksiyon sırasında histopatolojik değişiklikler görölmektedir. Virus, akciğer, dalak ve böbrek gibi pek çok dokuda tespit edilebilmektedir. Enfekte olan kemiriciler yaşamları boyunca sekresyonları ile viral partikülleri çevreye saçarlar. Kemiriciler arasında horizontal bulaş görölebilmektedir. Vertikal bulaş olduğuna dair kanıt bulunamamıştır, ancak kemiriciler ile yapılan çalışmalarda dişilerin, hantavirusa karşı oluşan antikorlarını yavrularına aktardığı saptanmıştır. Tesadüfi konak olan insanlar ise enfekte partiküllerin inhalasyonu ve enfekte kemiricilere ait vücut ifrazatlarıyla doğrudan temas sonucunda enfekte olmaktadır (1, 15). Arjantin’de bir olguda Andes virusun insandan insana bulaştığı da bildirilmektedir (17). Kemiricilerin doğal olarak buldukları bölgelerde çalışan kişiler, enfeksiyon açısından riskli grubu oluşturmaktadırlar. Ayrıca kemiricilerin insanlara ait yaşam alanlarına girmesi de kontaminasyon nedenlerindedir (1, 18).

Kemirici popülasyonlarının buldukları habitatın durumuna, besin kaynağının varlığı ve ulaşılabilirliğine, yağışa, sıcaklığa ve çoğalma kapasitelerine göre sayılarında artış ya da azalış gözlenmektedir. Buna bağlı olarak da hantavirus tiplerinin neden olduğu enfeksiyonlar, kemirici sayısında artış olduğu yıllarda daha sık görölmektedir (18, 19).

2.1.6. Klinik

Hastalığın ayırt edici belirtileri olmaması ve şiddetinin etkene göre değişiklik göstermesi, tanı koyulmasını zorlaştırmaktadır. Etkene göre iki tür klinik tablo görölmektedir (18). Eski Dünya hantavirusları RSKA etkeni iken Yeni Dünya hantavirusları HPS etkenidir. Eski Dünya hantaviruslarından PUUV, RSKA’nın hafif bir formu olan epidemik nefropatiye neden olmaktadır.

RSKA’da inkübasyon süresi 2-4 haftadır. Hastalığın başlagıcında nezle benzeri belirtiler görülür. Hastalık, inkübasyon süresinden sonra ateşli dönem, hipotansif dönem, oligürük dönem, diüretik dönem ve konvelesan dönem olmak üzere beş dönem olarak görülür (Tablo 1) (18).

Tablo 1. RSKA dönemleri, süresi ve belirtileri (18, 20).

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, RSKA'ya göre daha ağır seyretmektedir. İnkübasyon süresi, 14-17 gündür. Prodrom dönem, kardiyopulmoner dönem ve konvelesan dönem olmak üzere üç dönem olarak görülmektedir (Tablo 2) (20).

Tablo 2. HPS dönemleri, süresi ve belirtileri (20).

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

2.1.7. Epidemiyoloji

HTNV'nin keşfedilmesinden sonra insan ve kemiriciler ile yapılan çalışmalar artmıştır (3). Önceleri RSKA etkenlerinin yalnızca kırsal alanlarda olduğu düşünülürken, SEOV'nin dünyanın farklı bölgelerindeki şehirlerde gösterilmesiyle bu görüş değişmiştir.

Dünya’da her yıl 60-100 bin kişi RSKA ve HPS tanısı almaktadır. RSKA olgularına en sık Asya’da rastlanmaktadır ve etkeni çoğunlukla HTNV’dir. Avrupa’daki RSKA olgularının etkeni ise genellikle DOBV’dir ve olguların büyük çoğunluğu ise İskandinav ülkelerinden bildirilmektedir. PUUV’nin etken olduğu, RSKA’nın daha hafif bir formu olan epidemik nefropati ise sıklıkla Avrupa’nın kuzeyinde, Rusya ve Balkanlar’da görülmektedir (1, 16).

HPS, % 20 fatalite hızı ile Amerika kıtasında önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Etkeni çoğunlukla Sin Nombre virustur (SNV) (18).

2.1.7.1. Türkiye’de Hantavirus epidemiyolojisi

Ülkemizde RSKA etkeni olan hantavirus tipleri görülmektedir. İlk çalışmalar 1993 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi’nde yapılmıştır. Bu çalışma sırasında 106 askeri personelin kanında hantavirus antikor varlığı araştırılmış ve negatif oldukları tespit edilmiştir (5).

Kavukçu ve ark. 1997 yılında akut ve kronik böbrek yetmezliği olan hastalar ile yaptığı çalışmada, nefropatili olguların % 4.3’ünde, sağlıklı olguların ise % 2.6’sında seropozitiflik saptanmıştır (21).

Laakkonen ve ark., 2004 yılında Trabzon, Rize ve İzmir çevresinde topladıkları kemiricilerde PUUV ve SAAV antikor prevalansını % 1.2 olarak bildirmiştir (22).

Ertek ve Buzgan tarafından yapılan çalışma ile Ocak-Mayıs 2009 tarihleri arasında Bartın ve Zonguldak Bölgesi’nde hantavirus enfeksiyonundan şüphelenilen 23 hastanın % 52.2’sinde hantavirus antijenlerine özgü antikor varlığı tespit edilmiştir (23).

Kaya ve ark. Mayıs 2009-Haziran 2012 yılları arasında hantavirus tanısı almış 100 hasta ile yaptığı çalışmada, hastaların % 20’sinde hantavirusa karşı antikor varlığı belirlenmiştir. Bu hastalardan % 85’i Doğu Karadeniz Bölgesi’nde yaşamakta iken, % 15’i Batı Karadeniz ve İç Anadolu Bölgesi’nde yaşamaktadır (24).

Servikal lenf düğümlerinde hassasiyet ve faringeal enfeksiyon ile İstanbul’da hastaneye başvuran bir hastada DOBV pozitifliği saptandığı Sarıgüzel ve ark. tarafından bildirilmiştir (25). Öncül ve ark. tarafından ise yine aynı yıl İstanbul’da Mart 2010 tarihinde yorgunluk,

ağrı, bulantı ve kusma Őikayetleri ile hastaneye başvuran bir kiŐide DOBV'e karşı immunglobulin M (IgM) pozitifliği saptandığı ve hastanın yoğun bakım ünitesine kaldırıldıktan iki gún sonra kaybedildiği bildirilmiştir (26).

Gözalan ve ark. Giresun'daki 626 sağlıklı bireyden aldıkları kan örneklerinde hantavirusa karşı immunglobulin G (IgG) pozitifliğini araŐtırmıŐ ve seroprevalansın % 3.2 olduğunu bildirmiŐlerdir (27).

2.1.8. İmmunoloji

Hantavirus tarafından kodlanan üç yapısal protein (N, G_n ve G_c), konakta immün yanıt oluŐumuna neden olmaktadır. Virusun hedefi olan akciğer ve böbreklerdeki hasar, virusa karşı oluşan immün yanıtta kaynaklanmaktadır. Enfeksiyon sırasında hem doğal hem de kazanılmıŐ immün yanıt rol oynamaktadır (28).

Hantaviral enfeksiyonun baŐlaması ile konak immunitesi interferonları (IFN) salgılanmakta, IFN indükleyen genleri aktive edilmekte ve antijen sunan hücrelerin seviyesini arttırmaktadır. Enfeksiyon boyunca kompleman sistemin klasik ve alternatif yolları aktif durumdadır. Doğal öldürücü (NK) hücrelerin, akciğer ve böbrek gibi enfekte dokulara göç edebilecekleri düşünölmektedir (28, 29).

Enfeksiyonun erken döneminde virusa özđu IgM antikorları saptanabilmektedir. Akut dönemde IgG seviyesindeki artış, erken konvelasan dönemde de devam etmektedir. IgG antikorları, enfeksiyon geçirildikten yıllar sonra bile saptanabilmektedir. Hantavirusun yapısal proteinlerine karşı IgG'nin alt sınıflarından IgG1 ve IgG3 antikorlarında artış saptanırken, IgG2 antikorları nadiren saptanmaktadır. IgG4 antikorları ise yalnızca RSKA'lı hastalarda saptanabilmiŐtir (28, 30, 31). IgA antikorları da IgM antikorları gibi erken dönemde saptanabilmektedir (32). Virus titresinin azaltılmasında nötralizan antikorlar rol oynamaktadır (33).

RSKA ve HPS'nin patojenitesinde ve viral temizlenmede T hücreleri önemli rol oynamaktadır. Enfeksiyon baŐladıktan sonra hafıza T hücrelerinde artış gözlenmekte ve enfeksiyon boyunca bu hücrelerin matürasyonu devam etmektedir (30). Enfeksiyon sırasında CD8⁺ T hücrelerinde artış gözlenirken, CD4⁺ T hücre sayısında değişiklik görülmemektedir

(28). Hastalığın başlamasıyla birlikte CD8⁺ T hücrelerindeki artışın yanı sıra IFN- gamma (γ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL)-2 ve IL-6 sitokinlerinde de artış görülmektedir. Bu sitokinler, RSKA ve HPS semptomlarından olan ateş, septik şok ve akut faz protein indüksiyonundan sorumludurlar (30, 34, 35).

