



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TÜRKİYE'DE SAPTANAN KUDUZ VİRUSLARININ
N, G, G-L GEN BÖLGELERİNİN GENETİK ANALİZİ VE
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Deniz ACUN YILDIZ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feray ALKAN

ANKARA

2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE SAPTANAN KUDUZ VİRUSLARININ
N, G, G-L GEN BÖLGELERİNİN GENETİK ANALİZİ VE
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Deniz ACUN YILDIZ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feray ALKAN

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
21L0239017 no ile desteklenmiştir

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye’de Saptanan Kuduz Viruslarının N, G, G-L Gen Bölgelerinin Genetik Analizi ve Moleküler Epidemiyolojisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Deniz ACUN YILDIZ

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında
Deniz ACUN YILDIZ tarafından hazırlanan “Türkiye’de Saptanan Kuduz Viruslarının N, G,
G-L Gen Bölgelerinin Genetik Analizi ve Moleküler Epidemiyolojisi” adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.07.2024

Prof. Dr. Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Feray ALKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Orhan YAPICI
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Kezban CAN ŞAHNA
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Türkiye’de Saptanan Kuduz Viruslarının N, G, G-L Gen Bölgelerinin Genetik Analizi ve Moleküler Epidemiyolojisi.

Bu çalışmada, ülkemizde 2015-2021 yılları arasında kuduz virusu pozitif olduğu teyit edilen farklı tür, yıl ve coğrafi özellikleri göz önüne alınarak seçilen örnekler kullanılarak, kuduz virusunun en korunaklı gen bölgesi olan ve teşhis amacıyla kullanılan N gen, antijenik bölge olan G gen, G ve L geni birbirinden ayıran ve mutasyona en açık bölge olan G-L intergenik bölgelerine ait dizin bilgilerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bildirilen gen bölgelerinin çoğaltılmasına uygun primerler kullanılarak RT-PCR uygulanmış ve elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüleri değerlendirilerek, dizin analizine tabi tutulmuştur. Sonrasında elde edilen dizinler, GenBank’tan elde edilenlerle dizinlenmiş ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Bu çalışmada kullanılan tüm numunelerin *Cosmopolitan* dalında, 3 farklı alt dala dahil olduğu görülmüştür. Bunlar, Middle East 2 (ME2), Middle East 1a (ME1a) ve Central Asia 2 (CA2) alt dallarıdır. Ülkemizin batı kesiminde yalnızca ME2 alt dalının sirküle olduğu görülürken, doğu kesimlerde her 3 alt dalın da sirküle olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: G Gen, G-L İntergenik Bölge, Kuduz, N Gen

SUMMARY

Molecular Epidemiology and Genetic Analysis of N, G, G-L intergenic gene regions of rabies virus isolates from Turkey.

In this study, it is aimed to obtain the sequences of three gene regions of the rabies included samples selected based on different species, years, and geographical characteristics, confirmed to be positive for the rabies virus in our country between 2015 and 2021. These gene regions are the N gene, known for being the most conserved region and used for diagnostic purposes, the G gene, recognized as an antigenic region, and the G-L intergenic region, which separate the G and L genes and associated with greater susceptibility for mutations. For this purpose, RT-PCR was applied using the primers for these gene regions, and products were subjected to sequence analysis after evaluating the agarose gel images. Subsequently, the obtained sequences were aligned with those obtained from GenBank, and phylogenetic trees were constructed. In this study, it was observed that all the samples used belonged to the Cosmopolitan clade and were divided into three different subclades: Middle East 2 (ME2), Middle East 1a (ME1a) and Central Asia 2 (CA2). The ME2 subclade was found to be in circulation throughout the western region of the country, whilst all three subclades were seen to be in circulation within the eastern regions of the country.

Keywords: G Gene, G-L Intergenic Region, N Gene, Rabies

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	3
1.1.1. Kuduz Virusu Yapısı ve Genomu	5
1.1.1.1. Nukleoprotein (N)	6
1.1.1.2. Fosfoprotein (P)	7
1.1.1.3. RNA bağımlı RNA Polimeraz (L)	7
1.1.1.4. Matriks protein (M)	8
1.1.1.5. Glikoprotein (G)	8
1.1.1.6. Kodlanmayan İntergenik Bölgeler	10
1.2. Bulaşma ve Patogenez	11
1.2.1. Virusun Transkripsiyon ve Replikasyon Mekanizması	12
1.3. Epidemiyoloji	13
1.3.1. Türkiye’de Kuduz Hastalığının Epidemiyolojisi	19
1.4. Klinik Bulgular	21
1.5. Teşhis	22
1.6. Koruma ve Kontrol	25
1.6.1. Parenteral Aşılar	27
1.6.2. Oral Aşılar	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Gereç	30
2.1.1. Tanı Materyalleri	30
2.2. Yöntem	33
2.2.1. Viral RNA’dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	33
2.2.2. Hedef Gen Bölgeleri için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulanması	33
2.2.2.1. N Gen Bölgesi İçin RT-PCR Tekniği	34

2.2.2.2. G Gen Bölgesi için RT-PCR Tekniği	34
2.2.2.3. G-L İntergenik Bölgesi için RT-PCR Tekniği	35
2.2.3. PCR Ürünlerinin Jel Elektroforez ile Görüntülenmesi	35
2.2.4. Dizin Analizi	36
2.2.5. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	36
2.2.6. Filogenetik Analiz	36
3. BULGULAR	37
3.1. N Gen Bölgesi için Elde Edilen Bulgular	43
3.1.1. Filogenetik Analiz ve Benzerlik Oranları	43
3.1.1.1. N Gen Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> CA2 Alt Dalı	46
3.1.1.2. N Gen Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> ME1a Alt Dalı	47
3.1.1.3. N Gen Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> ME2 Alt Dalı	49
3.1.2. Dizin Analizi Sonuçları	53
3.2. G Gen Bölgesi için Elde Edilen Bulgular	55
3.2.1. Filogenetik Analiz ve Benzerlik Oranları	55
3.2.2. G Gen Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> CA2 Alt Dalı	57
3.2.3. G Gen Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> ME1a Alt Dalı	59
3.2.4. G Gen Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> ME2 Alt Dalı	61
3.2.5. Dizin Analizi Sonuçları	65
3.3. G-L İntergenik Bölge için Elde Edilen Bulgular	68
3.3.1. Filogenetik Analiz ve Benzerlik Oranları	68
3.3.2. G-L İntergenik Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> CA2 Alt Dalı	71
3.3.3. G-L İntergenik Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> ME1a Alt Dalı	75
3.3.4. G-L İntergenik Bölgesi <i>Cosmopolitan</i> ME2 Alt Dalı	79
3.3.5. Dizin Analizi Sonuçları	83
3.4. Yaban Yaşamındaki Hayvanlara İlgili Veriler	83
4. TARTIŞMA	85
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	94
KAYNAKLAR	96
EKLER	108
Ek-1. Etik Kurul Raporu	108
Ek-2. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü İzin Yazısı	109
Ek-3.2016 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)	110
Ek-4. 2017 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)	111

Ek-6. 2019 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)	113
Ek-7. 2020 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)	114
Ek-8. 2021 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)	115
Ek-9. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin benzerlik oranları	116

ÖZGEÇMİŞ

Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



ÖNSÖZ

Kuduz hastalığı insan ve hayvan sağlığını etkileyen, zoonoz, ölümcül ve önlenabilir bir hastalıktır. 1885 yılında Louis Pasteur tarafından ilk kuduz aşısı bulunmuş ve yıllar boyunca geliştirilmiş olmasına rağmen günümüzde hala dünya genelinde azımsanamayacak sayıda insanın kuduz hastalığından öldüğü bilinmektedir. Ülkemizde ve birçok ülkede endemik seyreden bu hastalığın önlenmesi ve korunmasında en uygun yol aşılama olmakla birlikte virusun sirküle olduğu konakçı türünün bilinmesi mücadelede en önemli nokta olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde köpeklerin ve tilkilerin bulaşta esas rolü oynadığı bilinmektedir. Bu bağlamda yıllardır evcil hayvanlarda korunma için parenteral aşılama, yaban yaşamda koruma ve kontrol için oral aşılama uygulamaları devam etmektedir. Bu çalışmada ülkemiz adına ayrıntılı epidemiyolojik veriye ulaşmak için kuduz virusu pozitif olduğu teyit edilen farklı tür, yıl ve coğrafi özellikleri göz önüne alınarak seçilen örnekler kullanılmış ve elde edilen veriler ışığında değerlendirmelerde bulunularak bilimsel bilgi birikimine katkıda bulunulmuştur.

Doktora eğitimim süresince sevgisini ve sabrını hiç bir zaman esirgemedi, mütevazı kişiliği, bilgi birikimi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yalnızca tez çalışmamda değil her konuda yardım ve desteğini gördüğüm, sevgili danışman hocam Prof. Dr. Feray ALKAN'a, lisansüstü eğitimim süresince emeği geçen ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aykut ÖZKUL ve Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Seval Bilge DAĞALP, Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU, Prof. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU, Doç. Dr. Ayşe Zeynep AKKUTAY YOLDAR, Doç. Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU hocalarım ile Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi ve tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Emre ÖZAN, Dr. Sabri HACIOĞLU; Ankara Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı tüm araştırma görevlileri ile lisansüstü öğrencisi arkadaşlarıma ve idari personellerine ve birlikte mesai yaptığım Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı personellerine teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olduklarını bildiğim, emeklerini ve desteklerini bir an olsun eksik etmeyen değerli annem Mekân ACUN ve babam M. Uğur

ACUN'a; her zaman yanımda olan, tez çalışmam süresince göstermiş olduğu sonsuz sabır ve desteği için kıymetli eşim Deniz YILDIZ'a ve kızım Duru Deniz YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21L0239017 no ile desteklenmiştir.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Celsius türünden derece, Santigrat derece
aa	Aminoasit
AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADIS	Hayvan Hastalıkları Bilgi Sistemi (Animal Disease Information System)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz çifti-base pair
cDNA	Komplementer Deoksiribo-Nükleik Asit
cm	Santimetre
CVS	Challenge Virus Strain
DFA	Direkt Floresan Antikor testi
dk	dakika
dNTP	Di nükleot trifosfat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERA	Evelyn Rokitnicki Abelseth
HEP	Flury high egg passage
km	kilometre
LEP	Flury low egg passage
Ig	Immunglobulin
MEGA X	Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms
MERACON	Orta Doğu, Doğur Avrupa, Orta Asya ve Kuzey Afrika Kuduz Kontrol Ağı (Middle East,Eastern Europe, Central Asia and North Africa Rabies Control Network)
µl	Mikrolitre
M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NCBI	Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
nm	nanometre
nt	nükleotit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PM	Pitman Moore
Ψ	psi

PV	Pasteur Virus
RABV	Rabies Virus
RNA	Ribonükleik asit
RT	Reverse transkriptaz
SAD	Street Alabama Dufferin
sn	saniye
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	Tris Borate EDTA
UV	Ultraviyole
vb	ve benzeri
VKMAE	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Lyssavirus türleri, genotipleri ve bulundukları filogruplar	4
Şekil 1.2. Kuduz virus genomunun şematik yapısı (Başlangıç ve bitiş noktaları olarak PV suşu baz alınmıştır)	6
Şekil 1.3. Kuduz virusu G gen ektodomaini şematik görünümü	9
Şekil 1.4. Kuduz hastalığının dünya genelinde dağılımı	16
Şekil 3.1. N Gen bölgesi için materyallerin sağlandığı iller, hayvan türleri ve sayıları	43
Şekil 3.2. Bu çalışmada kullanılan kuduz viruslarının N gen bölgesi filogenetik analizi (1272 bp)	44
Şekil 3.3. Bu çalışmadaki kuduz viruslarının N gen bölgelerinin kendi aralarında ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)	45
Şekil 3.4. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen bölgesi CA2 alt dalına ait filogenetik analizi (1272bp)	46
Şekil 3.5. N gen bölgesi CA2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)	47
Şekil 3.6. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen bölgesi ME1a alt dalına ait filogenetik analizi (1272bp)	48
Şekil 3.7. N gen bölgesi ME1a alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)	49
Şekil 3.8. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen bölgesi ME2 alt dalına ait filogenetik analizi (1272bp)	50
Şekil 3.9. N gen bölgesi ME2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları (%)	51
Şekil 3.10. N gen bölgesi ME2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile aminoasit düzeyinde benzerlik oranları (%)	52
Şekil 3.11. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen fosforilasyon bölgeleri	53
Şekil 3.12. N gen bölgesi antijenik bölge I ve antijenik bölge IV	54
Şekil 3.13. N gen bölgesinde 129, 297 ve 369. nükleotitlerde gözlenen SNP’ler	54
Şekil 3.14. G Gen bölgesi için materyallerin sağlandığı iller, hayvan türleri ve sayıları	55
Şekil 3.15. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi filogenetik analizi (1538 bp)	56
Şekil 3.16. Bu çalışmadaki kuduz viruslarının G gen bölgelerinin kendi aralarında ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)	57

Şekil 3.17. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G Gen bölgesi CA2 alt dalına ait filogenetik analizi (1538bp)	58
Şekil 3.18. G gen bölgesi CA2 alt dalında bulunan, bu çalışmada tanımlanmış kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referans suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve aminoasit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)	59
Şekil 3.19. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi ME1a alt dalına ait filogenetik analizi (1538bp)	60
Şekil 3.20. G gen bölgesi ME1a alt dalında bulunan, bu çalışmada tanımlanmış kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referans suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve aminoasit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)	61
Şekil 3.21. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi ME2 alt dalına ait filogenetik analizi (1538bp)	62
Şekil 3.22. G gen bölgesi ME2 alt dalında bulunan, bu çalışmada tanımlanmış kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referans suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları (%)	63
Şekil 3.23. G gen bölgesi ME2 alt dalında bulunan, bu çalışmada tanımlanmış kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referans suşlar (CVS-11 ve PV) ile aminoasit düzeyinde benzerlik oranları (%)	64
Şekil 3.24. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen glikozilasyon bölgeleri	65
Şekil 3.25. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen antijenik bölge dizinleri	66
Şekil 3.26. G gen bölgesi ME2 alt dalında yer alan kuduz viruslarında 3027, 3057, 3084, 3204, 3976, 4173 ve 4327. nükleotitlerde gözlenen değişimler	67
Şekil 3.27. G gen bölgesi ME2 alt dalında yer alan kuduz viruslarında 378 ve 491. aa’de görülen amino asit değişimleri	67
Şekil 3.28. Bu çalışmada elde edilen 2016 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin <i>Cosmopolitan</i> alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita	68
Şekil 3.29. Bu çalışmada elde edilen 2017 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin <i>Cosmopolitan</i> alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita	69
Şekil 3.30. Bu çalışmada elde edilen 2018 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin <i>Cosmopolitan</i> alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita	69
Şekil 3.31. Bu çalışmada elde edilen 2019 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin <i>Cosmopolitan</i> alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita	70
Şekil 3.32. Bu çalışmada elde edilen 2020 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin <i>Cosmopolitan</i> alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita	70
Şekil 3.33. Bu çalışmada elde edilen 2021 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin <i>Cosmopolitan</i> alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita	71
Şekil 3.34. Bu çalışmada elde edilen ve G-L intergenik bölge CA2 alt dalında yer alan tüm yıllara ait kuduz viruslarının filogenetik analizi (519bp)	72
Şekil 3.35. G-L intergenik bölge CA2 alt dalında bulunan, bu çalışmada tanımlanmış kuduz viruslarının Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları (%)	74

Şekil 3.36. Bu çalışmada elde edilen ve G-L intergenik bölge ME1a alt dalında yer alan tüm yıllara ait kuduz viruslarının filogenetik analizi (519bp) 76

Şekil 3.37. G-L intergenik bölge ME1a alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları (%) 78

Şekil 3.38. Bu çalışmada elde edilen ve G-L intergenik bölge ME2 alt dalında yer alan tüm yıllara ait kuduz viruslarının filogenetik analizi (519bp) 80

Şekil 3.39. G-L intergenik bölge ME2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları (%) 82

Şekil 3.40. Bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının G-L intergenik bölgesinde tespit edilen insersiyon 83