Hantavirus ile enfekte kişilerde, enfeksiyonun erken döneminde immun yanıt T_h1 yönünde iken, ileriki dönemlerde bu yanıt T_h2 yönüne kaymaktadır (15).

RSKA'lı hastalarda oluşan hasara genetik faktörlerin neden olabileceği gösterilmiştir. İnsan lökosit antijen (HLA) genlerinde B8, DR3 ve DRQ2 alellere sahip hastalarda hantaviral enfeksiyon daha ağır seyreder ve diyaliz ihtiyacı daha sık görülürken, B27 alelline sahip hastalarda enfeksiyon daha hafif seyrettiği görülmektedir. B35 allelinin ise HPS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.1.9. Laboratuvar Tanısı

2.1.9.1. Serolojik testler

Hantavirus enfeksiyonlarının tanısında tercih edilen yöntem, serolojik testlerdir. Bunun nedenleri moleküler yöntemlerin duyarlılığının düşük olması, vireminin kısa süreli olması ve viremi düzeyinin Bunyaviridae ailesinin diğer üyelerinden daha düşük olmasıdır. Hem RSKA hem de HPS olgularında N proteinine karşı IgM ve IgG antikorları oluşmaktadır. Erken tanıda IgM antikor varlığının gösterilmesi önem taşımaktadır, ancak kısa bir süre için saptanabildiğinden genellikle IgG antikor varlığının gösterilmesi tercih edilmektedir. Farklı zamanlarda alınan örneklerde saptanan dört katlık titre artışı tanı koydurucudur (36).

Avrupa ve Asya'da RSKA olgularının tanısında indirekt immunofloresans testi (IFA) kullanılmaktadır. Test, hantavirus ile enfekte hücrelerin lam üzerine fikse edilmesiyle hazırlanmaktadır. Virus ile enfekte hücreler, hücre kültüründe üretildiği ve biyogüvenlik düzey 3 laboratuvarlar gerektiği için bu yöntem tercih edilmemektedir. Bunun yerine rekombinant DNA teknikleri ile üretilen hantavirus antijenlerinin tespit edilebildiği yöntemler tercih edilmektedir (14).

Tanıda en sık kullanılan yöntem, indirekt ELISA'dır. Bu yöntem için antijen olarak virus ile enfekte lizatlar ya da pürifiye edilmiş N proteini kullanılabilir (14).

İmmunoblot ve nötralizasyon testleri de tanıda kullanılabilir. Ancak nötralizasyon testlerinin özgüllüğü yüksek olmasına rağmen maliyeti yüksek, zahmetli ve biyogüvenlik düzey 3 laboratuvarlar gerektirmesi nedeniyle tercih edilmemektedir (14). İmmunoblot testleri ise duyarlılığı ve özgüllüğü ELISA'dan daha yüksek testlerdir. Bu nedenle ELISA testlerinin doğrulanmasında kullanılırlar.

2.1.9.2. Moleküler tanı

Moleküler yöntemlerin duyarlılığı serolojik yöntemlere göre daha düşük olmasına rağmen daha hızlı olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler. Özellikle HPS'nin hızlı ilerlemesi ve fatalite oranının yüksek olması nedeniyle önem kazanmaktadır. Ters ("reverse") transkripsiyon-polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) ile hasta örneklerinde viral genomun varlığı bir gün içerisinde gösterilebilmektedir. Viremi düşük olduğundan viral RNA'yı tespit etmek güç olsa da doku örneklerinde yuvalanmış ("nested")-RT-PZT ile saptanabilir (14). Ayrıca Hantavirus tipleri arasında çapraz tepkime olabildiğinden, serolojik yöntemlerle ayırt edilemeyen tipler PZT ürünlerinin dizilenmesi ile tespit edilebilmektedir (36).

Hantavirus tanısında, serolojik testler ile moleküler yöntemlerin birlikte kullanılması ile daha doğru ve hızlı sonuçlar alınabilecektir.

2.1.10. Tedavi ve Korunma

Hantaviral enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak spesifik bir antiviral ajan bulunmamaktadır. Bu nedenle destek tedavisi uygulanmaktadır. RSKA'lı hastalar ve kemirici modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, bir guanozin analogu olan ribavirinin, hantavirusun *in vitro* gelişimini inhibe ederek, virus titresinde ve mortalitede düşüş sağladığını göstermektedir. Ancak HPS'li hastalar ile yapılan çalışmalarda ise ribavirinin tedaviyi ve mortaliteyi etkilemediğine dair kanıtlar elde edilmiştir (37).

IFN- α , - β ve - γ ile önceden işlenen Vero E6 hücrelerinde doza bağlı olarak HTNV replikasyonunun inhibe olduğu ve bu üç IFN'dan en etkilisinin de IFN- β olduğu gösterilmiştir (38).

Hantaviral enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak etkin bir ajan bulunmadığından, aşı çalışmaları ve enfeksiyondan korunma önem taşımaktadır. Aşı geliştirme çalışmaları, inaktif virus ve rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak devam etmektedir. Geliştirilen aşilar içerisinde ticari olarak satılmakta olan tek aşı, HantavaxTM'tir. 1990 yılında üretilen ve HTNV'a karşı etkili olan bu aşı, Dünya Sağlık Örgütü tarafından onaylanmadığından yalnızca Asya'da kullanılmaktadır. Kore'deki RSKA oranını % 45 azalttığı bildirilmiştir (39-41).

Enfeksiyondan korunmanın en iyi yolu, enfekte kemiriciler ve onların ifrazatları ile temastan kaçınmaktır. Böyle bir durumda temas edilen bölge temizlenmeli ve doktora başvurulmalıdır (20, 37). Hantaviruslar ultraviyole (UV) ışını, % 1 sodyum hipoklorit, % 2 glutraldehit ve % 70 etanole duyarlıdır. Asidik ortamlarda ve 30 dakika uygulanan 60°C sıcaklık karşısında kolayca inaktive olurlar (16). Ayrıca kemirici populasyonlarında hantavirus prevalansının belirlenmesi, insan olgularının durumu hakkında bilgi sağlayabilecektir. Bu yüzden kemirici populasyonlarının takibinin sağlanması önem taşımaktadır.

2.2. İmmunoserolojik Yöntemler

İmmunoserolojik yöntemler, antijenlerin ya da antikorların tespit edilmesinde ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan immunokimyasal tekniklerden biridir. Antikor yakalayan testler, antijen yakalayan testler ve iki antikoru bağlayan sandviç testler olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar.

Antikor yakalayan testlerde, solid faz antijen ile kaplanmakta ve antikor içeren serum örnekleri ile inkübe edilmektedir. Serum içerisindeki diğer bileşenler, yıkama basamakları ile uzaklaştırılmaktadır. Enzim ile işaretli antikoru eklenmesi ile konjugat, antijen-antikor kompleksini oluşturmaktadır (Şekil 3). Substratta meydana gelen renk değişiminin spektrofotometre ile ölçülmesiyle antikor miktarı belirlenmektedir (42).



Şekil 3. Antikor yakalayan immunoserolojik testlerin çalışma prensibi (43).

Antijen yakalayan testlerde, solid faz antikor ile kaplanmakta ve antijen ile inkübe edilmektedir. Bağlanmayan antijenler, yıkama basamakları ile uzaklaştırılmaktadır. Enzim ile işaretli antikor içeren konjugatın eklenmesi ile antijenler solid faza bağlanmaktadır (Şekil 4). Substratta meydana gelen renk değişiminin spektrofotometre ile ölçülmesiyle antikor miktarı belirlenmektedir (42).



Şekil 4. Antijen yakalayan immunoserolojik testlerin çalışma prensibi (43).

İki antikorlu bağlayan sandviç testlerde ise solid faz antikor ile kaplanmakta ve antijen bu antikora bağlanmaktadır. Antijene, işaretli ikinci antikor bağlanmakta ve bu antikorun miktarı ölçülmektedir (42).

2.2.1. İmmunoserolojik Yöntemlerin Validasyonunda Rol Oynayan Faktörler

Validasyon, araştırılan testin performansının ve güvenilirliğinin belirlenmesi için uygulanan bir süreçtir. Bu süreç, altın standart olarak kabul edilen bir tanı testi varlığında uygulanabilir. Araştırılan testin yanı sıra altın standart olarak kabul edilen testin de tüm örneklerle uygulanması gerekir (44).

2.2.1.1. Eşik değerinin belirlenmesi

Araştırılan test için eşik değerinin belirlenmesi, test edilen örneklerin pozitif ve negatif olarak kategorize edilmesini sağlar. Böylece testin duyarlılığı ve özgüllüğü de tespit edilebilir.

Eşik değeri, enfekte olan ve olmayan örneklerin dağılımına bağlı olarak belirlenir. Bunun için iki yöntem uygulanabilir. Bunlardan biri “Receiver operating characteristic” (ROC) analizi, diğeri ise enfekte olmayan örneklere göre eşik değeri belirlenmesidir (44).

2.2.1.2. Duyarlılık ve özgüllük

Araştırılan test ve altın standart olarak kabul edilen testin tüm örneklere uygulanması ile elde edilen sonuçlar, dört gözlü tabloda değerlendirilir. Tablonun sütunlarına altın standart olarak kabul edilen testten elde edilen veriler, satırlarına ise araştırılan testten elde edilen veriler yerleştirilir. Bu durumda, altın standart testin pozitif dediği örnekler kesin olarak pozitif, negatif dediği örnekler ise kesin olarak negatif kabul edilecektir (45).

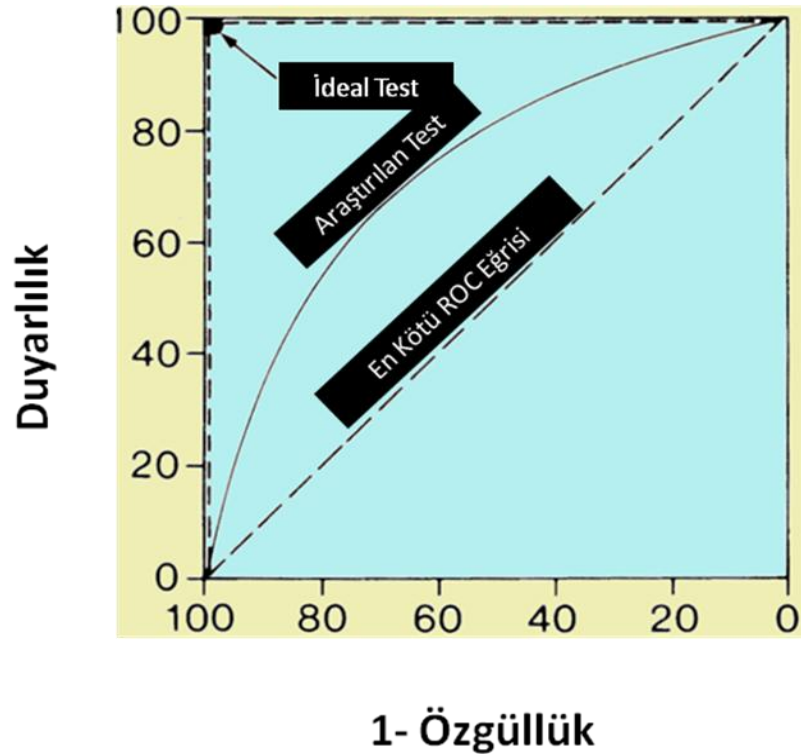
		Altın Standart	
		Gerçek pozitif	Gerçek negatif
Tanı Testi	Pozitif	Gerçek pozitif a	Yalancı pozitif b
	Negatif	Yalancı negatif c	Gerçek negatif d

Şekil 5. Duyarlılık ve özgüllük değerlendirme tablosu (45).

Gerçek pozitif ve gerçek negatif gözlerde elde edilen değerler ne kadar yüksek ise, araştırılan test o kadar geçerli sayılır. Testin geçerliliğın değerlendirilmesinde duyarlılık ve özgüllük olmak üzere iki kavram önem taşımaktadır. Duyarlılık ($a/a+c$), bir testin gerçek pozitif olgular arasında pozitifleri yakalayabilme gücüdür. Özgüllük ($d/b+d$) ise gerçek negatif kişiler arasında negatifleri yakalayabilme gücüdür (Şekil 5) (45).

2.2.1.2.1. ROC analizi

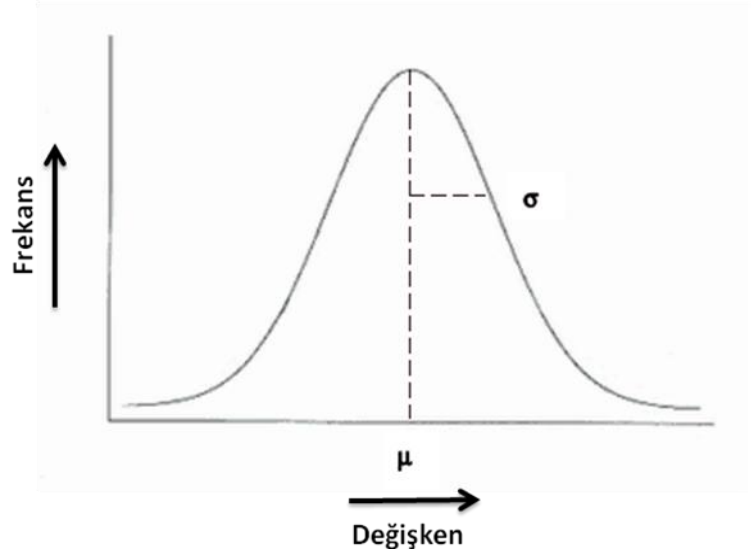
ROC analizi, elde edilen duyarlılık ve özgüllük değerlerinin bir grafik üzerinde değerlendirilmesini sağlar. ROC eğrisinin x ekseninde yalancı pozitifler (1- özgüllük), y ekseninde ise gerçek pozitifler (duyarlılık) yer alır. Çizilen eğrinin altında kalan alanın 1.0'e ulaştığında eğri, tüm kareyi kapsar ve duyarlılık ile 1- özgüllük değerleri en yüksek düzeye ulaşır. Eğrinin koordinatlarının değiştirilmesi ile farklı eşik değerlerinde duyarlılık ve özgüllükteki değişim gözlenebilir (Şekil 6). Böylelikle ROC eğrisi, en uygun eşik değerinin belirlenmesinde yardımcı olur (45).



Şekil 6. Duyarlılık ve özgüllüğün farklı değerlerinde ROC eğrisinin görünümü.

2.3. Normal Dağılım

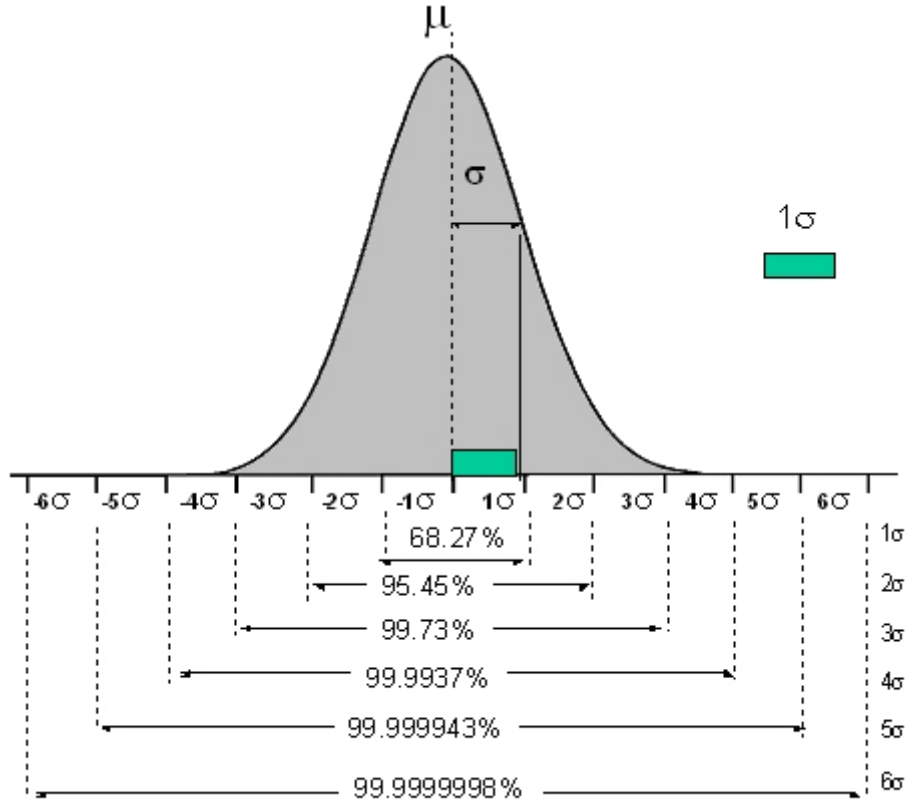
Normal dağılım, değişkenlerin frekansa göre dağılımını x ve y eksenleri üzerinde göstermektedir. Evren verisinin ortalamasının (μ) ve standart sapmasının (σ) farklı değerleri için farklı normal dağılımlar oluşmaktadır (Şekil 7) (46).