Şekil 3.41. Vahşi yaşamdan elde edilen kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerine ilişkin filogenetik analizi (519bp) 84



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Lyssavirus türlerine göre konakçılar ve dağılım gösterdikleri yerler	15
Çizelge 1.2. Bölgelere göre konakçı türleri	16
Çizelge 2.1. Çalışmaya alınan kuduz viruslarının elde edildiği coğrafi bölge, yıl, hayvan türü ve sayısı	31
Çizelge 2.2. Çalışmanın iş akışına ilgili sayısal veriler	31
Çizelge 2.3. Çalışmada elde edilen ve bu çalışmanın değerlendirilmesinde kullanılan tanı materyallerine ilgili bilgiler	32
Çizelge 2.4. cDNA eldesi için kullanılan karışım bileşenleri ve ısı döngüleri	33
Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan primer dizinleri	34
Çizelge 2.6. N gen ve G gen bölgeleri için PCR karışım bileşenleri ve RT-PCR protokolü	34
Çizelge 2.7. G-L intergenik bölgesi için PCR karışım bileşenleri ve RT-PCR protokolü	35
Çizelge 3.1. Çalışılan tanı materyallerinin isimleri, kuduz viruslarının yer aldıkları alt dallar ve GenBank accession numaraları	38
Çizelge 3.2. Hayvan türlerine göre dizin bilgileri elde edilen kuduz viruslarının alt dallara dağılımı	42

1. GİRİŞ

Tarihin bilinen en eski zoonotik hastalıklarından biri olan kuduz hastalığının geçmişi 4000 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Koury ve Warrington, 2024). Binlerce yıl öncesinde Mezopotamya ve Mısır uygarlıklarında saldırgan köpekler tarafından ısırılmanın sonuçlarına ilişkin yazıtlara rastlanmıştır (Blaisdell, 1994: Akt. Rupprecht vd., 2002). İlk kayıtlı kuduz köpek tanımlaması M.Ö. 500 civarında Demokritos tarafından yapılmıştır (Blanton ve Wallace, 2015). Aristoteles tarafından M.Ö. 350 yılında yazıldığı tahmin edilen Hayvanların Tarihi adlı eserde 'köpeklerin sinirlilik yaratan bir deliliğe yakalandığı ve bu hasta köpekler tarafından ısırılan diğer hayvanların da hastalandığı' şeklindeki ifadesinin kuduz hastalığını işaret ettiği düşünülmektedir (Blanton ve Wallace, 2015). Columella (M.S. 60) çobanların yavru köpeklerin kuyruklarını kuduza karşı bir önlem olarak 40 günlükken kestiklerinden bahsetmektedir. Bu, insanlardaki hastalıkların önlenmesinin, maruz kaldıkları hayvanların sağlıklarıyla yakından ilişkili olduğunu ortaya koyan, belki de tek sağlık konseptinin ilk örneklerinden biridir (Tarantola, 2017).

Kuduz hastalığı doğru zamanda alınan önlemler ve aşı uygulamalarıyla %100 önlenebilir bir enfeksiyon olmasına rağmen, hala günümüzde 150'den fazla ülkenin bu hastalıktan etkilendiği, yıllık 59,000 kişinin kuduza bağlı hayatını kaybettiği ve bu vakaların %99'unun köpek aracılı meydana geldiği görülmektedir (WHO, 2024b). Batı Avrupa, Amerika, Japonya ve bazı Latin Amerika ülkelerinde köpek aracılı kuduz elimine edilmiş olsa da, en yüksek oran gelişmemiş veya gelişmekte olan ülkelerde (%95'i Asya ve Afrika'da) ve özellikle 15 yaşın altındaki çocuklarda karşımıza çıkmaktadır (WHO, 2024c). Hastalığın M.Ö. yıllardan beri süregeldiği ve 1885 yılında ilk kuduz aşısının Pasteur tarafından bulunduğu göz önüne alındığında aslında hastalığın dünya genelinde ihmal edilen tropikal hastalıklar kategorisinde yer almasına (WHO, 2024a) şaşırılmamak gerekir. Hastalık insanlar ve evcil hayvanlar için yaşamı tehdit ediyor olmasının yanı sıra doğada nadir bulunan (örneğin Etiyopya kurdu (*Canis simensis*)) veya nesli tükenen (örneğin Afrika yaban köpeği (*Lycaon pictus*)) hayvanlar için de farklı bir tehdit unsuru olarak karşımıza çıkmaktadır (Spickler, 2021).

Dünya genelinde her yıl 29 milyondan fazla kişiye maruziyet sonrası profilaksi uygulaması yapılmaktadır. 2018 yılı itibariyle maruziyet sonrası profilaksinın kişi başı 108 ABD doları civarında olduğu düşünülmektedir ki düşük gelir seviyesi olan ülkeler için hem tutar oldukça yüksek hem de sağlık kaynaklarına ulaşım imkanları kısıtlıdır (WHO, 2024c).

Hatta bazı ülkelerde aşı ve immunglobulin erişimi bulunmamaktadır (CDC, 2024b). Kuduzun yıllık ekonomik yükünün ise dünya genelinde 8,6 milyar olduğu tahmin edilmektedir (WHO, 2024c). Ülkemizde insanlarda her yıl yaklaşık 250,000 riskli temas bildirimi olmakla birlikte, 1-2 tane kuduz vakasına bağlı insan ölümü bildirimi bulunmaktadır (Yıldırım vd., 2022). Maruziyet öncesi ve sonrası insanlara uygulanan kuduz aşıları ülkemizde ücretsiz yapılmakta olup, 2006 yılında yapılan bir araştırmada 2001 yılı için insanlara uygulanan yıllık kuduz aşısı giderinin ülkemiz için yaklaşık 9 milyon ABD doları olduğu bildirilmiş olup (Kilic vd., 2006); riskli temas sayısı 2023 yılı içerisinde 437.601'e yükselmiştir (T. C. Sağlık Bakanlığı, 2023).

Dolayısıyla kuduz hastalığı hayvan hakları, doğal yaşamın bütünlüğü, çiftlik hayvanları yetiştiriciliğindeki ekonomik kayıplar gibi bazı önemli konular yanı sıra hem insanlarda ölümle sonuçlanan bir hastalık olması hem de gerek maruziyet öncesi ve gerekse maruziyet sonrası profilaksi nedeniyle çok önemli ekonomik kayıpların nedenidir.

Dünya genelinde uzun yıllar kuduzla mücadele programları birbirinden bağımsız ilerletilmiş olup, global düzeyde eş zamanlı sağlıklı sonuçlara varılamamış, enfeksiyonun tek sağlık konseptiyle önlenebilir olduğu düşüncesi hâkim olmuştur. Gerçekleştirilebilir bir hedef için yerel, ulusal ve küresel düzeyde insan, hayvan ve çevre sağlığı disiplinlerinin iş birliği içerisinde, kapsamlı, stratejik ve hedefe yönelik bir koruma kontrol yaklaşımı gereğince 2015 yılında bir araya gelen Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Küresel Kuduz Kontrol İttifakı (GARC) tek sağlık yaklaşımı ile 2030'a kadar köpek aracılı kuduzun önüne geçmeyi hedefleyen, ülke merkezli bir stratejiyi benimsemişlerdir. Sağlık hizmetlerine ulaşılabilirliğinin artırılması, köpeklerin aşılanması, toplumsal bilincin oluşturulması ve survey çalışmalarının yürütülmesi için her ülkenin kendi ulusal mücadele programını belirleyip, bahsi geçen kurumlarla iş birliği içerisinde sürecin yürütülmesi kararına varılmıştır (FAO, 2018). Hastalıkla mücadelenin zaman alabileceği göz önünde bulundurularak, mücadelenin sürdürülebilirliği için sistematik planlamanın yapılması, ulusal, bölgesel ve küresel düzeyde kaynakların belirlenmesi önemlidir (Taylor vd., 2021). Bahsi geçen uluslararası kurumlar ülkelere mücadele programlarını uygulamaları konusunda rehberlik etmeyi ve ortak çalışabilmeyi amaç edinmişlerdir ancak ulaşabildikleri sınırlı veriler hedefe ulaşmayı güçleştirmektedir. Bu nedenledir ki hastalık surveyansının güçlendirilmesi, veri raporlama ve kuduz programlarının izlenmesi belirlenen hedeflere ulaşılabilmesinin öncelikli odak noktası olmayı sürdürmektedir (FAO, 2018; WHO, 2024c). Takip ve işbirliğini sağlamak adına GARC tarafından bölgesel ağların kurulması desteklenmiştir ve bu doğrultuda 2015 yılında Pan-Amerikan Kuduz Kontrol Ağı (PARACON) (Scott vd., 2015); 2018 yılında Sub-Sahra Afrika

ve Asya ülkelerini kapsamına alan Asya Kuduz Kontrol Ağı'nın (ARACON) kurulmasına öncülük etmiştir (Coetzer vd., 2018). Yine 2018 yılında Orta Doğu, Doğu Avrupa, Orta Asya ve Kuzey Afrika MERACON çatısı altında toplanmışlardır. MERACON, Cezayir, Azerbaycan, Hırvatistan, Mısır, Gürcistan, Irak, İran, Kazakistan, Lübnan, Libya, Fas, Filistin, Polonya, Romanya, Sırbistan, Tacikistan, Tunus, Türkiye, Ukrayna, Özbekistan, Yemen'den ve bölgedeki diğer kuduz endemik ülkelerden kuduz konusunda uzman kişileri bir araya getirerek doğru verinin toplanması ve bu verilerin doğru bir şekilde analiz edilerek hızla yol alınması en önemli ilk adım olarak görülmektedir (Taylor vd., 2021).

Kuduz virusunun antijenik varyantları bulundukları coğrafi bölgelerdeki konakçı türlerine adapte olarak varlıklarını sürdürmektedirler (Carnieli vd., 2010). Dolayısıyla sirkülasyondaki kuduz viruslarının genetik analizi hastalığın epidemiyolojik durumuyla birlikte epidemiyolojide etkili türleri belirlemede ve hastalığın kontrolü amacıyla yapılacak çalışmaları planlamada önem taşımaktadır.

GARC verilerine göre Türkiye'de köpek aşılama oranı % 46,70; kuduz için harcanan yıllık tutar 69,051,847 ABD doları; maruziyet sonrası profilaksi uygulanan kişi sayısı ise yıllık 177,670 olarak bildirilmiştir (GARC, 2024).

Ülkemizde uzun yıllardır kuduz hastalığına ilgili önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bununla birlikte genetik analize ilgili az sayıda çalışma (Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022; Johnson vd., 2003; Johnson vd., 2006; Marston vd., 2017) bulunmakta olup bu çalışmalar sınırlı veriler ortaya koymaktadır. Moleküler epidemiyolojik çalışmaların, kuduz hastalığının kontrolünde diğer paydaşlar (Sağlık Bakanlığı, belediyeler vb) yanı sıra belki de en önemli sorumluluğu taşıyan Tarım ve Orman Bakanlığı'nın yapacağı çalışmaların (oral aşılama çalışmalarının planlanması, sahipli /sahipsiz köpeklerle ilgili olarak sürdürülen aşı kampanyaları vb) planlanmasında önemi açıktır.

1.1. Etiyoloji

Kuduz virusu *Mononegavirales* takımı, *Rhabdoviridae* ailesi, *Alpharhabdovirinae* alt ailesi, *Lyssavirus* cinsi içerisinde yer almaktadır (ICTV, 2024). *Mononegavirales* takımında yer alan viruslar insanları, hayvanları ve bitkileri enfekte edebilmektedirler (Van der Vlugt ve Stijger, 2021).

Lyssavirus cinsinde genomik yapılarına göre sınıflandırılmış 17 adet virus türü bulunmaktadır. Bunlar; Aravan lyssavirus (ARAV); Australian bat lyssavirus (ABLV);

Bokeloh bat lyssavirus (BBLV); Duvenhage lyssavirus (DUVV); European bat 1 lyssavirus (EBLV-1); European bat 2 lyssavirus (EBLV-2); Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV); Ikoma lyssavirus (IKOV); Irkut lyssavirus (IRKV); Khujand lyssavirus (KHUV); Lagos bat lyssavirus (LBV); Lleida bat lyssavirus (LLEBV); Mokola lyssavirus (MOKV); Rabies lyssavirus (RABV); Shimoni bat lyssavirus (SHIBV); Taiwan bat lyssavirus (TWBLV); West Caucasian bat lyssavirus (WCBV)'tur (ICTV, 2024). Bunların dışında Divaea bat lyssavirus (DBLV); Kotalahti bat lyssavirus (KBLV); Phala bat lyssavirus (PBLV) ve Taiwan bat lyssavirus (TWBLV) ICTV tarafından lyssaviruslarla ilişkili bulunmuş ancak henüz sınıflandırılmamışlardır (ICTV, 2024).

Yapılan analizlerle bu 17 tür, yedi genotip ve iki filogruba ayrılmıştır. Genetik olarak birbirinden oldukça farklı olan West Caucasian bat lyssavirus, Ikoma lyssavirus ve Lleida bat lyssavirus ise Filogrup III olarak değerlendirilebilmektedir (Fooks vd., 2021). Filogruplara ilişkin bilgiler Şekil 1.1.'de sunulmuştur.

Tür	Genotip	
Rabies lyssavirus	Genotip 1	Filogrup I
Duvenhage lyssavirus	Genotip 4	
European bat lyssaviruses 1	Genotip 5	
European bat lyssaviruses 2	Genotip 6	
Australian bat lyssavirus	Genotip 7	
Aravan lyssavirus		
Bokeloh bat lyssavirus		
Khujand lyssavirus		Filogrup II
Irkut lyssavirus		
Lagos bat lyssavirus	Genotip 2	
Mokola lyssavirus	Genotip 3	
Shimoni bat lyssavirus		Filogrup III
West Caucasian bat lyssavirus		
Ikoma lyssavirus		
Lleida bat lyssavirus		

Şekil 1.1. Lyssavirus türleri, genotipleri ve bulundukları filogruplar

Genotip I olarak da belirtilen Rabies virus (RABV) lyssaviruların prototipi olarak kabul edilmekte olup klasik kuduz hastalığının etkenidir ve oldukça nörotropiktir (Wunner ve Conzelmann, 2020). Genetik olarak kuduz virusuna en uzak virus genotipi, Mokola virustur (Genotip 3) (Le Mercier vd., 1997). Her ne kadar tüm genotipler nöronal yollar aracılığıyla merkezi sinir sistemine ulaşarak ölümcül ensefalomyelite neden olsa da (Jackson, 2020; Johnson vd., 2002) Filogrup II'nin düşük patojenitesi ve fareler üzerinde yapılan deneyler ile

insan ve hayvanlardan gelen sınırlı veriler ışığında, bu grubun Filogrup I ile kıyaslandığında hayvan ve insan sağlığı için daha az risk oluşturduğu düşünülmektedir (Badrane vd., 2001).

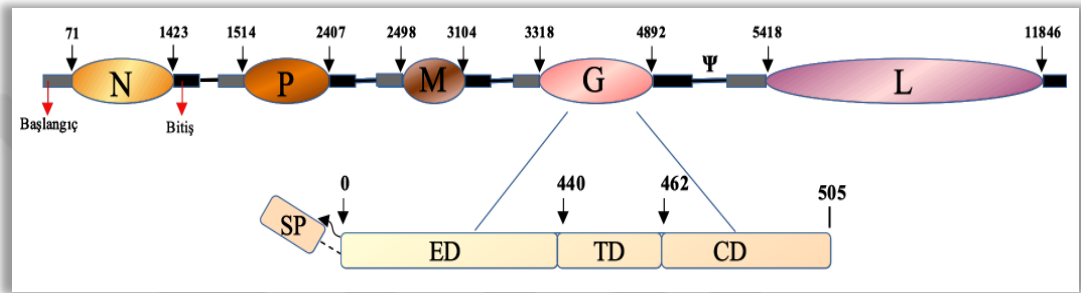
Kuduz virusları coğrafi dağılımlarına göre yedi büyük dalda gruplandırılmışlardır. Bunlar, Amerika'daki böcek yiyen ve kan emen yarasalarla sirküle olan tüm viruslar ile uçmayan memelilerle sirküle olan az sayıdaki virus suşlarını içeren “Amerikan indigenoz”; çoğunlukla Güney Hindistan ve Sri Lanka'daki köpek viruslarını içeren “Hindistan”; Çin ve Güneydoğu Asya ülkeleri, Filipinler ve Endonezya'dan gelen köpek viruslarını içeren Asya; Batı ve Orta Afrika'daki köpek viruslarını içeren “Africa 2”; Güney Afrika'daki firevun faresi biyotiplerini içeren “Africa 3”; Kuzey yarımküredeki kızıl tilki ve kutup tilkileri ile Orta ve Batı Asya'da köpeklerde sirküle olan virusları içeren “Arctic-related”; Afrika, Amerika, Orta Doğu ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde geniş dağılım gösteren, eskiden “Africa 1” olarak isimlendirilen gruba ait virusları da içeren “*Cosmopolitan*” grup olarak adlandırılmaktadırlar (Nadin-Davis ve Real, 2011). Aşı suşları ise farklı bir grup olarak ayrılmaktadır (Kissi vd., 1995).