Şekil 7. Evrenden elde edilen verinin normal dağılım eğrisi (46).

Normal dağılım, çan eğrisi biçimindedir. Çok düşük ve çok yüksek değerlere sahip olan değişkenler daha az görüleceğinden, frekansları düşük olacak ve eğrinin sağ ve sol uçlarında yer alacaklardır. Ortalama değerlere sahip değişkenlerin ise frekansları yüksek olacağından, eğrinin orta kısmında yer alacaklardır. Dağılım, ortalamaya göre simetriktir. Ortalamadan geçen çizginin sağında ve solunda kalan alanlar, birbirleri ile örtüşmektedir (46).

Değişkenlerin % 68.27'si, örneklem grubunun ortalamasının (\bar{x}) 1 standart sapma (-1S, +1S) uzaklığındaki noktalar arasında bulunmaktadır. Değişkenlerin % 95.45'i \bar{x} 'den 2S uzaklık aralığında, % 99.73'ü ise \bar{x} 'den 3S uzaklık aralığında bulunmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Her σ değeri için değişkenlerin dağılımdaki yüzdesi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

“Türkiye’nin Batı Bölgelerinde Hantavirus Araştırılması: Trakya Bölgesi kemiricilerinde Hantavirus antikorlarının prevalansının araştırılması” adlı tez çalışması, deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2011-2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmada hantavirus taşıyıcısı olduğu bilinen kemirici türlerinden alınan serum örnekleri kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada, 27-30 Temmuz 2009 tarihinde Kırklareli İğneada bölgesinde yapılan saha çalışması sırasında tuzak kapanlar ile doğada yakalanan kemirici türlerinden alınan, 84 adet serum örneği kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmadaki bağımlı değişken, Hantavirus IgG izotipindeki antikorlar iken bağımsız değişken, kemiricilerde hantavirus varlığıdır.

3.6. Veri toplama araçları

3.6.1. ELISA optimizasyonu

Kemirici serumlarının hantavirus açısından taranmasında kullanılacak herhangi bir ticari kit bulunmadığından, insan serumu ile çalışmaya uygun olan HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı Anti-Hanta virus Pool ELISA (IgG) plakları (Euroimmun, Almanya) kullanılmıştır. Kitin, kemirici serumları ile çalışılmak üzere optimize

edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle negatif ve pozitif örnekler arasındaki ayrımın en iyi şekilde yapılabildiği serum ve konjugat konsantrasyonlarının belirlenmesi için farklı dilüsyonlar denenmiştir.

Pozitif ve negatif oldukları bilinen iki kemirici serumu, 1/50, 1/100 ve 1/200 oranlarında PBS ile seyreltilmiş ve bir dakika vorteksledikten sonra 30 saniye santrifüjlenmiştir. HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı Anti-Hanta virus Pool ELISA (IgG) plağındaki (Euroimmun, Almanya) her bir kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş serum örneği eklenmiştir. Her serum örneği çift kuyucuk çalışılmıştır. Seyreltilmiş serum örneği eklenen plak, 37°C'de bir saat orbital inkübatörde (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmıştır. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanılmış ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, havlu kağıda vurularak tamamen boşaltılmıştır. Yıkama sonrasında kuyucuklara, 1/10.000, 1/20.000 ve 1/40.000 oranlarında PBS ile seyreltilmiş "horseradish" peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore 12-349, ABD) 100 µL eklenmiş ve 37°C'de bir saat orbital inkübatörde (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmıştır. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanılmış ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, havlu kağıda vurularak tamamen boşaltılmıştır. Her kuyucuğa 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit (TMB/H₂O₂) kromojen/substrat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında substrat solüsyonunun üzerine 100 µL 0.5 M sülfirik asit (H₂SO₄) eklenerek, tepkime durdurulmuş ve 30 dakika içerisinde örneklerin optik dansiteleri (OD), mikroplak okuyucuda (Thermo Scientific 51119000, ABD) 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçülmüştür.

3.6.2. Eşik Değerinin Belirlenmesi

Giresun, Yozgat ve Burdur'da yapılan saha çalışmalarında yakalanan, *Microtus sp.*, *Apodemus mystacinus*, *Apodemus flavicollis*, *Mus macedonicus*, *Myodes glareolus* türlerine ait 16 adet negatif serum örneği, optimize edilen ELISA yöntemi ile iki farklı günde taranmıştır.

Kemiricilere ait serum örnekleri 1/50 oranında PBS ile seyreltilmiş ve bir dakika vortekslelendikten sonra 30 saniye santrifüjlenmiştir. HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı Anti-Hanta virus Pool ELISA (IgG) plağındaki (Euroimmun, Almanya) her bir kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş serum örneği eklenmiştir. Her serum örneği çift kuyucuk çalışılmıştır. Seyreltilmiş serum örneği eklenen plak, 37°C’de bir saat orbital inkübatörde (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmıştır. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanılmış ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, havlu kağıda vurularak tamamen boşaltılmıştır. Yıkama sonrasında kuyucuklara, 1/10.000 oranında PBS ile seyreltilmiş HRP enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore 12-349, ABD) 100 µL eklenmiş ve 37°C’de bir saat orbital inkübatörde (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmıştır. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanılmış ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, havlu kağıda vurularak tamamen boşaltılmıştır. Her kuyucuğa 100 µL TMB/H₂O₂ kromojen/substrat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında substrat solüsyonunun üzerine 100 µL 0.5 M H₂SO₄ eklenerek, tepkime durdurulmuş ve 30 dakika içerisinde örneklerin OD’leri, mikropalak okuyucuda (Thermo Scientific 51119000, ABD) 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçülmüştür.

3.6.3. Örneklerin Taranması

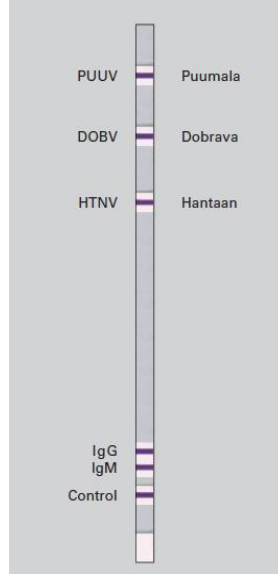
27-30 Temmuz 2009 tarihinde Kırklareli İğneada bölgesinde yapılan saha çalışması sırasında yakalanan, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus agrarius*, *Apodemus witherbyi*, *Microtus guentheri* türlerinden 84 adet kemiriciye ait serum örneği, optimize edilen ELISA yöntemi ile taranmıştır.

Kemiricilere ait serum örnekleri 1/50 oranında PBS ile seyreltilmiş ve bir dakika vortekslelendikten sonra 30 saniye santrifüjlenmiştir. HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı Anti-Hanta virus Pool ELISA (IgG) plaklarındaki (Euroimmun, Almanya) her bir kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş serum örneği eklenmiştir. Her serum örneği çift kuyucuk çalışılmıştır. Seyreltilmiş serum örneği eklenen plak, 37°C’de bir

saat orbital inkübatörde (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmıştır. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanılmış ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, havlu kağıda vurularak tamamen boşaltılmıştır. Yıkama sonrasında kuyucuklara, 1/10.000 oranında PBS ile seyreltilmiş HRP enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore 12-349, ABD) 100 µL eklenmiş ve 37°C’de bir saat orbital inkübatörde (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldıktan sonra deterjan içeren yıkama tamponu ile üçer kez yıkanmıştır. Her yıkamada, her bir kuyucuk için 300 µL yıkama tamponu kullanılmış ve 30-60 saniye hafifçe çalkalanarak bekletildikten sonra plak, havlu kağıda vurularak tamamen boşaltılmıştır. Her kuyucuğa 100 µL TMB/H₂O₂ kromojen/substrat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında substrat solüsyonunun üzerine 100 µL 0.5 M H₂SO₄ eklenerek, tepkime durdurulmuş ve 30 dakika içerisinde örneklerin OD’leri, mikropalak okuyucuda (Thermo Scientific 51119000, ABD) 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçülmüştür.

3.6.4. Immunoblot Optimizasyonu

İnsan serumu ile çalışmaya uygun olan, HTNV, PUUV ve DOBV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş Euroline Anti-Hanta Profile 1 (IgG) stripleri (Euroimmun, Almanya) kullanılmıştır (Şekil 9). Yöntemin kemirici serumları ile çalışılmak üzere optimize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle negatif BALB/c serumları kullanılarak, oluşan bantların en doğru şekilde yorumlanabildiği serum ve konjugat konsantrasyonlarının belirlenmesi için farklı dilüsyonlar denenmiştir. Substrat ve inkübasyon parametreleri ise üretici firmanın önerdiği şekilde uygulanmıştır.



Şekil 9. Hantavirus tiplerine göre oluşan IgG yanıtının striplerdeki görünümü.