1.1.1. Kuduz Virusü Yapısı ve Genomu

Lyssavirusların RNA genomları segmentsiz, negatif polariteli ve yaklaşık 12 kilobaz (kb) uzunluğundadır. Mermi şeklinde olan kuduz viruslarında genom 80 nm x 180 nm olup, virus yapısında yaklaşık % 67 protein, % 26 lipit, % 3 karbonhidrat, % 4 RNA bulunmaktadır (Malik vd., 2020). Zarflı bir virus olduğu için dış etkenlere çok dayanıklı olmayıp, lipit çözücülerle veya 56°C'ye 30 dk maruziyetle ya da UV veya X ışınları ile enfektivitesini kaybetmektedir (By vd., 2005).

Genel olarak tüm lyssaviruslar aynı genom organizasyonuna sahiptirler (Kuzmin vd., 2008). Lyssaviruslar içerisinde total genom uzunluğu 11,918 nükleotit (nt) ile en küçük genoma sahip olan lyssavirus ABLV iken, WCBV 12,178 nt ile en uzun genoma sahiptir (Wunner ve Conzelmann, 2020). Kuduz viruslarında ise genom uzunluğu 11,926 (RC-HL) ile 11932 (PV) nt arasında değişkenlik göstermektedir. Genom uzunluklarındaki en büyük farklılığın kodlanmayan alanlardaki değişikliklerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Marston vd., 2007). Virusun yapısında bulunan beş gen tüm lyssaviruslarda sırası korunan ve hem yapısal hem de fonksiyonel olarak birbiri ile ilişki halinde olan beş proteini kodlamaktadır ve bunların sırası 3'-N-P-M-G-L-5' şeklindedir (Wu vd., 2007; Wunner ve Conzelmann, 2020). Kuduz virus genomunun şematik yapısı Şekil 1.2.'de verilmektedir. Başlangıç ve bitiş noktalarında Pasteur Virus (PV) suşu esas alınmıştır. Korunaklılık durumlarına bakıldığında ise yüksekten düşüğe doğru $N > L > M > G > P$ veya $N > L > M > P > G$ şeklindedir (Wu vd.,

2007). P ve G'nin sitoplazmik alanlarının uzunlukları değişiklik arz edebiliyorken, N, L, ve M lyssavirus türleri arasında benzer uzunluktadırlar (Kuzmin vd., 2008). N, P ve L bir araya gelerek ribonükleoprotein kompleksini (RNP) oluşturarak virionun RNA polimeraz aktivitesine katılmaktadır. RNP kompleksinde 1325-1800 kopya ile en fazla bulunan protein nükleoprotein iken, bunu 691-950 kopyayla P sonrasında ise 25-72 kopya ile L proteini izlemektedir. Tüm rhabdoviruslarda yalnızca P fosforilize iken kuduz viruslarında P'nin yanı sıra N de fosforilizedir (Wunner ve Conzelmann, 2020). G proteini tek glikolize proteindir.



Şekil 1.2. Kuduz virus genomunun şematik yapısı (Başlangıç ve bitiş noktaları olarak PV suşu baz alınmıştır)

1.1.1.1. Nukleoprotein (N)

RABV N proteini Pasteur virus (PV) suşu 450 amino asitten (aa) oluşmaktadır. Bu proteini kodlayan gen bölgesinin (N gen bölgesi) oldukça korunmuş olması ve güçlü bir şekilde eksprese edilmesi bu bölgenin rutin teşhiste tercih edilmesine sebep olmuştur (Tordo vd., 1993). Diğer rhabdoviruslarda N gen fosforilize değilken, lyssaviruslarda 389. aa (S389) fosforilizedir ve serine içermektedir (Bernhard Dietzschold vd., 1987; Wunner ve Conzelmann, 2020).

Nukleoprotein genomik RNA'ya bağlanarak transkripsiyon ve replikasyon için bir alt yapı hazırlamaktadır ve genomik RNA'yı doğal immun yanıtın ve intraselüler nukleaz aktivitesinden korumaktadır (Shi vd., 2022).

N gen bölgesi genomun en korunmuş bölgesi olmakla birlikte diğer genotiplerle arasında genetik farklılıklar vardır. Bu da uzak ilişkili virusların ayrımında kullanımını uygun hale getirmektedir.

RNP kompleksinin hayvanlarda bağışıklığı indüklediği gözlenmiş olup (B. Dietzschold vd., 1987; Lafon ve Wiktor, 1985; Tollis vd., 1991), G genden sonra antijenik ve immunolojik özellik bakımından en çok incelenen ikinci gen bölgesi N gen bölgesi olmuştur (Wunner ve Conzelmann, 2020). N gen bölgesinde dört antijenik bölge olduğu saptanmıştır (Shi vd., 2022). Antijenik bölge I (amino asit 358-367 arasında) ve antijenik bölge IV (359-366 ve 375-383 amino asitler olmak üzere birbirinden bağımsız iki alan) lineer epitoplardan (Shi vd., 2022; Wunner ve Conzelmann, 2020), antijenik bölge II ve III belirli konumlara sahip olmayan konformasyonel epitoplardan oluşmaktadır (Goto vd., 2000). 359 ve 366. amino asitler arasındaki bölgeler her iki antijenik bölge tarafından paylaşılmaktadır. Amino asit 359-366 arası kuduz ve kuduz benzeri lyssaviruslarda oldukça korunmuş durumdadır (Shi vd., 2022). Bu nedenle, N protein epitoplarına karşı monoklonal antikorlar (mAb'ler), dünya çapında kuduz ve kuduz ilişkili lyssavirusların teşhisi ve ayırımı için kullanılmıştır. Ayrıca N gen yardımcı T hücrelerinin ana hedeflerinden biridir (Celis vd., 1988).

1.1.1.2. Fosfoprotein (P)

Fosfoprotein RABV PV suşunda 297 amino asitten oluşmaktadır. Bu proteini kodlayan gen bölgesi (P gen bölgesi) beş gen bölgesi içerisinde en az korunmuş olan bölgedir (Wunner ve Conzelmann, 2020). Bir yandan N ile etkileşerek N'in viral RNA'ya nonspesifik bağlanmasına engel olup, N-P yapısının oluşumuna katkı sağlarken (Castel vd., 2009) diğer yandan L'yi stabilize ederek P-L kompleksinin RNA şablonuna yerleşmesini sağlar. RABV P sahip olduğu spesifik alanları sayesinde hem N hem de L ile bağlanarak RNA polimerazın kofaktörü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca konakçıdaki interferon salınımı için gerekli olan sinyal basamaklarını engelleyerek, antiviral yanıtı sınırlandırabilmektedir (Masatani vd., 2010; Wunner ve Conzelmann, 2020). Etkenin vücuda girmesini takiben nöron hücre aksonunun sitoplazmasına genom bileşenlerinin taşınmasında katkı sağlamaktadır (Jadeja ve Tamim Vanak, 2023).

1.1.1.3. RNA bağımlı RNA Polimeraz (L)

RNA bağımlı RNA Polimeraz RABV PV suşunda 2412 amino asit, SAD-B19 suşunda ise 2127 amino asitle kuduz virus genomunun en büyük kısmıdır. Fosfoprotein ile birlikte viral RNA transkripsiyonu ve replikasyonunda yer alan enzimatik aktivitelerin çoğundan sorumludur (Wunner ve Conzelmann, 2020).

1.1.1.4. Matriks protein (M)

Matriks protein RABV PV suşunda 202 amino asit ile virionun en küçük proteini olma özelliğine sahiptir (Conzelmann vd., 1990). Virionun mermi şeklini almasında görev görmektedir. Glikoprotein sitoplazmik alanı ile nukleokapsit arasındaki bağlantıyı sağlayarak virusun tomurcuklanmasında etkin rol oynarken (Wunner ve Conzelmann, 2020), konakçı immün yanıtının engellenmesine de katkı sağlamaktadır (Jadeja ve Tamim Vanak, 2023).

1.1.1.5. Glikoprotein (G)

G proteini tip I membran glikoproteinidir ve RABV PV suşunda 524 amino asitten oluşmaktadır (Conzelmann vd., 1990; Shi vd., 2022). Virus partikülünün tek yüzey proteini olması sebebiyle viral patojeniteyi ve nörovirulansı (Tuffereau vd., 1998) belirlemede kritik role sahiptir (Fallahi vd., 2016). Bilinen tüm nötralizan antikorların hedefidir.

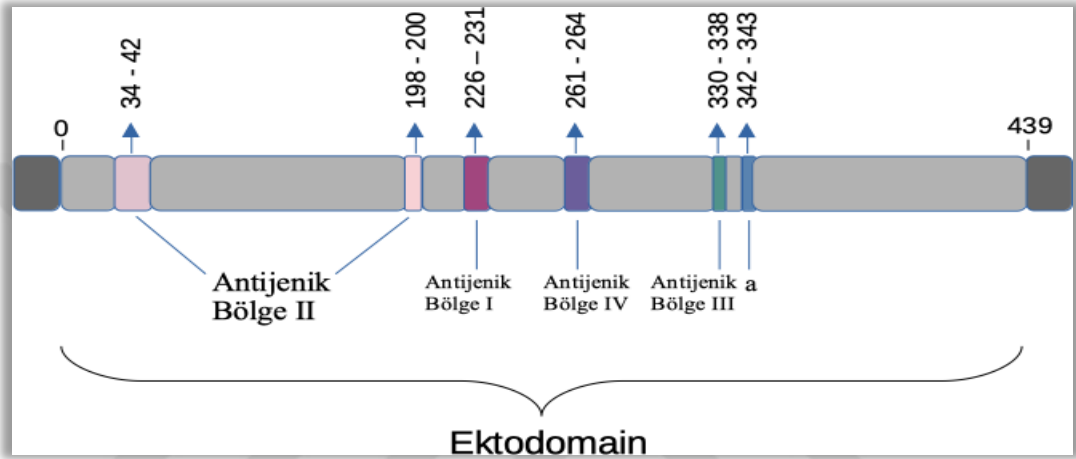
İlk 19 aminoasitten oluşan sinyal peptidi (SP), golgi cisimciğinde proteinden ayrılır ve olgun virus partikülünde bulunmaz (*Lai ve Dietzschold, 1981*: Akt. Tordo vd., 1986; Marston vd., 2007). Sonrasında RABV G endoplazmik retikulumda glikozile edilerek, olgun virus partikülü haline geçer (Shi vd., 2022). Olgun virus partikülünün G proteini; ektodomain (ED), transmembran domain (TD) ve sitoplazmik domain (CD) olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Shi vd., 2022; Wunner ve Conzelmann, 2020) (Şekil 1.2.).

Ektodomain (ED) 1-439. aa olup, viral membranın dışına doğru çıkıntılar yaparak spike'ları oluşturmaktadır. Aynı zamanda RABV G'nin en büyük alanıdır (Shi vd., 2022). Yüzeyinde B ve T hücre antijenik alanları taşımaktadır (Badrane vd., 2001). Virusun hücre reseptörlerine bağlanmasından ve konak hücreye girişinden sorumludur (Thoulouze vd., 1998).

Transmembran alan (TD) 440-461. aa'lerdedir ve RABV G'nin viral lipid membrana tutunması ile ilişkilidir (Albertini vd., 2012; Shi vd., 2022).

Sitoplazmik alan ise (CD) 462-505. aa'lerdedir ve enfekte hücrenin sitoplazmasına doğru uzanarak virusun tamamlanması için M proteini ile etkileşime geçmektedir (Shi vd., 2022; Wunner ve Conzelmann, 2020). SP, ED ve TD uzunluk olarak değişiklik göstermezken, CD 42 – 53 aa arasında değişebilmektedir (Badrane vd., 2001).

Glikoprotein ektodomain üzerinde 4 major antijenik bölge (I, II, III, IV) (Lafon vd., 1983) ve bir küçük antijenik bölge (a) bulunmaktadır (Benmansour vd., 1991; Shi vd., 2022) (Şekil 1.3.). Antijenik bölge I, 226-231. aa'dedir ve oldukça korunmuştur. Buna rağmen bazen RABV G'de amino asit substitüsyonları oluşmakta ve antikorların hem epitopa bağlanması hem de konformasyonel değişikliklere bağlı diğer antijenik bölgelerin etkilenmesi söz konusu olabilmektedir (Seif vd., 1985; Shi vd., 2022; Tuffereau vd., 1989, Marston vd., 2007).



Şekil 1.3. Kuduz virusu G gen ektodomaini şematik görünümü

Antijenik bölge II 34-42. aa ve 198-200. aa olmak üzere iki ayrı bölgeden oluşmaktadır. Kuduz virus suşları arasında oldukça korunaklı bir bölgedir.

Antijenik bölge III 330-338. ve 333-338. aa olup, nötralizan antikorlar için ana bağlanma bölgelerini içermektedir ve aa 330, 333, 336 ve 338 kritik noktalar olarak karşımıza çıkmaktadır (Seif vd., 1985; Shi vd., 2022; Tuffereau vd., 1989). Glikoprotein üzerindeki mutasyonlar virusun nöroinvasitesini azaltmakta veya ortadan kaldırabilmektedir (Tuffereau vd., 1998). Arg³³³ virus patojenitesinde kritik rol oynarken, Lys³³⁰ virionun nöronlara bağlanmasında ve motonöronlarda çoğalmasında (Coulon vd., 1998) önemli rol oynamaktadır (Marston vd., 2007). Yapılan çalışmalarda 330. aa'deki substitüsyon (lysine'in aspartik asite dönüşmesi) ve 333. aa'deki substitüsyon (arginine'in methionine'e dönüşmesi) sonucu kuduz virus suşlarının yetişkin farelerde patojenitesini kaybettiği ortaya koyulmuştur (Coulon vd., 1998). Filogrup I viruslarında 333. pozisyonda arginine (R) yer alırken, filogrup II viruslarında aynı bölgede aspartik asit (D) bulunmaktadır (Badrane vd., 2001). Badrane vd. (2001) yapmış oldukları bir çalışmada Filogrup I (genotip I ve VI) viruslarının hem intraserebral yolla hem de intramuskuler yoldan verildiğinde patojen olduğu; Filogrup II

(genotip II ve III) viruslarının ise yalnızca intraserebral yolla patojen etki gösterdiğini ortaya koyulmuşlardır

333. aa'deki arginine (R)'in lizin (K) haricinde bir amino asit ile yer değiştirmesi durumunda virusun virulent fenotipinin değiştiği hem intraserebral hem de intramuskuler yolla apatojen olduğu belirtilmiştir (Coulon vd., 1998; Tuffereau vd., 1989; Wunner ve Conzelmann, 2020). Dolayısıyla 333. pozisyondaki amino asit RABV'un fenotip tayini için moleküler belirteç olarak görülebilmektedir. 333. aa'teki lizin harici herhangi bir substitüsyonun virusun hücreden hücreye yayılımını azaltabildiği ya da in vivo ve in vitro olarak nöronları enfekte etme yeteneğini etkileyebildiği ancak hücre kültüründe çoğalma yeteneğine etki etmediği bildirilmiştir (Dietzschold vd., 1985).

G proteinde, bahsedilen 4 major antijenik bölge yanı sıra 342-343. aa'ler antijenik bölge III'e yakın olmasına rağmen ondan bağımsız küçük bir epitop olan nötralizasyon bölgesi 'a'yı oluşturmaktadır (Benmansour vd., 1991).

RABV G proteini üzerinde virus suşuna göre değişebilen sayıda N-glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır (Yamada vd., 2014). Kuduz virus saha suşları arasında en yaygın olarak 37. ve 319. aa'lerdeki glikozilasyon bölgeleri korunuyor olmakla birlikte 319. pozisyon tüm genotipler içerisinde en korunaklı alan olarak bildirilmiştir (Badrane vd., 2001; Marston vd., 2007; Wunner ve Conzelmann, 2020).

1.1.1.6. Kodlanmayan İntergenik Bölgeler

Lyssaviruslarda her bir gen bölgesi oldukça değişken olan intergenik bölgelerle birbirinden ayrılmış durumdadır (Marston vd., 2007). Bu intergenik bölgelerin bazıları 20-30 nt gibi kısa aralıktadırlar. G ve L arasında yer alan intergenik bölge ise diğerlerine göre oldukça büyüktür ve 423 nt'ten oluşmaktadır (Tordo ve Poch, 1988). G-L intergenik bölge (psi (Ψ) olarak da adlandırılmaktadır) her ne kadar ilk başlarda pseudogen olarak tanımlanmış olsa da (Tordo ve Poch, 1988; Tordo vd., 1986; Wunner ve Conzelmann, 2020) sonraları bunu destekleyen kanıtlar bulunamamış ve diğer negatif polariteli RNA viruslarında olduğu gibi kodlanmayan intergenik bölge olarak tanımlanmıştır (Kuzmin vd., 2008; Ravkov vd., 1995). Kodlanmayan bu intergenik bölgeler kodlanan bölgelere göre daha az korunmuş durumdadırlar ve hem uzunluk hem de nükleotid yapısı bakımından oldukça fazla değişkenlik gösterebilmektedirler (Le Mercier vd., 1997; Tordo ve Poch, 1988).

1.2. Bulaşma ve Patogenez

Lyssaviruslar Rhabdoviridae ailesindeki diğer viruslarla pek çok ortak özelliği paylaşıyor olmakla birlikte (virus morfolojisi, genel genom organizasyonu, yapısal proteinler vb.), bulaşta diğerlerinde olduğu gibi vektörler aracılığıyla değil de direkt bulaşma yolunu kullanmaktadırlar (Wunner ve Conzelmann, 2020).

1804 yılında Alman bilim insanı Zinke'nin de tanımladığı gibi (Rupprecht vd., 2002) kuduz virusunun primer bulaş yolu enfekte hayvan tarafından ısırılma veya enfekte materyalin (salya, beyin-omurilik sıvısı, sinir dokusu vb.) açık deri lezyonlarına direk temasıyla şekillenmektedir (WHO, 2024e). Daha nadir görülmekle birlikte, çok fazla yarasanın yaşadığı mağaralarda (Constantine, 1962) ve laboratuvar çalışanlarında (Organization, 1977; Winkler vd., 1973) aerosol yolla bulaş da bildirilmiştir. Bir diğer bulaş yolu olarak organ transplantasyonları raporlanmıştır (Baer vd., 1982; Javadi vd., 1996; Saeed ve Al-Mousawi, 2017). Oral yolla bulaş bugüne kadar bildirilmemiş olmakla birlikte kuduz hayvanlara ait etlerin ve sütlerin tüketimi kesinlikle önerilmemektedir (WHO, 2024c).

Virus organizmaya girdikten sonra çizgili kas hücrelerinde çoğalabilmekte veya direk sinir hücrelerini enfekte edebilmektedir (WHO, 2024e). Maruziyeti takiben reseptörlere bağlanan virus, ısırık bölgesindeki epitel hücrelerinde replikasyona başlayabileceği gibi, lokal kas dokusuna yerleşip kas hücrelerinin sitoplazmasında da replike olabilmektedir. Ancak her iki durumda da üreme çok az olduğu için etken immun sistem tarafından tespit edilememektedir. Enfeksiyonda viremi döneminin bulunmaması virusun kan ve lenflerde de tespitini imkansız kılmaktadır (Malik vd., 2020). Virus 12-14 mm/gün hızla spinal gangliona ulaşmakta (Maurya vd., 2015), sonrasında ise ortalama 100-400 mm/gün hızla MSS'e taşınmaktadır (Maurya vd., 2015; Tsiang vd., 1989).

Kuduz virusu motor nöron aracılığı ile nöromusküler bağlantılar yoluyla veya sinir içcikleri yoluyla sinir sistemine ulaşmaktadır (Lafon, 2011). Aksonlara giren virusun ilerleyişi antikorlar tarafından durdurulamamaktadır ve enfekte nöronlar apoptozisten korunmaktadır (Lafon, 2011; Malik vd., 2020). Enfekte hücrelerden G proteininin sınırlı ekspresyonunun da immun sistemden kaçışta yardımcı rol oynadığı düşünülmektedir (Lafon, 2011).

Etken cerebrum ve cerebellumu enfekte edemediyse, süreç klinik belirtilerin görülmediği abortif enfeksiyon olarak sonuçlanmaktadır. Ancak beyne ulaşip çoğalmaya başlayan virus periferik sinirler aracılığıyla sentrifugal yolu kullanarak öncelikle tükürük bezlerine, retina, korneaya ve diğer doku ve organlara yayılmaktadır (Malik vd., 2020).

Tükürükle saçılmaya başlayan kuduz virusu artık enfeksiyon siklusunu tamamlamıştır (WHO, 2024e).

1.2.1. Virusun Transkripsiyon ve Replikasyon Mekanizması

Kuduz virusu G proteini enfeksiyon mekanizmasının ilk aşamalarında kritik rol oynamaktadır. Öncelikle reseptörlerin tanınması, virusun hücre reseptörüne bağlanması ve virusun endositoz yoluyla hücre içerisine girmesinde pH'ın düşürülmesi, viral membranla endozomal membranın füzyonuna aracılık etmek gibi önemli görevleri bulunmaktadır (Albertini vd., 2012; MacLachlan ve Dubovi, 2017; Wunner ve Conzelmann, 2020). Kuduz virusunun replikasyonu konakçı hücrenin sitoplazmasında gerçekleşmektedir. Membran füzyonunu takiben RNP sitoplazmaya salınarak ve ilerleyen süreçler için şablon görevi görmektedir.

Kuduz virusu N proteini önce kendisine şaperon görevi görecek olan P proteini ile ilişkilendirir (Jayakar vd., 2004), sonrasında yeni sentezlenen RNA ile etkileşime geçerek nükleokapsit şekillendirilir (Okumura ve Harty, 2011). RNP formasyonu şekillenip M proteini tarafından spesifik mermi yapısı verilirken (Jayakar vd., 2004; Mebatsion vd., 1999), G proteini tomurcuklanmanın şekilleneceği plazma membranında mikro alanlara lokalize olmaktadır (Okumura ve Harty, 2011). M proteini, G proteinin yerleştiği mikro alanların membrana doğru eğilmesini sağlayarak virion çıkışını kolaylaştırarak tomurcuklanmada görev almaktadır (Albertini vd., 2011).

Virus hücreye girebilmek için karbonhidratları, fosfolipitleri, gangliositleri, nikotinik asetilkolin reseptörlerini (nAChR) (Wunner, 1982), nöral hücre adhezyon molekülünü (CD56) ve düşük afinite sinir büyüme faktör reseptörlerini (p75NTR) (Tuffereau vd., 1998) kullanabilmektedir (Hemachudha vd., 2002). nAChR bağlanma alanı; antijenik bölge II'ye denk gelen 173-204. aa'ler arasında yer almaktadır (Lentz vd., 1984). Dolayısıyla, antijenik bölge II'yi hedef alan nötralizan antikorlar, nAChR ve RABV G'nin bağlanmasını bloke ederek hücrenin virus tarafından enfekte olmasını önleyebilir (Shi vd., 2022). Ancak nAChR'nin bir RABV reseptörü gibi davrandığını gösteren ve hayvan modellerinden elde edilen bir kanıt bulunmamaktadır (Evans vd., 2018). Kuduz virusu nAChR'yi eksprese etmeyen nöronları enfekte edebilir ve nAChR, esas olarak nöromusküler bağlantıların kas tarafında bulunur. Ayrıca sinir büyüme faktör reseptörünün (p75NTR) kuduz virusu G'nin ektodomaini ile direkt ilişkili olduğu bulunmuştur (Shi vd., 2022). Kuduz virusunun taşınması p75NTR ile p75NTR'siz haline göre daha hızlı ve doğrusal bulunmuştur (Gluska vd., 2014).

Kuduz virusunun akson yoluyla transkripsiyon ve replikasyonun gerçekleştiği hücre gövdesine taşınması için iki farklı yol önerilmiştir. Bunlardan biri füzyon sonrası nükleoprotein tek başına taşındığı yol iken, bir diğeri tüm virionun vezikül içerisinde taşındığı yoldur (Albertini vd., 2012).

Virus, reseptöre bağlandıktan sonra hücreye endositik yolla giriş yapmaktadır. Nükleokapsidin sitoplazmaya girişinden sonra virus hücresel mekanizmaları ele geçirir ve inklüzyon cisimciklerinin oluşumunu indükler. Bu yapılar enfeksiyondan hemen sonra çok kısa süre içerisinde tespit edilir (Albertini vd., 2012).

1.3. Epidemiyoloji

Kuduz enfeksiyonunun epidemiyolojisinde, kentsel kuduz ve silvatik kuduz olmak üzere iki farklı döngü tanımlanmıştır (Malik vd., 2020; Spickler, 2021; WOA, 2009). Kentsel kuduz olgularında primer bulaş kaynağı olarak köpekler rol oynamaktayken, silvatik kuduz olgularında vahşi yaşam ön plana çıkmaktadır (Spickler, 2021). Gelişmiş ülkelerin çoğunda kentsel kuduz olguları eradike edilmiş ve silvatik kuduz ön plandayken; gelişmekte olan ülkelerde kentsel kuduz tek başına veya silvatik kuduzla birlikte seyretmektedir. Hastalık Antartika dışında tüm kıtalara yayılmıştır (Rupprecht vd., 2002).

Virusun devamlılığı coğrafi bölgelere göre farklılık gösteren ve farklı bulaş dinamiklerine sahip çok sayıda rezervuar tür tarafından sürdürülmektedir (Bourhy vd., 2008; Rupprecht vd., 2020). Lyssaviruslar tüm memelilerde ensefalit oluşturma yeteneğine sahip olmakla birlikte (Banyard ve Fooks, 2021) prototip olarak kabul edilen kuduz virusları insanlardaki vakaların büyük kısmından sorumludurlar (WHO, 2024d). Bazı memeli türleri kuduz virusu için son konakçı olarak kalırken bazıları rezervuar görevi görerek döngünün devamını sağlamaktadırlar. Rezervuar konakçılar çoğunlukla *Canidae* (köpekler, çakallar, kır kurtları, kurtlar, tilkiler, rakun köpekler), gelincikler (çeşitli kokarca türleri ve porsuklar), misk kedisigiller-*viverridae* (mongozlar, misk kedisi), rakungiller (rakunlar) ve *chiroptera* takımı (yarasalar) üyeleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Spickler, 2021).

Ülkelere göre silvatik kuduz döngüsündeki konakçılara kabaca bakılacak olursa Amerika’da rakunlar, tilkiler, kır kurtları, çeşitli kokarca türleri, yarasalar; Karayipler’de Hint firevun fareleri; Asya’nın bazı bölgelerinde çakallar, tilkiler, kurtlar, rakun köpekler, gelincikler, porsuklar, firevun fareleri; Avrupa’da ise tilkiler sayılabilmektedir (Spickler, 2021).

Kuduz viruslarının coğrafi orijinleri ile filogenetik ilişkileri arasında güçlü bir bağlantı bulunmuştur (Bourhy vd., 2008; Horton vd., 2015; Sacramento vd., 1992). Coğrafi bölgenin sahip olduğu doğal bitki örtüsü çeşitliliği olası rezervuar türlerine yaşam alanı olacağı için hastalığın yayılmasında ve epidemiyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Banyard ve Fooks, 2021). Ayrıca coğrafi bölgedeki doğal yapılar (dağlar, denizler, nehirler gibi) epizootik yayılma önünde engel olabileceği gibi (Bourhy vd., 2008; Fooks vd., 2017; Nadin-Davis ve Real, 2011; Pieracci vd., 2024); insanlar tarafından açılan yollar, artan hayvan hareketleri gibi faktörler hastalığın farklı bölgelere yayılmasında veya aynı bölgede farklı rezervuar türlerin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (Fooks vd., 2017; Pieracci vd., 2024).

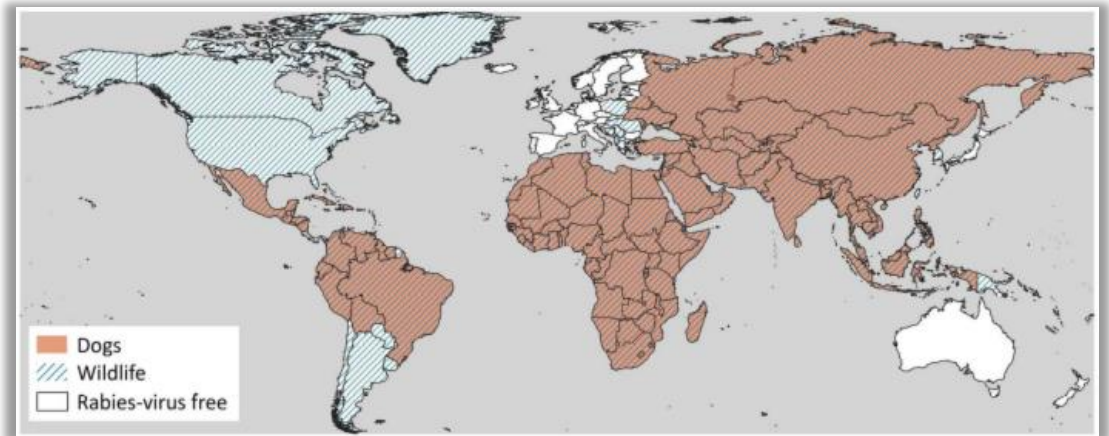
Lyssavirus türlerine göre konakçılar ve dağılım gösterdikleri yerler Çizelge 1.1.'de , bölgelere göre konakçı türleri ise Çizelge 1.2.'de sunulmaktadır. Kuduz hastalığının dünya genelinde güncel durumu Şekil 1.4.'te yer almaktadır.