Serum ve konjugat dilüsyonları ve yıkama basamakları, 1x olacak şekilde distile su ile seyreltilen, genel tampon ile yapılmıştır. Hazırlanan tüm dilüsyonlar, aynı gün içerisinde kullanılmıştır. Kullanılacak her bir strip, inkübasyon tepsisine yerleştirilmiş ve 1,5 mL bloklama tamponu içerisinde 15 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında sıvı aspire edilmiş ve strip üzerine 1,5 mL 1/50 ve 1/100 oranlarında 1x genel tampon ile seyreltilmiş BALB/c kemiricilere ait serumlar eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında serum örnekleri aspire edilmiş ve üçer kez beşer dakika 1,5 mL 1x genel tampon içerisinde çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilerek, yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 1/5.000 ve 1/10.000 oranlarında 1x genel tampon ile seyreltilmiş alkalen fosfataz (AP) enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Santa Cruz Biotechnology sc-2008, ABD) 1,5 mL eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında konjugat aspire edilmiş ve üçer kez beşer dakika 1,5 mL 1x genel tampon içerisinde çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) üzerinde inkübe edilerek, yıkanmıştır. Yıkama sonrasında her bir strip üzerine 1,5 ml nitrobluetetrazoliumklorid/5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat (NBT/BCIP) substrat solüsyonu eklenerek, 10 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD)

inkübe edilmiştir. Substrat solüsyonu aspire edildikten sonra her bir strip, üçer kez birer dakika distile su ile yıkanmış ve kuruduktan sonra değerlendirilmiştir.

3.6.5. Örneklerin Immunoblot ile Doğrulanması

ELISA testi ile taranan 84 örnekten 82'sine immunoblot testi uygulanmıştır. ELISA testi ile pozitif olduğu saptanan iki örneğin serum miktarı yeterli olmadığı için, bu örneklerle immunoblot testi uygulanamamıştır.

Serum ve konjugat dilüsyonları ve yıkama basamakları, 1x olacak şekilde distile su ile seyreltilen, genel tampon ile yapılmıştır. Hazırlanan tüm dilüsyonlar, aynı gün kullanılmıştır. Kullanılacak her bir strip, inkübasyon tepsisine yerleştirilmiş ve 1,5 mL bloklama tamponu içerisinde 15 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında sıvı aspire edilmiş ve strip üzerine 1,5 mL 1/100 oranında 1x genel tampon ile seyreltilmiş serumlar eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında serum örnekleri aspire edilmiş ve üçer kez beşer dakika 1,5 mL 1x genel tampon içerisinde çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilerek, yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 1/5.000 oranında 1x genel tampon ile seyreltilmiş AP enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Santa Cruz sc-2008, ABD) 1,5 mL eklenerek, 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında konjugat aspire edilmiş ve üçer kez beşer dakika 1,5 mL 1x genel tampon içerisinde çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilerek, yıkanmıştır. Yıkama sonrasında her bir strip üzerine 1,5 ml NBT/BCIP substrat solüsyonu eklenerek, 10 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Labnet International S-1000, ABD) inkübe edilmiştir. Substrat solüsyonu aspire edildikten sonra her bir strip, üçer kez birer dakika distile su ile yıkanmış ve kuruduktan sonra değerlendirilmiştir.

3.6.6. İstatistiksel Analiz

Optimize edilen ELISA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü, ortalamaya eklenen her bir S değeri için hesaplanmış ve en uygun değer, eşik değeri olarak belirlenmiştir. Veriler, SPSS 17.0 paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Belirlenen eşik değerinin doğruluğu, ROC eğrisi ile sınanmıştır.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 3. Araştırma planı ve iş süreleri.

	2011	2012	2013
İş Tanımı			
Literatür taranması ve tez önerisinin teslim edilmesi	Haziran-Kasım		
ELISA optimizasyonu		Mart	
Örneklerin ELISA ile taranması		Ağustos	
Immunoblot optimizasyonu		Kasım	
Örneklerin immunoblot ile doğrulanması		Aralık	
Sonuçların yorumlanması ve istatistiksel analiz			Ocak
Tezin yazılması			Ocak-Nisan

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sırasında elde edilen veriler, kemirici türleri ile hantavirusa özgü antikorların varlığı yönünden iki farklı yöntem ile değerlendirilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Kemirici serumlarının hantavirus açısından taranmasında kullanılabilecek herhangi bir ticari kit bulunmamaktadır. Bu nedenle insan serumu ile çalışmaya uygun olan Anti-Hanta virus Pool ELISA (IgG) plakları (Euroimmun, Almanya) ve Euroline Anti-Hanta Profile 1 (IgG) immunoblot stripleri (Euroimmun, Almanya) kullanılmıştır. Uygulanacak yöntemlerin kemirici serumlarına göre optimize edilmesi, araştırmanın sınırlılıklarından birisidir.

Çalışmanın bir diğeri sınırlılığı ise kemiricilerin tür tayininin fenotipik olarak yapılmış olmasıdır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun 05.06.2009 ve 22.07.2011 tarihli 41/2009 protokol numaralı kararları, EK-I'de verilmiştir.

4. **BULGULAR**

4.1. **ELISA Optimizasyonu**

ELISA testi için optimal serum dilüsyonu 1/50, konjugat dilüsyonu ise 1/10.000 olarak belirlenmiştir. Kırklareli İğneada bölgesinde yakalanan kemiricilere ait serum örneklerinin taranmasında, belirlenen serum ve konjugat dilüsyonları uygulanmıştır.

4.2. **Eşik Değerinin Belirlenmesi**

Giresun, Yozgat ve Burdur'da yapılan saha çalışmalarında yakalanan, *Microtus sp.*, *Apodemus mystacinus*, *A. flavicollis*, *Mus macedonicus*, *Myodes glareolus* türlerine ait 16 adet negatif serum örneği iki farklı günde taranmış ve örneklerin $\bar{x} + 3S$ 'ye denk gelen 0,187 OD değeri ve altındaki değerler negatif; $\bar{x} + 3S$ ile $\bar{x} + 6S$ arasındaki değere denk gelen 0,187 ve 0,325 OD değerleri arasında kalan değerler "grey zone"; $\bar{x} + 6S$ 'ye denk gelen 0,325 OD değeri ve üzerindeki değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.3. **Örneklerin Taranması**

27-30 Temmuz 2009 tarihinde Kırklareli İğneada bölgesinde yapılan saha çalışması sırasında yakalanan, 84 kemiriciden 22'sinde belirlenen eşik değerine göre hantavirusa karşı antikor pozitifliği, 10'unun ise "grey zone" olarak belirlenen değerler arasında olduğu saptanmıştır. Antikor pozitifliği saptanan 22 örnekten 13'ü *A. flavicollis* türüne, dördü *A. agrarius* türüne, üçü *M. guentheri* türüne, biri *A. sylvaticus* türüne, biri de *A. witherbyi* türüne aittir. *A. flavicollis* türüne ait iki örneğe, serum miktarları yetersiz olduğu için, immunoblot testi uygulanamamıştır. "Grey zone" değerleri arasında olan örneklerden yedisi *A. flavicollis* türüne, ikisi *M. guentheri* türüne, biri ise *A. sylvaticus* türüne aittir.

4.4. **Immunoblot Optimizasyonu**

İmmunoblot testi için optimal serum dilüsyonu 1/100, konjugat dilüsyonu ise 1/5.000 olarak belirlenmiştir (Şekil 10). Kırklareli İğneada bölgesinde yakalanan kemiricilere ait serum örneklerinin doğrulanmasında, belirlenen serum ve konjugat dilüsyonları uygulanmıştır.



Şekil 10. Optimal serum ve konjugat dilüsyonlarında striplerdeki bant intensitesi.

4.5. Örneklerin Immunoblot ile Doğrulanması

Kırklareli İğneada bölgesinde yakalanan kemiricilerden ELISA testi ile antikor pozitifliği saptanan 20 örnekten 16'sında DOBV pozitifliği, birinde de PUUV pozitifliği tespit edilmiştir. Üç örnek ise ELISA sonucu pozitif olmasına rağmen immunoblot testi ile negatif olarak belirlenmiştir. DOBV pozitifliği saptanan 16 örnekten dokuzu *A. flavicollis*, üçü *A. agrarius*, ikisi *M. guentheri*, biri *A. sylvaticus* ve biri *A. witherbyi* türlerine ait iken, PUUV pozitifliği saptanan bir örnek, *A. flavicollis* türüne aittir. Negatif olarak belirlenen örnekler ise *A. flavicollis*, *A. agrarius* ve *M. guentheri* türlerine aittir.

ELISA testi ile “grey zone” değerleri arasında kalan ve negatif olarak belirlenen 62 örneğin tümünün negatif olduğu immunoblot testi ile de doğrulanmıştır.