Çizelge 1.1. Lyssavirus türlerine göre konakçılar ve dağılım gösterdikleri yerler (WHO, 2024d)

Virus Türü	Potansiyel vektör/rezervuar	Dağılım
Rabies virus	Carnivorlar (dünya genelinde), yarasalar (Amerika'da)	Birkaç ada hariç dünya geneli
Lagos bat lyssavirus	Meyve yiyen yarasalar (Megachiroptera)	Afrika
Makola lyssavirus	-	Sahraaltı Afrika
European bat lyssavirus 1	Böcek yiyen yarasalar (Eptesicus serotinus)	Avrupa
European bat lyssavirus 2	Böcek yiyen yarasalar (Myotis daubentonii, M. dasycneme)	Avrupa
Australian bat lyssavirus	Meyve yiyen/böcek yiyen yarasalar (Megachiroptera/Microchiroptera)	Avustralya
Aravan lyssavirus	Böcek yiyen yarasalar (Myotis blythi)	Orta Asya
Khujand lyssavirus	Böcek yiyen yarasalar (Myotis mystacinus)	Orta Asya
Irkut lyssavirus	Böcek yiyen yarasalar (Murina leucogaster)	Doğu Sibirya
West Caucasian bat lyssavirus	Böcek yiyen yarasalar (Miniopterus schreibersi)	Kafkas Bölgesi
Shimoni bat lyssavirus	Hipposideros commersoni	Doğu Afrika
Bokeloh bat lyssavirus	Böcek yiyen yarasalar (Myotis nattereri)	Avrupa
Ikoma lyssavirus	Afrika misk kedisi'nden (Civettictis civetta) izole edilmiş	Afrika
Gannoruwa bat lyssavirus	Meyve yiyen yarasalar (Pteropus giganteus)	Asya
Lleida bat lyssavirus	Böcek yiyen yarasalar (Miniopterus schreibersi)	Avrupa (İspanya)

Çizelge 1.2. Bölgelere göre konakçı türleri

BÖLGE	KONAKÇI TÜRLERİ
Afrika	Köpek (<i>Canis lupus familiaris</i>)
	Çakal (<i>Genus Canis</i>)
	Mongoz (<i>Herpestidae</i> ailesi)
	Meyve yiyen yarasalar
	Böcek yiyen yarasalar
Asya	Köpek (<i>Canis lupus familiaris</i>)
	Kurt (<i>Canis lupus</i>)
	Çin sansarı (<i>Melogale moschata</i>)
Kuzey Amerika	Kutup tilkisi (<i>Alopex lagopus</i>)
	Kızıl tilki (<i>Vulpes vulpes</i>)
	Gri tilki (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)
	Çizgili kokarca (<i>Mephitis mephitis</i>)
	Rakun (<i>Procyon lotor</i>)
	Böcek yiyen yarasalar
Orta ve Doğu Amerika	Vampir yarasalar
	Meyve yiyen yarasalar
	Böcek yiyen yarasalar
	Mongoz (<i>Herpestidae</i> ailesi)
	Köpek (<i>Canis lupus familiaris</i>)
Avustralya	Meyve yiyen yarasalar
	Böcek yiyen yarasalar
Avrupa	Kızıl tilki (<i>Vulpes vulpes</i>)
	Kutup tilkisi (<i>Alopex lagopus</i>)
	Rakun köpeği (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)
	Köpek (<i>Canis lupus familiaris</i>)
	Böcek yiyen yarasalar



Şekil 1.4. Kuduz hastalığının dünya genelinde dağılımı (CDC, 2024a)

Coğrafya ve doğal bariyerlerin kuduz virusunun evrimini etkilediği bilinmektedir. Virus popülasyonlar içerisinde varlığını sürdürebilmek için rezervuarlar arası bulaşma, spill-over ve konakçı değişimleri gibi en az üç yol kullanmaktadır (Rupprecht vd., 2020). Lyssavirusların yarasayla ilişkili bir atadan evrimleştiği ve bahsi geçen yolları kullanarak çeşitlendiği düşünülmektedir (Badrane ve Tordo, 2001; Banyard ve Fooks, 2021; Fooks vd., 2017; Rupprecht vd., 2017). Tüm filogrup I lyssavirusları yarasalarda sirküle olurken, kuduz virusu aynı zamanda karnivorlara da adapte olmuştur (Marston vd., 2018; Rupprecht vd., 2017) ve dünya genelinde mezokarnivorlarla (köpekler, tilkiler, rakun köpekler, rakunlar, mongozlar ve kokarcalarla) en çok da köpeklerle varlığını sürdürmektedir. Eski dünya yarasalarında tespit edilmemiş olan kuduz virusu, Amerika'da 40'tan fazla yeni dünya yarasasında (kan emen, böcek yiyen, bitki yiyen) yayılımına devam etmektedir (Badrane ve Tordo, 2001; Banyard ve Fooks, 2021; Fooks vd., 2017; Fooks vd., 2021) ve halk sağlığının yanı sıra ekonomik olarak çiftlik hayvanları için de büyük tehlike arz etmektedir (Banyard ve Fooks, 2021). İstisnai olarak ise Namibya'da bir herbivor olan kudunun (*Tragelaphus strepsiceros*) kuduz virus rezervuarı olarak görev gördüğü de raporlanmıştır (Scott vd., 2013).

Kuduz ilişkili lyssavirusların çoğu böcek yiyen ve meyve yiyen yarasalarda sirküle olmaktadır (Spickler, 2021). Filogrup II'de yer alan LBV ve SHIBV yarasalarda sirküle olurken, MOKV birkaç olguda kır farelerinde ve vahşi rodentlerde tespit edilmiş olup, yarasalarda bulunmamıştır ve rezervuarı henüz tam olarak bilinmemektedir (Rupprecht vd., 2017; Spickler, 2021; WHO, 2024d). WCBV ve LLEBV'nin rezervuarları yine yarasalardır. IKOV ise Afrika misk kedisinden izole edilmiş olsa da WCBV ve LLEBV ile filogenetik yakınlığı olgunun spillover olabileceğini akla getirmektedir (Rupprecht vd., 2017). Avrupa'daki yarasalar aracılığıyla kuduz vakalarının çoğu EBLV-1 kaynaklıdır (Racey vd., 2013; Schatz vd., 2013).

Köpek kuduz virusu 6 ana filogenetik dalda dünya geneline yayılmış durumdadır. Cosmopolitan dalı dünya genelinde yaygın olmakla birlikte diğer dallar daha bölgesel olarak karşımıza çıkmaktadır. Afrika-2 dalı Batı Afrika'da bulunurken, Afrika-3 dalı Doğu Afrika'da baskındır. Asya dalı, ağırlıklı olarak Orta ve Doğu Asya'da görülür. Arktik kümesi çoğunlukla Arktik Dairesi'ne komşu bölgelerde ve Batı Asya'da bulunur. Hint Yarımadası dalı ise Sri Lanka ve Güney Hindistan'da dağılım göstermektedir (Huaman vd., 2023).

Kısaca dünya genelinde hastalığın dağılımına bakacak olursak Avrupa'da köpek kuduzu ile mücadele başarılı bir şekilde ilerlerken, 1940'larda II. Dünya Savaşı'nın ortaya çıkmasıyla süreç tersine dönmüş ve Avrupa vahşi yaşam kuduzuyla karşı karşıya kalmıştır.

Köpeklerden konakçı değişimi yoluyla kızıl tilki ve rakunlara geçiş yaptığı tahmin edilen bu yeni epizooti Avrupa geneline yayılmış (Horton vd., 2015; Rupprecht vd., 2020; Wallace ve Blanton, 2020); kentsel kuduz vakalarındaki klasik mücadele yöntemleri sonuç vermeyince başka yollar aranmaya başlanmıştır. Bu süreçte tilkilerin oral aşılama yöntemiyle bağışıklanabileceği ortaya koyulunca (Rupprecht vd., 2020) 1978’de sahada ilk oral aşı denemesi İsviçre’de başlamıştır. Bunu diğer ülkeler takip etmiş olup Avrupa’da oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. Bununla birlikte alınan başarılı sonuçların devamını sağlayabilmek adına kalıcı kordon karantina hattının şart olduğu da ortaya koyulmuştur (Rupprecht vd., 2020; Wallace ve Blanton, 2020).

Afrika’da hem köpek aracılı kuduz hem de vahşi yaşam kuduzu (çakallar, yarasalar, kulaklı tilkiler ve mongozlar aracılığıyla) yaygın bir şekilde görülmektedir (Wallace ve Blanton, 2020). Yaklaşık olarak yıllık 21,476 kişinin köpek kuduzuna bağlı olarak hayatını kaybettiği düşünülmektedir (WHO, 2024a). Özellikle yerel halkın yeteri kadar bilgi sahibi olmaması, aşı ve immünglobulin gibi tıbbi kaynakların oldukça sınırlı olması, teşhis imkanlarının yetersiz olması gibi sebepler enfeksiyonun bölgede yayılmasına sebep olmuştur.

Orta Doğu’da her yıl 229 kişinin kuduza bağlı hayatını kaybettiği düşünülmektedir (WHO, 2024a). Horton vd. (2015)’nin yapmış olduğu epidemiyolojik çalışmada Orta Doğu’da 4 ayrı dal ortaya koyulmuştur. Bunlardan biri özellikle Kafkas bölgesinde sirküle olmaktadır ve 80-127 yıl önce sirküle olan virusla ortak bir atayı paylaşmaktadır. Son 80 yıl içinde Türkiye veya İran’daki bir atadan köken aldığı düşünülen 2. dal ise sonraki süreçte iki koldan Kafkasya’ya, bir koldan da Arap yarımadasına giriş yapmış olup Arap yarımadasındaki tüm virüsler bu daldan köken almaktadır ve Orta Doğu’da oldukça geniş bir yayılım göstermektedir. Üçüncü dal Avrupa’dan Türkiye’ye girmiş gibi görülmekte olup, 50 yıldır Türkiye’de varlığını sürdürmektedir. Bu dala 2005 yılında İsrail’de rastlanmış olması dışında sınır ötesi hareketi pek görülmemiştir. Virüslerin büyük çoğunluğu bu üçüncü dalda toplanmış olup, köpek ve yaban hayatı suşlarını içeren alt dallar bulunmaktadır. Dördüncü dal son 75 yıl içinde İran veya Türkiye’de ortaya çıkmış olup Kafkasya ve Orta Doğu’ya yayılmıştır. Orta Doğu’da insan vakalarında köpekler en fazla rolü oynarken, vahşi yaşam çiftlik hayvanlarına etki ederek büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Bengoumi vd., 2018). Vahşi yaşamda virusun devamlılığını kızıl tilki, sarı çakal ve kurt sürdürmektedir (Horton vd., 2015).

Orta Doğu’da kuduzdan en çok etkilenen ülkelerden biri İran’dır. İnsan vakaları köpeklerle ilişkilendirilmiştir. Her ne kadar kurtlar sosyal yapıları ve demografileri gereği kuduz için doğal rezervuar olmasa da İran’da kurtların da insana bulaşta rol oynadığı ortaya

koyulmuştur ve oral aşılama önerilmiştir (*Janani vd., 2008*; Akt. Bengoumi vd., 2018). Tarihte de kurtların Türkiye, İran, Rusya gibi farklı ülkelerde çok sayıda insan vakasından sorumlu oldukları görülmektedir (*Barber-Lomax, 1960*; *Hanlon, 2013*; Akt. Horton vd., 2015; *Steele, 1991*; Akt. Horton vd., 2015). İran'da *Cosmopolitan* dal baskın olmakla birlikte *Arctic-like lineaj* da tespit edilmiştir (Horton vd., 2015).

İsrail ve Ürdün'de vahşi yaşam kuduzu ön plana çıkmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar hastalığın komşu ülkelerden gelen yabani hayvanlar aracılığıyla dağıldığını ortaya koymuştur (Bengoumi vd., 2018). İsrail'in kuzey kesiminde izole edilen viruslar Türkiye kökenli bulunurken, İsrail ve Ürdün'deki diğer virusların İran ve Arap yarımadasından köken aldıkları tespit edilmiştir (Horton vd., 2015). Irak'ta ise hem vahşi yaşam hem de kentsel kuduz ön plandadır (Shabansalmani vd., 2023).

Afganistan ve Pakistan'da ise baskın dal olarak Arktik dal görülmektedir (*Arctic-like 1b*). İlginçtir ki kendileri ile 1000 km'lik sınırı paylaşan İran'da sirküle olan *Cosmopolitan* dal Afganistan ve Pakistan'da tespit edilmemiştir (Horton vd., 2015).

1.3.1. Türkiye'de Kuduz Hastalığının Epidemiyolojisi

Ülkemiz topraklarında kuduz hastalığına ilgili çalışmalara dönemin Osmanlı İmparatoru Sultan II. Abdülhamit zamanında başlanmış olup, Paris Pasteur Enstitüsü'ne bir heyetin gönderilmesi ardından, 1887 yılında kuduz hastalığına ilişkin faaliyet gösteren ilk laboratuvar kurulmuş ve Pasteur'ün metoduyla ilk kuduz aşısı üretimine başlanmıştır (Demirden vd., 2022). Dünya savaşı sırasında ve kurtuluş savaşı döneminde tüm hastalıklarda olduğu gibi kuduz vakalarında da bir artış gözlenmiş ve bahsi geçen kurumlar aracılığıyla mücadele edilmiştir.

Buradan da anlaşılacağı üzere kuduz hastalığına ilişkin çalışmaların kökeni oldukça eskiye dayanmaktadır.

Türkiye Cumhuriyeti'nin kurulmasının ardından ise 1927 yılında ilk semple tipi aşı üretimine başlanmış olup 1933 yılında üretim kapasitesi arttırılmış, 1936 yılında ise Hıfzıssıhha kurumu tarafından kuduz serumu üretimine başlanmıştır. 1963 yılı itibariyle de Kelev aşısı ile aşılama başlanmıştır. Ancak DSÖ tarafından bu aşılamanın tavsiye edilmemesiyle birlikte, ülkemizdeki kuduz aşısı üretimi 1996 yılında durdurulmuş ve hücre kültürü aşılamanın kullanımına geçiş yapılmıştır (Demirden vd., 2022).

Daha yakın tarihli kuduz vakalarına ilgili verilere göz atacak olursak, Gürel (1990) tarafından bildirildiğine göre 1980-1989 yılları arasında vaka sayıları azalma eğilimine girmiş, 1980 yılında 2088 olan toplam vaka sayısı 1989 yılında 584'e gerilemiştir. Bu 584 vakanın 578'i (% 98,9) evcil hayvanken (439 köpek, 80 sığır, 31 kedi, 14 koyun/keçi, 11 at, 3 diğer), yalnızca 6 tanesi (%1,1) (2 tilki, 1 sansar, 2 ev faresi) yaban yaşam kaynaklı bulunmuştur. Söz konusu 10 yıla bakıldığında total rakamda azalma olduğu görülse de İstanbul gibi büyük şehirlerde kuduz vaka sayılarında artış olduğu belirtilmiştir. Bu durum, küçük yerleşim yerlerinde aşılarda daha kolay uygulanabilir olması ve aşılanmanın başarısı ile ilişkilendirilmiştir.

1990 ile 2000 yılları arasında ise toplamda 2856 kuduz vakası bildirilmiş olup, bu sayının % 78'i köpek, % 1,6'sı ise yaban yaşamdan tespit edilmiştir (Vos vd., 2009). 1999 yılına gelindiğinde Ege Bölgesi'nde dikkat çekici bir gelişme yaşanmıştır. Bu bölgede 1995 yılında yalnızca iki vakayla neredeyse sıfırlanma noktasına gelen kuduz olgularında dikkat çekici bir artış olmuştur. Buradaki esas dikkat çekici nokta ise uzun yıllar boyunca düşük oranda seyreden yaban yaşamdaki kuduz vaka sayısının çiftlik hayvanlarındaki vaka sayılarıyla birlikte paralel artışı olmuştur. Bu artış vahşi yaşamda endemik bir kuduz döngüsünü akla getirmiş olup, Marston vd. (2017) tarafından yapılan çalışmayla 1999 yılında Urla'da ortaya çıkan tilki vakasıyla köpeklerden tilkilere bir konakçı kayması gerçekleştiği ortaya koyulmuştur. Ege bölgesinde ortaya çıkan bu durum sonucunda 2008-2010 yılları arasında İzmir, Aydın, Manisa, Uşak, Denizli ve Muğla illerinde havadan ilk oral aşılama kampanyası başlatılmıştır (Johnson vd., 2010; Un vd., 2012). Bu kampanya AB tarafından (European Commission (TR 503.06/001 Technical Assistance for control of rabies disease)) desteklenmiş olup Ege bölgesinin 36.847 km²'lik alanının, canlı atenué oral aşılarla havadan atım şeklinde aşılması hedeflenmiştir. Kampanya bölgesinde pozitif vakalarda düşüş gerçekleşmiş ancak bölgenin iklim koşulları, turistik bir bölge olması, bölgede tarım faaliyetlerinin yoğun olması sebebiyle, yılda iki kez yapılması planlanan program kış ayları ile sınırlı kalmıştır. Ayrıca büyük yerleşim yerlerinin varlığı, bölgedeki askeri alanlar gibi uçuş yasağı olan bazı bölgelerde aşı dağıtımı sınırlanmıştır (Un vd., 2012). Bununla birlikte bu süreçte hastalık ülkenin Güney, Güneydoğu, Marmara ve İç Anadolu bölgelerine doğru yayılmaya devam etmiştir (Un vd., 2012; Vos vd., 2009).

Bu kampanyanın devamı niteliğinde yaban yaşam kaynaklı kuduz hastalığının yoğun olarak görüldüğü Aksaray, Ankara, Çankırı, Çorum, Kayseri, Kırıkkale, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Niğde, Yozgat, Adana, Karaman, Sivas, Tokat, Samsun, Amasya, Sinop, Kastamonu, Mersin illerinin de dahil olduğu 20 ilde 2014-2015-2016 yıllarında senede bir

defa olmak üzere havadan aşılama çalışması yürütülmüştür (GKGM, 2019a; Konya DSYB, 2015). 2019 yılında ise havadan aşılama çalışmaları kapsamında Çanakkale, Balıkesir, Bursa, Manisa, Aydın, Denizli, Burdur, Muğla, Isparta, Afyonkarahisar, Nevşehir, Uşak, Kütahya, Ankara, Aksaray, Yozgat, Kırşehir, Kırıkkale, Çankırı, Kastamonu, Çorum, Tokat, Sivas, Kayseri, Samsun, Amasya, Konya, İzmir illerinin dahil olduğu alanlarda oral aşılama çalışmaları yapılmıştır (GKGM, 2019b). 2023 yılı sonbaharında Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesindeki 132.000 km²'lik ormanlık ve kırsal alanlara km²'ye 20 bait olacak şekilde atımlar yapılmış olup, 2024 yılında Bakanlık bütçesinden oral aşılama kampanyalarına devam edileceği belirtilmiştir (Aylan, 2023).

ADIS verilerine göre Türkiye'de 2015-2019 yıllarına ait toplam pozitif örnek sayısı ortalama 250-300; 2019-2023 yıllarına ait toplam pozitif örnek sayısı ise yaklaşık 150-250 olarak bildirilmiştir. 2024 yılı için bildirilen toplam örnek sayısı ise ilk altı ay için 55'tir (Commission, 2024).

Günümüzde gerek parenteral aşılarla köpek aracılı kuduz olgularıyla gerekse yaban yaşamda uygulanan oral aşılamalar ile vahşi yaşam kuduzuyla mücadeleye devam edilmektedir.

1.4. Klinik Bulgular

Isırılan hayvanlarda ve insanlarda inkubasyon süresi virusun organizmaya giriş yerinin MSS'e olan uzaklığına, girdiği bölgenin inervasyonuna, yaranın derinliğine, viral yüke ve virusun virulensine (Jackson, 2020; Malik vd., 2020) bağlı olarak değişmektedir. Özellikle vahşi karnivorların tükürüğünde bulunan hyaluronidaz, doku geçirgenliğini artırarak, virusun girişini kolaylaştırabilmektedir (Malik vd., 2020).

İnsanlarda inkubasyon süresi genellikle 20-90 gündür. Ancak birkaç gün ile 1 yıldan uzun inkubasyon süreleri de bildirilmiştir (Smith vd., 1991). İnsanlarda maruziyet sonrası klinik belirti gösterene kadar 2-7 yıl geçen olgular bulunmaktadır. İstisnai olarak yalnızca bir kedide inkubasyon periyodu 2 yıl olarak bildirilmiş olup, bunun haricinde başka bir evcil hayvanda benzer inkubasyon periyodlarıyla karşılaşılması (MacLachlan ve Dubovi, 2017). Hastalığın başlangıç döneminde semptomlar tutarsız ve hafif seyredebilmektedir. Ateş, anoreksi/iştah artışı, dehidrasyon, kusma, ishal, hipersalivasyon gibi non spesifik bulguların yanı sıra nörolojik tutulumu düşündürecek korku, huzursuzluk, saldırganlık, pupillaların genişlemesi, uyarılara karşı aşırı reaksiyon gösterme gibi bulgularla karşılaşılabilir (Spickler, 2021).

Kuduz enfeksiyonunun klinik seyri prodromal, saldırgan ve felç dönemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Prodromal (Sakin) dönem klinik bulguların ortaya çıkmasından hemen önceki dönemdir. Genelde 1-3 gün sürmektedir (Malik vd., 2020).

Saldırgan dönem limbik sistem enfeksiyonuyla ilişkilidir ve huzursuzluk, uluma, polipne, diğer hayvanlara, insanlara veya cansız cisimlere karşı sebepsiz saldırganlık, pika davranışları ile karakterizedir (Malik vd., 2020; Spickler, 2021). Yabani hayvanlarda korku kaybı vardır ve normalde insanlardan kaçtıkları halde, insanlara veya diğer hayvanlara yaklaşırlar hatta saldırgan hale gelirler. Nokturnal (gececi) hayvanlarda ise gündüz aktif olma durumu görülebilmektedir (Spickler, 2021). Özellikle terminal dönemde konvülsiyonlar yaşanır ve bazen bu aşamada ölüm görülebilir. Hastalık ilerledikçe saldırganlık azalır, inkoordinasyon ve artan felçle birlikte ölüm görülmektedir (Malik vd., 2020; Spickler, 2021).

Felç döneminde boğaz kaslarının felci sonucu yutkunma güçlüğü, hipersalivasyon, larengeal felç sonucu ses değişiklikleri, yüz felcine bağlı mandibulada düşme gibi bulguların yanı sıra, aşırı uyku ve depresyon görülebilmektedir (Spickler, 2021). Bu dönemde ısırma nadirdir. Progresif seyreden felç ile birlikte hızla koma gelişir ve ölüm genellikle solunum yetmezliğine bağlıdır (Malik vd., 2020; Spickler, 2021).

1.5. Teşhis

Hızlı ve doğru teşhis insanlarda uygulanacak olan maruziyet sonrası profilaksi ve halk sağlığı kontrol stratejileri açısından büyük önem arz etmektedir. Hastalıkta büyük patognomik bulgu olmaması ve spesifik ve tutarlı bir klinik tablo görülmemesi dolayısıyla kesin teşhis yalnızca laboratuvar yöntemleri ile mümkün olmaktadır (WOAH, 2023). Teşhis için antijen tespiti önemlidir ve post-mortem kesin tanı için en uygun materyal beyin materyalidir (Hildegund, 2020). Serolojik yöntemler yalnızca antikor tayini için önerilmekte olup, serokonversiyonun çok geç şekillenmesi ve yüksek mortalite gözlenmesi sebebiyle ante-mortem teşhiste öncelikli yöntem olarak önerilmemektedir. Kuduz virusunun inaktivasyonu çok hızlı olduğu için numune gönderimi en kısa sürede ve soğuk zincir altında olmalıdır (WOAH, 2023).

Direkt floresan antikor testi (DFA) WHO ve WOAH tarafından post-mortem kuduz tanısında altın standart olarak kabul edilen ve antijen tespitini amaçlayan bir yöntemdir (WOAH, 2023). Soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırılan taze beyin dokusundan DFA ile

2 saat içerisinde % 96 - 99 oranında hassas ve spesifik sonuç verilebilmektedir. Teşhis için taze beyin dokusu tercih edilmekle birlikte, kornea, tükürük bezi, ense kıl kökü biyopsi materyali de teşhis amacıyla kullanılabilir. Ancak beyin dokusu haricindeki teşhis materyallerinde DFA'nın hassasiyeti azalttığı unutulmamalıdır (Ashwini vd., 2024). Kuduz virusu enfekte hücrelerin sitoplazmasında negri cisimcikleri adı verilen sitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin oluşmasına sebep olmaktadır (Negri,1903: (Albertini vd., 2011). DFA, floresan izotiyosyanat ile işaretli antikorlar ile (FITC) kuduz virusu N antijeninin floresan mikroskop altında görüntülenmesi esasına dayanmaktadır (Ashwini vd., 2024; Fooks vd., 2009). Analizin duyarlılığı numunenin tazeliğine, konjugatın kalitesine, floresan mikroskop varlığına ve eğitimli, uzman personele bağlıdır (Ashwini vd., 2024). Pozitif vakalarda floresan mikroskop altında elma yeşili floresan parlama görülmektedir (Malik vd., 2020). Test sonucunun negatif olduğu durumlarda sonucun diğer testlerle confirmasyonu gerekmektedir (Chomel ve Sykes, 2021).

DFA ile benzer hassasiyet ve spesifiteye sahip bir diğer yöntem Direkt hızlı immunohistokimya (dRIT) testidir. Test prensibi DFA ile benzerdir ve bu testte de antijen tayini hedeflenmektedir. Boya olarak streptavidin-biotin peroksidaz kullanılmaktadır ve floresan mikroskoba ihtiyaç duyulmamaktadır. Lyssavirus antijenleri mikroskop altında kırmızı olarak görülmektedirler (Madhusudana vd., 2012). DFA'da olduğu gibi test sonucunun negatif olduğu durumlarda sonucun diğer testlerle confirmasyonu gerekmektedir (Chomel ve Sykes, 2021).

Canlı virusun teşhisi amacıyla Doku kültürü enfeksiyon testi (RTCIT) veya fare inokulasyon testi (MIT) kullanılabilir (Ashwini vd., 2024). Aynı hassasiyete sahip olan her iki testte DFA, dRIT veya RT-PCR gibi diğer testlerin teyidi için kullanılabilir (WOAH, 2023). MIT için 3-4 haftalık veya 2 günlük yavru farelerden 3-10 adet fare kullanılmaktadır. İntraserebral inokulasyon için fareler anesteziye alınmalıdır. Fareler 28 gün boyunca takip edilir. İlk 4 gün içerisinde ölenler değerlendirmeye alınmaz. Bunların haricindekilerin öldükten sonra DFA veya dRIT testine tabi tutulması gerekmektedir. Pozitif çıktığı durumlarda tek seferde fazla miktarda virus izole ediliyor olsa da canlı hayvan kullanımının önüne geçmek, daha hızlı sonuç almak ve daha ekonomik olması bakımından mümkün olan durumlarda MIT yerine RTCIT'ın tercih edilmesi önerilmektedir (Ashwini vd., 2024; Garg, 2014; WOAH, 2023).

RTCIT'ta lyssavirusların üremesi için oldukça uygun olan Nöroblastoma hücreleri tercih edilmektedir. Analiz sırasında karşılaşılan en büyük sorun sitotoksisitedir. Negatifliğin teyidi için 3 pasaj devam edilmesi gerekmektedir (WOAH, 2023).

Ticari olarak üretilen hızlı immunokromatografik testler antijen teşhisinde kullanılabilecek başka bir yöntemdir. Ancak yapılan çalışmalar spesifite ve sensitivitenin ürüne göre değiştiğini, bazısında sonuçların oldukça tutarsızlık gösterdiğini hatta tanısallı hassasiyetten yoksun olduğunu (Eggerbauer vd., 2016; Klein vd., 2020) ortaya koyarken, firmalar tarafından yapılan modifikasyonlar sonucu bazı kitlerin hassasiyetinin DFA'yla karşılaştırılarak %93-100 arasında değiştiği (Léchenne vd., 2016; Servat vd., 2012) belirtilmiştir. WOAH (2023) bu testlerin kullanıldığı şartlarda mutlaka konfirmasyon için primer test yöntemlerinin de kullanılmasını önermektedir.

Şüpheli numunede lyssavirus RNA'sını hassas bir şekilde tespit eden ve canlı virusa ihtiyaç duymayan reverz transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanımda en yaygın olarak N gen bölgesini hedefleyen bu yöntemde tercih edilecek metodun dünya çapında sirküle olan lyssavirusları saptayabilir olması önem arz etmektedir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) standartlarında geliştirilen RT-PCR teknikleri DFA veya dRIT kadar hassas ve spesifik olup rutin teşhiste bu iki test yöntemi yerine kullanılabilmektedirler (WOAH, 2023). Lyssavirus RNA'sının teşhisi için iki tip RT-PCR metodu tanımlanmıştır. Bunlardan biri konvansiyonel pan-lyssavirus hemi-nested RT-PCR (hnRT-PCR) bir diğeri ise real-time panlyssavirus RT-PCR testidir. Her ikisi de tek aşamalı olup real-time pan-lyssavirus RT-PCR, konvansiyonel pan-lyssavirus hnRT-PCR'a göre daha hassastır ve daha kısa sürede sonuç vermektedir. Konvansiyonel pan-lyssavirus hnRT-PCR ise yalnızca konvansiyonel cihaz olan laboratuvarlar için bir avantajdır ve elde edilen ampliconlardan genetik veri elde etmeye olanak tanımaktadır.

Farklı gen bölgelerini hedef alan çok sayıda RT-PCR metodu bulunmaktadır. Uygun validasyon verileri doğrultusunda bu testlerin de uygulanabilirliği değerlendirilebilir (WOAH, 2023).

Yukarda bahsi geçen testler enfeksiyona sebep olan kuduz etkeninin tanısının doğru yapılıp, izole etmek için kullanılabilecek yöntemleri içermektedir. Monoklonal antikor kullanımı, parsiyel veya tam genom dizileme analizleri gibi yöntemlerle yapılacak olan virus karakterizasyonu aşı suşları ile saha suşlarının ayrımının yapılmasının yanı sıra coğrafi kökenin tespitine olanak sağlamaktadır.

Teşhis yöntemlerine ek olarak yurtdışına çıkacak hayvanlardaki antikor düzeyinin tayini veya aşılama kampanyalarının etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla serolojik testler kullanılmaktadır (WOAH, 2023).

Bu amaçla ELISA ve virus nötralizasyon testleri (floresan antikor virus nötralizasyon ve hızlı floresan odak inhibisyon testi) kullanılmaktadır (Cliquet vd., 1998; Smith vd., 1996). ELISA'nın hassasiyet ve spesifitesinde farklılıklar olabileceği gibi, nötralizasyon testinde de düşük kaliteli serum sitotoksositeye sebep olmaktadır. Amaca yönelik olarak her iki yöntem de kullanılabilir olup, yurtdışına çıkacak olan evcil hayvanlarda ELISA sonuçları kabul görmemektedir (WOAH, 2023).

Virus nötralizasyon testinde uluslararası standart olarak 0.5 IU/ml en düşük koruyucu titre olarak kabul edilmektedir (Singh vd., 2017).

1.6. Koruma ve Kontrol

Fransız bilim insanı Louis Pasteur'ün 1885 yılında kuduz virusunu kurutarak elde ettiği canlı atenüe aşı günümüzde insanlarda maruziyet öncesi ve sonrası profilakside ve hayvanlarda koruyucu amaçlı kullanılan aşılarda temelini oluşturmuştur (Abraham vd., 2017). Bu aşılarda 1950'lerin ortalarına kadar farklı şekillerde atenüe edilerek kullanılmış (McGettigan, 2010), sonrasında hücre kültürü kökenli inaktif kuduz aşılarının üretimine başlanmıştır.

Önceki yıllarda köpek aracılı kuduzun önüne geçmek için sokak hayvanlarının itlafi yoluna gidilmiş, vahşi yaşam için ise zehirli yemler bırakılmış, yuvalarına gaz verilmiş, hormonal yollarla kısırlaştırma denemeleri yapılmış ancak hiç birinden başarılı sonuç alınamamış ve hayvanlardan insanlara geçen hastalıkların yalnızca hayvanların itlafi yoluyla önleyemeyeceği kabul edilmiş olup (Ebrahimzadeh ve Bannazadeh, 2020), köpek popülasyonlarının ve vahşi yaşamın aşılmasının, kuduza bağlı insan ölümlerinin sayısında önemli ve kalıcı bir azalma elde etmek için en etkili yöntem olduğu gösterilmiştir (Taylor vd., 2021). Vahşi yaşamda ve köpek popülasyonunda kuduzu kontrol altına almak için en az %70 oranında aşılama yapılmış olması gerektiği kabul edilmektedir (Gilbert ve Chipman, 2020; Malik vd., 2020; Meltzer ve Rupprecht, 1998; Wandeler vd., 1988). Sahipsiz hayvanların kontrol altına alınması ve aşılama, toplumsal bilincin artırılması gibi konular hayvanlarda kuduz kontrolünün temelini oluşturmaktadır.

Vahşi yaşam için oral aşılarda, evcil hayvanların aşılama için de parenteral aşılarda tercih edilmektedir (WOAH, 2023). Oral aşılarda vahşi yaşamda hastalığın kontrolünü

sağlamak için kullanımı başarılı sonuçlar vermektedir. Köpeklerin aşılmasında ulaşılabilirlik göz önüne alınarak parenteral aşılanmanın yanı sıra özellikle erişim sağlanamayan köpeklerde kitlesel parenteral aşılanmanın oral aşılama ile desteklenmesi fayda sağlayacaktır (WOAH, 2023).