4.6. İstatistiksel Analiz

Optimize edilen ELISA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü, ortalamaya eklenen her bir S değeri için hesaplanmış, duyarlılığın ve özgüllüğün en yüksek olduğu $\bar{x} + 6S$ değeri (OD değeri 0,325), eşik değeri olarak belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Ortalamaya eklenen her bir S için duyarlılık ve özgüllük değerleri.

$\bar{x} + 3S$ (OD 0,187)		İmmunoblot	
		+	-
ELISA	+	17	12
	-	0	53

Duyarlılık: %100 | **Özgüllük: %82**

$\bar{x} + 4S$ (OD 0,233)		İmmunoblot	
		+	-
ELISA	+	17	6
	-	0	59

Duyarlılık: %100 | **Özgüllük: %91**

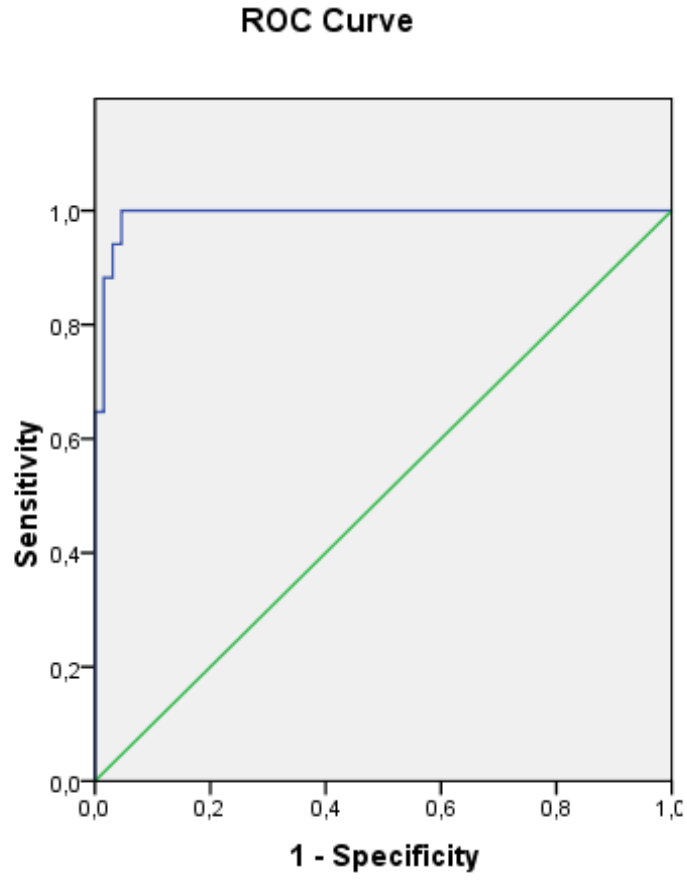
$\bar{x} + 5S$ (OD 0,279)		İmmunoblot	
		+	-
ELISA	+	17	4
	-	0	61

Duyarlılık: %100 | **Özgüllük: %94**

$\bar{x} + 6S$ (OD 0,325)		İmmunoblot	
		+	-
ELISA	+	17	3
	-	0	62

Duyarlılık: %100 | **Özgüllük: %95**

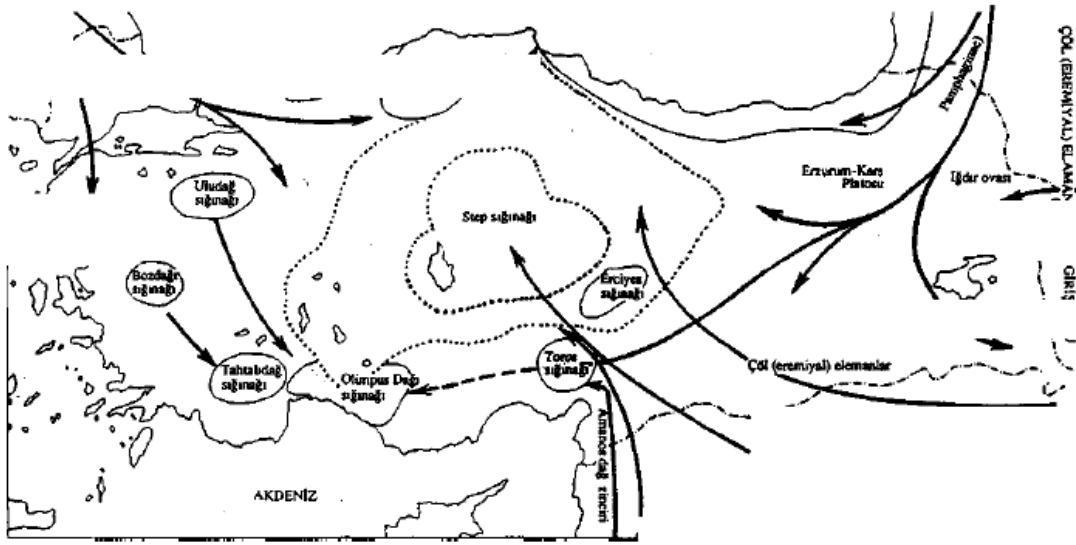
ROC eğrisi ile duyarlılık ve özgüllüğün en yüksek olduğu eşik değeri, 0,326 olarak belirlenmiştir (Şekil 11). Elde edilen bu değer, daha önce belirlenen eşik değeri ile uyumludur.



Şekil 111. Kırklareli İğneada bölgesinde yakalanan kemirici serumlarının OD değerlerine ait ROC eğrisi.

5. TARTIŞMA

Çalışma için Kırklareli İğneada bölgesi seçilmiştir. Kırklareli, türlerin Anadolu'ya giriş kapılarından biri üzerinde bulunmaktadır (Şekil 12) (47). Bu nedenle özellikle memeli tür çeşitliliği açısından oldukça zengindir. Hantavirus taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türlerinden *A. agrarius*, Türkiye'de yalnızca Trakya Bölgesi'nde yayılış göstermektedir. Ayrıca Hantavirus taşıyıcısı olan diğer kemirici türlerinden *A. flavicollis* ve *M. glareolus* da bu bölgede bulunmaktadır.



Şekil 12. Türlerin Anadolu'ya giriş kapıları (47).

İnsanlarda Hantavirus antikorlarının belirlenmesinde kullanılabilecek ticari ürünler mevcut iken, kemiricilerdeki durumun belirlenmesi için kullanılabilecek ürünler bulunmamaktadır. Bu çalışma ile kemirici serumlarının taranmasında kullanılabilecek, kolaylıkla ulaşılabilen ticari ürünlerin kullanıldığı ve güvenilir sonuçların elde edildiği bir yöntem oluşturulmaya çalışılmıştır.

Kullanılacak ELISA testinin kemirici serumları için optimize edilmesi ve eşik değer belirlenmesinde olabildiğince farklı türe ait ve fazla sayıda negatif serum örneğinin taranması önem taşımaktadır. Bu çalışma için, üç farklı bölgeden toplanan farklı türlerden 16 adet negatif kemiriciye ait serum örnekleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, 16

adet farklı tür kemiriciye ait serum örneğinin, örneklerin pozitif ve negatif olarak ayırt edilmesinde yeterli olduğu görülmektedir.

Optimize edilen ELISA testi ile Hantavirus antikor pozitifliği saptanan 22 kemiriciden % 59.1'i *A. flavicollis*, % 18.2'si *A. agrarius*, % 13.7'si *M. guentheri*, % 4.6'i *A. sylvaticus*, % 4.5'i ise *A. witherbyi* türlerindedir. İmmunoblot testi uygulanan 20 kemiricinin ise % 80'inde DOBV pozitifliği, % 5'inde ise PUUV pozitifliği saptanmıştır. Örneklerin % 15'inde ise ELISA testi pozitif iken immunoblot testi negatif olarak belirlenmiştir.

Örneklerden üçü ELISA testi ile pozitif olarak saptandığı halde immunoblot testi ile negatif olarak belirlenmiştir. Söz konusu üç örnekte saptanan bu durumun nedeni, ELISA yöntemi ile saptanan kemirici antikorlarının çapraz reaktif olması, ELISA yöntemi ile immunoblot yöntemi arasındaki analitik duyarlılık farkı veya immunoblot striplerinde antijeni bulunan hantavirus alt tiplerinden farklı alt tip ya da tiplere özgül olması gibi sebeplerden kaynaklanabilir. Bu nedenle ELISA testi ile hantavirusa karşı antikor varlığı tespit edilmesine rağmen, immunoblot testi ile antikorların hangi hantavirus alt tipine karşı olduğu belirlenemeyebilir.