Ülkemizde insanlarda maruziyet öncesi ve sonrası profilaksi uygulamaları T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün Kuduz Profilaksi Rehberi doğrultusunda yapılmaktadır. Maruziyet öncesi profilaksi kuduz açısından yüksek riskli işlerde çalışanlar, kuduz riski olan hayvanlarla sık temas edenler, kuduz enfeksiyonunun yaygın olduğu ve riskli temas durumunda uygun tıbbi müdahalenin yapılamayacağı ülkelere seyahat edecek olan kişilerde önerilmektedir. Bu doğrultuda 0. ve 7. Günlerde birer doz olmak üzere toplam iki doz kas içi aşılama önerilmektedir (immunsupresif kişilerde 21. veya 28. günlerde 3. doz aşı uygulanır).

Maruziyet sonrası profilakside en önemli ilk adım ısırık bölgesinin akarsu altında sabunla uzun süre yıkanmasıdır. Sonrasında alkol veya iyotlu bir antiseptik kullanılmalıdır. Yara bölgesine mümkün olduğunca dikiş atmaktan kaçınılmalı, zorunlu olduğu durumlarda Ig uygulamasını takip eden 2 saatin sonunda dikiş atılmalıdır. Aşılama programı sağlıklı bireylerde ve immunsupresif bireylerde farklılıklar göstermektedir. Maruziyet ilgili rehberde kategorize edilmiş olup, korunma yöntemleri belirtilen algoritma üzerinden ilerlemektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2019).

Kuduz hastalığı ile mücadele amacıyla her yıl yenisi hazırlanan Hayvan Hastalıkları ile Mücadele ve Hayvan Hareketleri Kontrolü Programı kapsamında ulusal aşılama programı belirlenmektedir ve kuduz hastalığından korunma ve mücadeleyle ilgili iş ve işlemler Tarım ve Orman Bakanlığı'nın Kuduz Hastalığından Korunma ve Kuduz Hastalığı ile Mücadele Yönetmeliği kapsamında yürütülmektedir. Bu yönetmelik kapsamında sahipli ya da sahipsiz tüm kedi ve köpeklerin inaktif aşılarla yılda 1 kez aşılması ve kayıt altına alınması zorunluluğu vardır. Ayrıca “Yabani hayvanlarda hastalık tespit edildiğinde, evcil hayvanlardan yabani hayvanlara hastalık bulaşma ihtimali bulunduğu, hastalık görülmeyen bir bölgeye yabani hayvanlar yolu ile hastalığın taşınması ihtimali ortaya çıktığında Bakanlık yaban hayatını aşılama kararı almaya, aşılanmanın yer, şekil, zaman ve süresini belirlemeye yetkilidir” maddesi yer almaktadır. Bu bağlamda ortaya çıkan yeni mihrakların hızlı bir şekilde tespiti ve virusun genom yapısının ortaya koyulması gerekli önlem ve kararların alınması adına büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde kuduzdan korunma ve kontrol altına alma yolunun öncelikli olarak hayvanlardan geçtiği açıktır. Kuduz aşısının 3 primer tipi bulunmaktadır. Bunlar sinir dokusu aşıları, hücre kültürü aşıları ve embriyolu tavuk yumurtası (ETY) aşılarıdır (Abraham vd., 2017).

1.6.1. Parenteral Aşılar

Louis Pasteur'un geliştirdiği ve birinci jenerasyon aşılar olarak kabul edilen sinir dokusu aşıları immunojenik özellikleri düşük, yan etki olasılıkları yüksektir ve patojen hale geçme riskleri vardır (Abraham vd., 2017; Arya, 1994; Hildegund, 2020).

Sonrasında yetişkin koyunların beyinde üretilip kimyasal olarak (fenol ile) inaktive edilen Semple aşısı üretilmiş olup, birçok ülkede uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak yan etkileri dolayısıyla (Hemachudha vd., 1988) Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından kullanımı uygun görülmemiştir. Bunun üzerine yavru fare beyinde virus üretilmeye başlanmış; sonrasında fenol ile inaktive edilip, kısmen purifikasyon yapılarak elde edilen bu aşı (Fuenzalida kuduz aşısı) uzun yıllar birçok ülkede kullanılmıştır. İmmunizasyonu zayıf olan bu aşının da Semple aşısı gibi tekrarlayan dozlara ihtiyacı vardır. DSÖ'nün tavsiyeleri doğrultusunda söz konusu sinir dokusu aşılarının kullanımı önemli ölçüde bırakılmıştır (WHO, 2018).

Sinir dokusu aşılardan sonra tavuk ve ördek embriyoları aşı üretimi için kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem embriyolu tavuk yumurtalarının halihazırda steril bir ortam olması, aşı üretimi amacıyla kullanılan virusa karşı antikor oluşturmaması gibi avantajlarının yanı sıra, zaman alması, üretim maliyetleri ve yumurta bileşenlerine karşı alerjik reaksiyon riski gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Hildegund, 2020).

Modifiye canlı virus aşıları, virus suşuna bağlı kuduz enfeksiyonu gelişebileceği için parenteral kullanımda önerilmemektedirler (WHO, 2005).

Sinir dokusu aşıları ve embriyolu tavuk yumurtası aşılarını doku kültürü aşılarının geliştirilmesi süreci takip etmiştir. İlk doku kültürü kuduz aşısı primer hamster böbrek hücrelerinden elde edilmiştir. İkinci jenerasyon olan bu aşı üretiminde kullanılan çok fazla hücre tipi bulunmaktadır. Bunlar; primer hücreler (purifiye tavuk embriyo hücre aşısı (PCECV)- Flury low egg passage (LEP); diploid hücreler; ve devamlı hücre hatlarıdır (Hildegund, 2020). Bu yöntemle uygulanacak olan doz büyük ölçüde azalmış ve yan etkiler en aza indirgenmiştir (Rupprecht vd., 2002). Hücre kültüründe üretilen inaktif aşılardan

kullanımı gün geçtikçe daha fazla tercih edilen sistem haline gelmiştir (Hildegund, 2020; WHO, 2005).

Aşı üretimi için en çok tercih edilen devamlı hücre hattı Afrika yeşil maymunların böbrek dokusundan elde edilen vero hücre hattı olmuştur (Osada vd., 2014). Kuduz aşısı üretiminde tavşan, koyun, keçi, fare ya da rat sinir dokularında ya da hücre hatlarında üreyebilen “fiks” virusların kullanımı önerilmektedir (Hildegund, 2020). Aşı üretiminde kullanımı önerilen fiks suşlara Paris Pasteur, PV, PM, CVS, Nishigara, Fuenzalida S-51, Kelev, SAD, ERA, Vnukovo-32, Flury, LEP, HEP suşları örnek olarak verilebilmektedir (Smith vd., 1996).

1.6.2. Oral Aşılar

Vahşi yaşamdaki kuduz rezervuarlarında hastalığı kontrol edebilmek için modifiye canlı kuduz aşıları veya rekombinant aşıları içeren oral aşılar kullanılmaktadır (Hildegund, 2020). Oral aşılamadan vahşi yaşamda genel olarak başarılı sonuçlar alınsa da her hayvan türünden aynı düzeyde yanıt alınamamaktadır. Çizgili kokarcalarda istenilen düzeyde yanıt alınamazken, rakunların serokonversiyon oranı tilkiler ve çakallara oranla daha düşük bulunmuş olup kurtlarda ise yem seçiciliği dikkat çekmiştir (Sillero-Zubiri vd., 2016). Özellikle palatinum tonsilleri aşı alımında önemli rol oynamaktadır (Hildegund, 2020).

Köpek popülasyonlarının aşılmasında olduğu gibi tilki popülasyonlarında da bulaş zincirini kırabilmek adına en az %70’lik bir aşılama oranı gerekmektedir (Malik vd., 2020).

1978 yılında ilk kez İsviçre’de (1998 yılında eradike edilmiştir) başlayan oral aşı uygulamalarının saha denemeleri 1983 yılında Almanya, 1984 yılında İtalya ile Batı ve Orta Avrupa’da devam etmiş, 2006 civarında pek çok ülkede eradike edildikten sonra oral aşılama kampanyaları Doğu Avrupa’da da uygulanmaya başlamıştır (Freuling vd., 2013; Gilbert ve Chipman, 2020). 2017 yılına gelindiğinde ise Kuzey Amerika ve Avrupa’ya 720 milyon civarı oral aşı atımı yapılmıştır (Hildegund, 2020).

Freuling vd. (2013) epidemiyolojik koşullar, coğrafya ve aşılama stratejisine odaklanarak, kuduzla mücadelede oral aşılamanın etkinliğini karşılaştırmalı olarak değerlendirmiş ve endemik bir ülkede hastalığı kontrol altına almak için ortalama 17 (ülkenin yüzölçümü ve vaka sayısına göre 3-62 arası değişmekle birlikte) başarılı oral aşılama kampanyası, kontrolü kalıcı hale getirmek için bu kampanyalara ek 4 başarılı oral aşılama kampanyası, eliminasyonu sağlamak için ise toplamda ortalama 28 başarılı aşılama

kampanyası gerektiğini belirtmişlerdir. 30 yıldan fazla süren oral aşılama kampanyaları sonucunda Avrupa genelinde 1.9 milyon km² alan aşılanmış ve pek çok Avrupa ülkesi bu süre sonunda kuduzdan ari hale geçmiştir (Freuling vd., 2013).

Ülkemizde 2008 yılında başlatılan oral aşılama kampanyası 1.3.1 Türkiye’de Kuduz Hastalığının Epidemiyolojisi başlığı altında detaylı olarak aktarıldığı şekilde elde edilen epidemiyolojik veriler ışığında sürdürülmektedir.

Bu çalışmada, 2015-2021 yılları arasında Türkiye’de kuduz virusu pozitif tespit edilen materyaller arasından belirli kriterler çerçevesinde seçilen tanı materyallerinin N gen, G gen ve G-L intergenik bölgelerinin (Ψ) çalışılması amaçlanmıştır. Elde edilecek veriler doğrultusunda, ülkemizde tür, coğrafya ve yıllar itibarıyla farklı dallarda yer alan kuduz viruslarına ilişkin bilgilerin eldesi; yakın tarihli evrimsel farklılığın sorgulanması, virus yapısında ya da konakçılarda meydana gelebilecek olası bir değişikliğin daha erken dönemde saptanarak, uygun mücadele ve kontrol yöntemlerinin erken dönemde belirlenmesine katkı sağlaması; nötralizan antikorların indüklenmesinde başlıca antijenik bölge olan G gen bölgesi analizi ile kullanılan aşılarda ticari etkinlikleri konusunda güncel veriler sunulması; G gen temelli ELISA kitlerinin üretimi yönünde yapılacak çalışmalara bilimsel kaynak oluşturması; G gen ve G-L intergenik bölgelerinin karşılaştırılmasının yapılarak yakın tarihli değişiklikler konusunda iki bölgenin benzerliklerinin/üstünlüklerinin değerlendirilmesi konusunda bilimsel katkı sağlaması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Tanı Materyalleri

Bu çalışma Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nden alınan izin (01.04.2021 tarih ve E-71037622-806.01.03-1035577 sayılı) (Ek-1) ve Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kararı (HADYEK; 02.02.2022 gün ve 2022-3-30 no'lu karar) kapsamında gerçekleştirilmiştir (Ek-2).

Bu çalışmada Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü bünyesinde Ulusal Referans Laboratuvarı olarak görev yapmakta olan Kuduz Teşhis Laboratuvarı'nın stoklarında bulunan ve -80°C'de saklanan kuduz virusu pozitif beyin materyallerinden yıl, coğrafi değerlendirmeler ve hayvan türü dikkate alınarak seçilen 12 farklı hayvan türünden toplam 292 farklı hayvana ait tanı materyali kullanılmıştır (Çizelge 2.1.). Tanı materyallerinin seçimi, çalışılan materyallere ilgili bazı verilerin elde edilmesi ve elde edilen bu verilerin değerlendirilmesine paralel olarak, çalışma süresince sürdürülmüştür. Çalışmanın ilerleyişi, seçilen örneklerden en az bir gen bölgesi için amplikon eldesi sağlanarak kuduz virusu teyidinin yapılması; dizin analizi için değerlendirilebilecek bütçe olanaklarının sınırlayıcı olması sebebiyle, amplikon elde edilen örneklerle ait bilgilerin, yeniden tür, yıl, il/bölge kriterleri yönünden değerlendirilmesi ve seçilen örneklerin hizmet alımı ile dizin bilgilerinin elde edilmesi şeklinde olmuştur. Çalışmanın iş akışına ilgili veriler Çizelge 2.2.'de; süreç sonunda elde edilen ve bu çalışmanın değerlendirilmesinde kullanılan tanı materyallerine (n=135) ilgili bilgiler Çizelge 2.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Çalışmaya alınan kuduz viruslarının elde edildiği coğrafi bölge, yıl, hayvan türü ve sayısı

Coğrafi Bölge	Hayvan Türü	Yıllar							Genel Toplam
		2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Akdeniz Bölgesi	Köpek		1	2	1				8
	Tilki			1		1	1		
	Siğır							1	
Doğu Anadolu Bölgesi	Köpek		1	10	9	13	2	23	94
	Siğır					5	4	12	
	Kurt			1	1				
	Tilki			2	1	1	1		
	Kedi			2	3				
	Sansar					1			
	Koyun					1			
	Keçi						1		
Ege Bölgesi	Kedi			2		2	1		69
	Köpek			15		4	2		
	Porsuk			1					
	Tilki		1	3	2	6			
	Sansar				1	1			
	Siğır					15	3	2	
	Koyun					1			
	Çakal			1					
	At					2			
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	Keçi					4			56
	Köpek			4	4	7	2	15	
	Tilki			2			1		
	Kurt			1				1	
	Çakal				1				
	Kedi			1					
	Siğır					2	2	8	
	Keçi						1		
	Eşek							1	
	Koyun						1	1	
İç Anadolu Bölgesi	At							1	28
	Köpek			1	2	4	1	1	
	Kedi						1		
	Kurt			1					
	Tilki		1	1	1		2		
	Sansar					1			
Marmara Bölgesi	Keçi					1			30
	Siğır					2	5	3	
	Kedi					1	1		
	Çakal				1				
	Köpek			6	2		1		
	Koyun						1		
	Siğır					4	2		
Karadeniz Bölgesi	Sansar	1							7
	Tilki	2	2	3	3				
	Kopek		2		1		1		
Toplam	Siğır				1	1			292
	Sansar		1						

Çizelge 2.2. Çalışmanın iş akışına ilgili sayısal veriler

Yıl*	Pozitif Numune sayısı*	RT-PCR Uygulanan			RT-PCR (+)			Sekansa Gönderilen			Sekansa Değerlendirilen		
		G-L	N Gen	G Gen	G-L	N Gen	G Gen	G-L	N Gen	G Gen	G-L	N Gen	G Gen
2015	372	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2016	160	9	0	9	6	0	5	5	0	0	5	0	0
2017	303	60	31	57	57	27	57	25	3	3	24	3	3
2018	276	34	8	31	30	7	30	20	0	1	20	0	1
2019	322	80	47	53	52	26	40	23	1	2	22	1	2
2020	219	37	23	25	33	7	12	23	4	6	22	4	5
2021	142	69	50	50	49	28	40	41	21	27	39	21	25
Toplam	1794	292	162	228	227	95	184	137	29	39	132	29	36

*ADIS (Commission, 2024)

Çizelge 2.3. Çalışmada elde edilen ve bu çalışmanın değerlendirilmesinde kullanılan tanı materyallerine ilgili bilgiler

Coğrafi Bölge	Hayvan Türü	Yıllar						Genel Toplam
		2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Akdeniz Bölgesi	Köpek	1						2
	Tilki				1			
Doğu Anadolu Bölgesi	Keçi					1		58
	Kedi		1	1				
	Köpek	1	6	9	6	1	14	
	Koyun				1			
	Kurt		1	1				
	Sansar				1			
	Siğır				1	1	7	
	Tilki		2	1	1	1		
Ege Bölgesi	Çakal		1					21
	Keçi				1			
	Kedi		2					
	Köpek		2		1	1		
	Koyun				1			
	Porsuk		1					
	Sansar			1				
	Siğır				2	1		
	Tilki	1	4	1	1			
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	At						1	32
	Çakal			1				
	Eşek						1	
	Keçi					1		
	Köpek		2	2	3	2	10	
	Kurt		1					
	Siğır					2	5	
	Tilki		1					
İç Anadolu Bölgesi	Kedi					1		13
	Köpek				1	1	1	
	Siğır					3	2	
	Tilki	1		1		2		
Marmara Bölgesi	Kedi					1		6
	Köpek					1		
	Koyun					1		
	Siğır					2		
	Tilki	1						
Karadeniz Bölgesi	Köpek			1				3
	Siğır			1	1			
Toplam								135

2.2. Yöntem

2.2.1. Viral RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Söz konusu kriterler göz önünde bulundurularak seçilen 292 adet kuduz virusu pozitif hayvana ait materyalin ticari kit kullanarak (MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I; Roche, Germany) elde edilen viral nükleik asit miktarları NanoDrop™ spektrofotometre (ND-1000, ThermoScientific, USA) ile ölçüldü. Uygun görülen tanı materyallerinden, viral RNA'nın reverse transkripsiyonu için, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak cDNA eldesi sağlandı. Isı döngü cihazı olarak Blue-Ray Biotech TurboCycler cihazı kullanıldı. cDNA eldesi için karışım bileşenleri ve ısı döngüleri Çizelge 2.4.'te verildi.