Çalışmamız sırasında dokuz adet *A. flavicollis*'in yanı sıra üç adet *A. agrarius*'ta da DOBV pozitifliği saptanmıştır. *A. flavicollis* DOBV taşıyıcısı olarak bilinirken, *A. agrarius* ise Avrupa'da SAAV, Asya'da HTNV taşıyıcısı olarak bilinmektedir. DOBV ve SAAV, genetik açıdan birbirleri ile oldukça benzer olmalarına rağmen, serolojik açıdan farklılaşmış olmaları ve SAAV'nin RSKA'nın epidemik nefropati benzeri hafif bir formuna neden olması ile birbirlerinden ayrılmaktadırlar (48, 49). Bu iki virus tipi, ancak moleküler yöntemler ile birbirlerinden kesin olarak ayırt edilebilmektedir. Çalışmamız sırasında uyguladığımız serolojik yöntemler ise bu konuda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle DOBV pozitifliği saptadığımız *A. agrarius* türüne ait kemiricilerin, DOBV farklı bir tipini mi taşıdıkları yoksa SAAV taşıyıcısı mı oldukları bilinmemektedir. Slovenya'da yapılan bir çalışmada *A. flavicollis* ve *A. agrarius* türlerinde DOBV pozitifliği saptanmış ve her iki türün taşıdığı DOBV tiplerinin birbirlerinden farklı oldukları tespit edilmiş, *A. agrarius* tarafından taşınan DOBV tipine ait dizinin Slovakya, Rusya ve Estonya saptanan *A. agrarius* türüne ait kemiriciler tarafından taşınan DOBV tiplerine ait dizilere benzer olduğu bildirilmiştir (50). Başka bir çalışmada ise hantavirus taşımayan *A. flavicollis* ve *A. agrarius* türlerine SAAV

inoküle edildiğinde, her iki türden kemiriciler de virusa karşı nötralizan antikor üretmişler ve akciğer dokularında viral RNA tespit edilmiştir (51).

M. guentheri, Türkiye coğrafyasında sıklıkla rastlanılan kemirici türlerinden biridir. *Microtus* cinsine ait farklı türlerin hantavirus alt tiplerinin taşıyıcısı olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Laakkonen ve ark. tarafından yapılan çalışmada Trabzon'da yakalanan *M. roberti* ve *M. rossiaemeridionalis* türlerine ait örneklerin % 25'inde, İzmir'de ise *M. guentheri lydius* türüne ait örneklerin % 4'ünde PUUV pozitifliği saptanmıştır (22). Bunun dışında, *M. guentheri*'nin hantavirus taşıyıcısı olduğuna dair ülkemizden ve dünyadan bildirilmiş başka bir kaynak bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında Kırklareli İğneada bölgesinde yakalanan 16 adet *M. guentheri*'den ikisinde DOBV pozitifliği saptanmıştır. *M. guentheri*'nin Bulgaristan, Yugoslavya, İsrail, Lübnan ve Suriye'den Yunanistan'a uzanan bölgede bulunması, bu bölgelerde de DOBV taşıyıcısı olabileceğini düşündürmektedir (52).

Çalışmamız sırasında yakalanan dört adet *A. sylvaticus*'tan birinde DOBV pozitifliği saptanmıştır. Belçika'da yapılan çalışmalarda *A. sylvaticus*'un, PUUV taşıyıcısı olarak bilinen *M. glareolus* ile aynı habitatta yaşadığı ve PUUV taşıdığı bildirilmiştir (51). Rusya'da yapılan bir çalışmada da *A. sylvaticus* türüne ait bir kemiricide DOBV pozitifliği saptanmıştır (54). Yapılacak yeni çalışmalar ile virusun tür içi ve türler arası taşınımının daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Böylece *A. sylvaticus*'un Kırklareli İğneada bölgesinde DOBV için tesadüfi bir konak olup olmadığı belirlenebilecektir.

DOBV pozitifliği belirlenen *A. witherbyi*'nin herhangi bir hantavirus tipinin taşıyıcısı olduğuna dair bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bu çalışma ile *A. witherbyi*'nin hantavirus ile enfekte olduğu ilk kez gösterilmiştir.

Çalışmamız sırasında DOBV taşıyıcısı olarak bilinen *A. flavicollis*'te PUUV pozitifliği saptanmıştır. Literatürde henüz böyle bir bilgi bulunmamaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışma ile Kırklareli İğneada bölgesinde hantavirus varlığı tespit edilmiş ve bölgedeki kemirici popülasyonlarındaki durum ortaya konulmuştur. Ülkemizde farklı bölgelerde de benzer çalışmaların yapılması ile risk haritası oluşturulabilecek ve gerekli önlemler alınabilecektir.

Hantavirus antikorlarının belirlenmesinde kullanılacak serolojik yöntemlerin, “in-house” ya da ticari olarak hazırlanması sırasında hantaviral antijenlerin hücre kültürü ile üretilmesi gerekmektedir. Bu işlemler sırasında bulaş riski oldukça yüksek olduğundan, biyogüvenlik düzey 3 laboratuvarlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bu tür laboratuvarların kurulması güç ve maliyetli olduğundan, her yerde bulunmamaktadır. Benzer çalışmalarda farklı ticari ürünler kullanılarak, kemiricilerin taranmasında yararlanılabilecek ve güvenilir sonuçlar veren ürünler ve prosedürler belirlenebilecektir. Böylece biyogüvenlik düzey 3 laboratuvarlara sahip olmayan yerlerde de optimize edilen yöntemler kullanılarak, hantavirus taraması yapılabilecektir.

Hem insan hem de kemiricilere ait örneklerin serolojik açıdan taranması, hızlı sonuç alınması ve moleküler yöntemlere göre bulaş riskinin düşük olması nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak genetik açıdan birbirleri ile benzer olan ve aynı kemirici ailesi ile taşınan enfeksiyon etkenleri, çapraz reaksiyona neden olabilmektedir. Bu nedenle örneklerin moleküler yöntemlerle de taranması, dizilenmesi ve filogenetik analizlerinin yapılması, hantavirus taşıyıcısı olarak bilinen kemirici türleri dışında hangi türlerin hangi alt tipleri taşıdığı konusuna ve bilinen alt tiplere benzer olduğu için ayırt edilemeyen yeni alt tiplerin belirlenmesine ışık tutacaktır.

Bu çalışmada olduğu gibi farklı türden kemiricilere yönelik olarak optimize edilmiş serolojik yöntemler, özellikle alanda aktif izlem ve denetleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi bakımından belirgin bir pratik öneme sahiptir.

7. **KAYNAKLAR**

1. Celebi G. Hantavirus İnfeksiyonları. Klimik Dergisi, 2011; 24(3): 139-49.
2. Smadel JE. Epidemic hemorrhagic fever. Am J Public Health Nations Health 1953; 43(10): 1327-30.
3. Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J Infect Dis 1978; 137: 298-308.
4. Haemorrhagic fever with renal syndrome: memorandum from a WHO meeting. Bull World Health Organ 1983;61(2):269-75.
5. Haznedaroğlu T, Doğanç L, Gün H, Lee HW. Investigation of Hantavirus seroprevalance in Turkish soldiers by high density particle agglutination method. 26th Congress of Turkish Microbiology Society Abstract Book: p21, 1994, Antalya, Turkey.
6. Mir M. Hantaviruses. Clin Lab Med 2010; 30(1): 67-91.
7. Johnson KM. Hantaviruses: history and overview. Curr Top Microbiol Immunol 2001; 256: 1-14.
8. Jonsson CB, Milligan BG, Arterburn JB. Potential importance of error catastrophe to the development of antiviral strategies for hantaviruses. Virus Res 2005; 107 (2): 195-205.
9. Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Närvänen A, Julkunen I ve ark. Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. J Med Virol 1995; 46(4): 293-303.
10. Gött P, Zöller L, Darai G, Bautz E. A major antigenic domain of hantaviruses is located on the aminoproximal site of the viral nucleocapsid protein. Virus Genes 1997; 14(1): 31-40.
11. Mackow ER, Gavrillovskaia IN. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. Curr Top Microbiol Immunol 2001; 256: 91-115.
12. Nagai T, Tanishita O, Takahashi Y, Yamanouchi T ve ark. Isolation of haemorrhagic fever with renal syndrome virus from leukocytes of rats and virus replication in cultures of rat and human macrophages. J Gen Virol 1985; 66: 1271-78.
13. Gavrillovskaia IN, Brown EJ, Ginsberg MH, Mackow ER. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. J Virol. 1999; 73: 3951-59.

14. Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(2): 412-41.
15. 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.
16. McCaughey C, Hart CA. Hantaviruses. *J Med Microbiol* 2000; 49: 587-99.
17. Wells RM, Estani SS, Yadon ZE, Enria D ve ark. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 171-4.
18. Karakaş A, Babayiğit MA. Hantaviral Enfeksiyonlar: Türkiye gündemine yeni giren eski bir zoonoz. *TAF Prev Med Bull* 2011; 10(1): 77-86.
19. 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.
20. Zhenqiang BI, Formenty PBH, Roth CE. Hantavirus Infection: a review and global update. *J Infect Developing Countries* 2008; 2(1): 3-23.
21. Kavukçu S, Türkmen M, Salman Ş, Soylu A, Çamsan T. Ege Bölgesinde Hantavirüs İle İlişkili Nefropati Riski Nedir? *Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 131-5.
22. Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, Blasdell K ve ark. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *J Wildl Dis* 2006; 42(3): 672-6.
23. Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by Hantavirus in the Black Sea Region of Turkey, January-May 2009. *Euro Surveill* 2009; 14(20).
24. 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.
25. 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.
26. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, Turhan V ve ark. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(2): 303-4.

27. Gözalan A, Kalaycioğlu 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.
28. Khaiboullina SF, St. Jeor SC. Hantavirus immunology. *Viral Immunol* 2002; 15(4): 609-25.
29. Paakkala A, Mustonen J, Viander M, Huhtala H ve ark. Complement activation in nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Clin Nephrol* 2000; 53: 424-31.
30. Maes P, Clement J, Gavrilovskaya I, Van Ranst M. Hantaviruses: immunology, treatment, and prevention. *Viral Immunol*. 2004; 17(4): 481-97.
31. Lundkvist A, Bjorsten S, Niklasson B. Immunoglobulin G subclass responses against the structural components of Puumala virus. *J Clin Microb*. 1993; 31: 368-72.
32. de Carvalho Nicacio C, Bjorling E, Lundkvist A. Immunoglobulin A response to Puumala hantavirus. *J Gen Virol* 2000; 81: 1453-61.
33. Vapalahti O, Lundkvist A, Vaheri A. Human immune response, host genetics and severity of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 256: 153-69.
34. 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.
35. 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.
36. Öktem MA. Hantavirüs enfeksiyonlarında laboratuvar tanısı, In: Özkan AT, Duman DC, Uyar Y, editors. Hantavirüs sempozyumu. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68 (2): 45-47.
37. Muranyi W, Bahr U, Zeier M, van der Woude FJ. Hantavirus Infection. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(12): 3669–79.
38. Tamura M, Asada H, Kondo K, Takahashi M ve ark. Effects of human and murine interferons against hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus (Hantaan virus). *Antiviral Res* 1987; 8: 171–78.

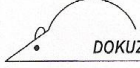
39. Cho HW, Howard CR. Antibody response in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax). *Vaccine* 1999; 17(20-21): 2569–75.
40. Cho HW, Howard CR, Lee HW. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology* 2002; 45(4-6): 328–33.
41. Hjelle B. Vaccines against hantaviruses. *Expert Rev Vaccines* 2002; 1(3): 373–84.
42. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine theory and practise. *Bull World Health Organ* 1976; 53: 55-65.
43. Law B, Malone MD, Biddlecombe RA, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) development and optimisation, In: Law B, editor. *Immunoassay a practical guide*, London: Taylor&Francis e-Library, 2005, 133-56.
44. Jacobson RH, Wright P. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases, In: The World Organisation of Animal Health, editor. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 7th edition; 2012. p. 1-18.
45. Aksakoğlu G. Araştırmada elde edilen hızlar, In: Aksakoğlu G, editor. *Sağlıkta araştırma ve çözümleme*. 2.baskı. İzmir: DEÜ Rektörlük Basımevi; 2006. p. 73-99.
46. Aksakoğlu G. Veri çözümlemenin temeli, In: Aksakoğlu G, editor. *Sağlıkta araştırma ve çözümleme*. 2.baskı. İzmir: DEÜ Rektörlük Basımevi; 2006. p. 161-187.
47. Demirsoy A. Genel Zoocoğrafya ve Türkiye Zoocoğrafyası “Hayvan Coğrafyası” Genişletilmiş, 5. Baskı, Ankara, Meteksan A.Ş., 2002.
48. 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.
49. Sjölander KB, Golovljova I, Vasilenko V, Plyusnin A ve ark. Serological divergence of Dobrava and Saaremaa hantaviruses: evidence for two distinct serotypes. *Epidemiol Infect* 2002; 128: 99-103.
50. Avsic-Zupanc T, Nemirov K, Petrovec M, Trilar T ve ark. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J Gen Virol* 2000; 81: 1747-55.
51. Klingström J, Heyman P, Escutenaire S, Sjölander KB ve ark. Rodent host specificity of European hantaviruses: Evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J Med Virol* 2002; 68(4): 581-8.

52. Yiğit N, Colak E. On the distribution and taxonomic status of *Microtus guentheri* (Danford and Alston, 1880) and *Microtus lydius* Blackler, 1916 (Mammalia: Rodentia) in Turkey. Turk J Zool, 2002; 26: 197-204.
53. Heyman P, Mele RV, Smajlovic L. Association between habitat and prevalence of hantavirus infections in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*). Vector Borne Zoonotic Dis 2009; 9(2): 141-6.
54. Tkachenko E, Dzagunova T, Dekonenko A ve ark. First identified acute severe HFRS case in Russia caused by Dobrava hantavirus type and associated with *Apodemus sylvaticus*. In: Abstract Book. Vth International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS), and Hantaviruses. Les Pensières, France p.167, 2001.

8. EKLER

EK-1

Etik Kurul Onayı

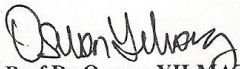
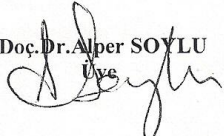

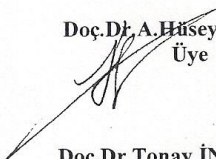
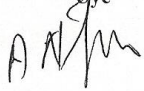
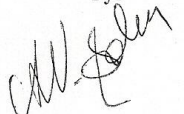

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, Inciraltı, İzmir-232 412254
<http://deu.edu.tr/idenetik/>

Toplantı No : 13/12/2009
Toplantı Tarihi : 05.06.2009

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

41/2009 Protokol No'lu; Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM'in sorumlu olduğu "Türkiye batı bölgelerindeki hanta virüs araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

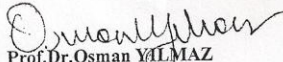
 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı	Prof.Dr. Sevil GÖNENÇ ARDA Başkan Yardımcısı
 Doç. Dr. Alper SOYLU Üye	 Prof. Dr. Ayşe GELAL Üye
Doç. Dr. Hüseyin ASTARCIOĞLU Üye (katılmadı)	Doç. Dr. Turna İLKNUR Üye
Doç. Dr. Abdullah KUMRAL Üye (katılmadı)	Doç. Dr. A. Hüseyin BASKIN Üye
Doç. Dr. Yücel ARISOY Üye (katılmadı)	 Doç. Dr. Tonay İNCEBOZ Üye (katılmadı)
Doç. Dr. Ali Necati GÖKMEN Üye	Vtr. Dr. Adnan SERPEN Üye (katılmadı)
 Ayşe Nur BALIN Üye	
	


Toplantı No : 04/15/2011
Toplantı Tarihi : 22 Temmuz 2011

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

41/2009 Protokol No'lu; Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Mehmet Ali ÖKTEM'in sorumlu olduğu "Türkiye batı bölgelerindeki hanta virüs araştırılması" isimli projede; Alihan BULGURCU, Ceylan POLAT ve Y.Hakan ABACIOĞLU'nun projeye dahil edilmeleri hakkında gönderilen belge incelenerek bilgi edinilmiştir.

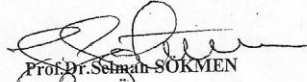
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.



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


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

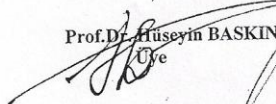
Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye (Topl.katılmadı)

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

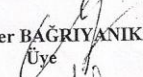

Prof.Dr.Selma SÖKMEN
Üye


Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

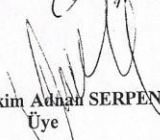
Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye (Topl.katılmadı)


Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye

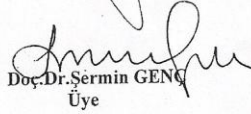
Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye (Topl.katılmadı)


Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye (Topl.katılmadı)


Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALIN
Üye(Topl.katılmadı)


Doç.Dr.Sermin GENÇ
Üye

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

EK-2

ÖZGEÇMİŞ

CEYLAN POLAT

TC Kimlik No / Pasaport No:	18440646856
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. 35340 Narlıdere/İzmir
Telefon :	0555 708 03 19
e-posta :	ceylanpolat88@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

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

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
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. 2007-12.09.2007

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Mikrobiyoloji, Viroloji

DiĞER 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				
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
<input type="checkbox"/>	Sözlü Sunum Birinciliği	Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi)	2012

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

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 (Yayın aşamasında).

Kayman T, **Polat C**, Ergör G, Abacıoğlu H. Characterization of HCV genotype 4d infections in Kayseri, Turkey (Yayın aşamasında).

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 S. G., 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 yayımlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar

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, France. (Sözlü Bildiri)

Polat C, Oktem MA, Karatas 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, 11-14 Eylül 2013, Lyon, France. (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. (Sözlü 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. (Sözlü 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)