Çizelge 2.4. cDNA eldesi için kullanılan karışım bileşenleri ve ısı döngüleri

I. Reaksiyon için Karışım Bileşenleri	Miktar (µL)	Program
Nükleaz ari su	3 (µL)	70 °C'de 5 dk 15 °C'de 5 sn
Random Hekzamer	0,5 (µL)	
Viral RNA	3 (µL)	
Toplam	6,5 (µL)	
II. Reaksiyon için Karışım Bileşenleri	Miktar (µL)	Program
5 X Reaksiyon Buffer	2(µL)	25 °C'de 10 dk
10 mM dNTP mix	1 (µL)	37 °C'de 60 dk
Reverse Transcriptase Enzim	0,5 (µL)	70 °C'de 5 dk
I. Reaksiyon ürünü	6,5 (µL)	12 °C'de 30 sn
Toplam	10(µL)	

2.2.2. Hedef Gen Bölgeleri için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulanması

cDNA eldesi sonrasında Çizelge 2.5.'te belirtilen primerler kullanılarak ilgili gen bölgelerinin ampliconlarının eldesi için RT-PCR uygulandı. PCR işleminin tüm aşamalarında ısı döngü cihazı olarak Blue-Ray Biotech TurboCycler cihazı kullanıldı.

Çizelge 2.5. Çalışmada kullanılan primer dizinleri

Primer	Viral Lokus	Sekans	Nükleotit Pozisyonu	Nükleotit Uzunluğu
RABV N F (+)	Full N Gen	CTACAATGGATGCCGACAA	66-84	1372 bp (Hyun vd., 2005)
RABV N R (-)		TATCATTCAACTCCTTATGA	1418-1437	
RABV G F (+)	Full G Gen	CAAGGAAAGATGGTTCCTCAG	3309-3329	1584 bp (Hyun vd., 2005)
RABV G F (-)		TCACAGTCTGGTCTCACCTCCAC	4870-4892	
G902F (+)	Full G-L İntergenik Bölgesi	GACTTGGGTCTCCCGAACTGGGG	4665 - 4687	879 bp Sacramento vd., 1991)
L902R (-)		CAAAGGAGAGTTGAGATTGTAGTC	5520 - 5543	

2.2.2.1. N Gen Bölgesi İçin RT-PCR Tekniği

Seçilen tanı materyallerinden, RABV N gen bölgesinin eldesi amacıyla Çizelge 2.5.'te N gen bölgesi için belirtilen primer dizinleri ile Thermo Scientific Dream Taq DNA Polimeraz kiti kullanılarak RT-PCR tekniğine tabi tutuldu. Kullanılan PCR karışım bileşenleri ve PCR döngü protokolü Çizelge 2.6.'da sunuldu.

Çizelge 2.6. N gen ve G gen bölgeleri için PCR karışım bileşenleri ve RT-PCR protokolü

PCR Karışım Bileşenleri	Miktar (µL)	Program
Dream Taq DNA polimeraz	0,25 (µL)	95°C'de 3dk
10X Dream Taq Buffer	2,5 (µL)	95°C'de 30sn
10mM dNTP mix	0,5 (µL)	Bağlanma ısısı* 30 sn
Primer F (10 pmol/µL)	1 (µL)	} 35 siklus
Primer R (10 pmol/µL)	1 (µL)	72°C'de 1dk
Nükleaz Ari Su	17,25 (µL)	72°C'de 10dk
DNA	2,5 (µL)	12°C'de 10dk
Toplam	25 (µL)	

Bağlanma ısısı*; N Gen için 51°C, G Gen için 54°C

2.2.2.2. G Gen Bölgesi için RT-PCR Tekniği

Kuduz virusu gen bölgesinin eldesi amacıyla Çizelge 2.5.'te G gen bölgesi için belirtilen primer dizinleri ile Thermo Scientific Dream Taq DNA Polimeraz kiti kullanılarak RT-PCR uygulandı. Kullanılan PCR karışım bileşenleri ve PCR döngü protokolü Çizelge 2.6.'da sunuldu.

2.2.2.3. G-L İntergenik Bölgesi için RT-PCR Tekniği

Seçilen tanı materyallerinde bulunan kuduz virusu G-L intergenik bölgesinin eldesi amacıyla Çizelge 2.5.'te G-L intergenik bölgesi belirtilen primer dizinleri ile Invitrogen Taq DNA Polymerase Recombinant kiti kullanılarak RT-PCR uygulandı. Kullanılan PCR karışım bileşenleri ve PCR döngü protokolü Çizelge 2.7.' sunuldu.

Çizelge 2.7. G-L intergenik bölgesi için PCR karışım bileşenleri ve RT-PCR protokolü

PCR Karışım Bileşenleri	Miktar (µL)	Program
Taq DNA polimeraz recombinant	0,1 (µL)	94°C'de 3dk 94°C'de 45sn 54°C'de 30 sn 72°C'de 1dk 30 sn 72°C'de 10dk 12°C'de 10dk 35 siklus
10X PCR Rxn Buffer	2,5 (µL)	
50 mM MgCl ₂	0,75 (µL)	
10mM dNTP mix	0,25 (µL)	
Primer F (10 pmol/µL)	1,25 (µL)	
Primer R (10 pmol/µL)	1,25 (µL)	
Nükleaz Ari Su	15,9 (µL)	
DNA	3 (µL)	
Toplam	25 (µL)	

2.2.3. PCR Ürünlerinin Jel Elektrophorez ile Görüntülenmesi

RT-PCR sonrası elde edilen ampliconların görüntülenmesi amacıyla jel elektrophorez yöntemi kullanıldı. %1,5'luk agaroz jelin hazırlanmasında ve elektrophorez tankında tampon solüsyon olarak 10X Tris Borate-EDTA buffer (TBE) solüsyonu, 1X konsatrasyona getirilerek kullanıldı. Hazırlanan agaroz TBE çözeltisi ısıtılarak (mikrodalga fırın kullanarak) agarozun çözünmesi sağlandı. 60°C'ye soğuması beklendikten sonra içerisine SafeView™ Classic (ABM, Canada) boyası ilave edildi. Çözeltinin soğuması beklendikten sonra, jel tarakları takılmış şekilde hazırlanan jel taşıyıcısına döküldü ve donması beklendi. Jel donduktan sonra jel tarakları çıkarıldı ve jel taşıyıcısı elektrophorez tankına alındı.

RT-PCR ürünleri yükleme boyası (GENESTA™ 5x Loading Dye) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Amplicon boyutlarının değerlendirilebilmesi için 100 bp'lik merdiven (GENESTA™ 100 bp DNA Ladder) her bir sıranın başında ve sonundaki kuyucuklara yüklendi. Ürünlerin hareket etmesi için elektrophorez tankına 16 volt/cm elektrik akımı 30 dk süre boyunca uygulandı ve süre sonunda jel görüntüleme sisteminde (GelDoc Go, BIO-RAD) görüntülendi.

2.2.4. Dizin Analizi

RT-PCR sonucu elde edilen ampikonların agaroz jel görüntüleri değerlendirilerek, beklenen büyüklükte elde edilen ve analiz için uygun nitelikte olduğu değerlendirilen ampikonlar dizin analizine tabi tutuldu. Dizin analizi ticari olarak hizmet alımı (BM Labosis) yoluyla gerçekleştirildi.

2.2.5. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Elde edilen kuduz viruslarına ait dizin verileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) tarafından sağlanan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) web sayfası kullanılarak doğrulandı. Elde edilen dizinler GenBank'ta yer alan referens viruslar (Ek-10), Türkiye ve diğer ülkelerde tespit edilen kuduz virus genom dizinlerinden seçilenler (Ek-10) ile Aliview (Larsson, 2014) programının çoklu hizalama özelliğinden yararlanılarak hizalandı.

2.2.6. Filogenetik Analiz

Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarına ait dizinler ile, GenBank'tan elde edilen Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz virus suşlarından seçilen örnekler ve referens virusların arasındaki genetik benzerliğin ortaya koyulması amacı ile Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) (Kumar ve ark., 2018) programı kullanılarak filogenetik analizler yapıldı. Programda bulunan 'Find Best Model' özelliği kullanılarak en uygun modeller belirlendi. Her üç gen bölgesi için de analizler Maximum Likelihood metodu, 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında kullanılan modeller, her bir filogenetik ağacın açıklamasında belirtildi. Elde edilen filogenetik ağaçlar üzerinde örneklerin ait olduğu dallar ve alt dallar belirlendi. Nükleotit ve aminoasit benzerlikleri online program sayfası kullanılarak yapıldı (SIAS, 2020).

3. BULGULAR

Bu çalışmada Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü (EVKMAE) bünyesinde Ulusal Referans Laboratuvarı olarak görev yapmakta olan Kuduz Teşhis Laboratuvarı'nın stoklarında bulunan ve -80°C'de saklanan kuduz virusu pozitif beyin materyallerinden çalışmanın algoritmasına uygun olarak seçilen/değerlendirilen 40 farklı il ve 12 farklı hayvan türünden toplamda 135 farklı hayvanda saptanan kuduz virusunun hedeflenen gen bölgelerinden (N gen, G gen ve G-L intergenik bölge) en az birisinin moleküler identifikasyonu yapıldı. N gen, G gen ve G-L intergenik bölgeleri için elde edilen dizin bilgileri sayısı sırasıyla 29, 36, ve 132'dir. Çalışmada hedef gen bölgelerinin tümü için dizin verisi elde edilen kuduz viruslarının sayısı 21, iki gen bölgesi için dizin bilgisi elde edilen kuduz viruslarının sayısı ise toplamda 18'dir. Birden fazla gen bölgesi için elde edilen dizin bilgilerinin filogenetik analizi, söz konusu virusun çalışılan her bir gen bölgesi verisi ile alt dal tanımlamasının yapılabileceğini ortaya koymuş olup çalışılan tanı materyallerindeki kuduz viruslarının *Cosmopolitan* dalında yer aldıkları saptandı. Söz konusu kuduz viruslarının ait oldukları alt dallar ve GenBank Accession numaraları Çizelge 3.1.'de sunuldu. Materyal adlandırılması tür-no/il/yıl olarak yapıldı.

EVKMAE Kuduz Teşhis Laboratuvarı'nın stoklarında bulunan 2015 yılına ait çalışılabilir durumda olan materyallerin nükleik asit ölçümleri ardından üç adet tanı materyali belirtilen protokollerle konyansiyonel RT-PCR'a tabi tutulmuş olup, üçü de negatif sonuç vermiştir. Dolayısıyla bu doktora tez çalışmasında sunulan veriler 2016 - 2021 yılları arasında ilgili laboratuvara gönderilmiş ve kuduz tanısı koyulmuş olan tanı materyallerine ait kuduz viruslarına aittir.

Çizelge 3.1. Çalışılan tanı materyallerinin isimleri, kuduz viruslarının yer aldıkları alt dallar ve GenBank accession numaraları

Coğrafi Bölge	Çalışılan Numune Adı	Yer Aldığı Alt Dal	GenBank Accession No		
			N Gen	G Gen	G-L İntergenik Bölge
Akdeniz Bölgesi	Tilki-270/Mersin/2019	ME2			PP866472
	Kopek-277/Mersin/2016	ME2			PP866410
Doğu Anadolu Bölgesi	Kopek-16/Kars/2021	ME2		PP530427	PP866509
	Kopek-17/Erzurum/2021	ME2			PP866508
	Kopek-18/Erzurum/2021	CA2	PP530397	PP530421	PP866532
	Kopek-20/Agri/2021	ME1a			PP866518
	Kopek-21/Agri/2021	ME2		PP530426	PP866511
	Sigir-22/Agri/2021	ME1a	PP530410	PP530442	
	Kopek-24/Erzincan/2021	ME1a	PP530405		PP866513
	Kopek-25/Igdir/2021	ME2		PP530428	PP866507
	Kopek-30/Elazig/2021	CA2	PP530393	PP530418	PP866533
	Sigir-31/Elazig/2021	ME1a	PP530407		PP866522
	Sigir-33/Bingol/2021	ME1a		PP530443	PP866517
	Kopek-40/Van/2021	CA2	PP530395	PP530419	PP866534
	Kopek-41/Van/2021	CA2	PP530394	PP530422	PP866535
	Kopek-43/Malatya/2021	ME1a			PP866520
	Sigir-46/Bitlis/2021	CA2		PP530417	PP866530
	Sigir-47/Bitlis/2021	ME1a	PP530411	PP530444	PP866516
	Sigir-48/Mus/2021	ME2			PP866510
	Tilki-68/Malatya/2020	ME1a			PP866501
	Kopek-70/Van/2020	CA2			PP866480
	Sigir-82/Kahramanmaraş/2020	ME1a			PP866499
	Keci-83/Kahramanmaraş/2020	ME1a			PP866496
	Kopek-105/Bingol/2019	ME2			PP866468
	Kopek-107/Malatya/2019	ME1a			PP866464
	Sansar-108/Malatya/2019	ME1a			PP866461
	Kopek-109/Van/2019	ME2		PP530429	PP866470
	Kopek-114/Elazig/2019	CA2			PP866460
	Koyun-116/Tunceli/2019	ME1a			PP866463
	Kopek-119/Kars/2019	ME2			PP866469
	Sigir-122/Igdir/2019	ME2			PP866467

Çizelge 3.1. Devam. Çalışılan tanı materyallerinin isimleri, kuduz viruslarının yer aldıkları alt dallar ve GenBank accession numaraları

	Kopek-124/Agri/2019	ME2			PP866466
	Kopek-207/Kahramanmaras/2021	ME2			PP866504
	Kopek-209/Mus/2021	ME2			PP866512
	Kopek-215/Van/2021	ME2		PP530425	PP866506
	Sigir-217/Bingol/2021	CA2			PP866538
	Kopek-222/Bingol/2017	ME1a			PP866437
	Kopek-223/Bitlis/2017	ME1a			PP866428
	Kopek-227/Elazig/2017	ME1a			PP866435
	Tilki-228/Elazig/2017	ME1a			PP866432
	Kedi-229/Elazig/2017	ME1a			PP866436
	Kopek-230/Malatya/2017	ME1a			PP866433
	Tilki-231/Malatya/2017	ME1a			PP866434
	Kopek-236/Tunceli/2018	ME1a			PP866442
	Kopek-237/Elazig/2018	ME1a			PP866443
	Kurt-239/Bingol/2018	ME1a			PP866444
	Kopek-240/Mus/2018	ME1a			PP866445
	Kopek-243/Malatya/2018	ME1a			PP866447
	Kopek-244/Van/2018	ME2		PP530430	PP866448
	Kopek-245/Erzurum/2018	ME1a			PP866449
	Kedi-246/Erzurum/2018	ME1a			PP866450
	Tilki-247/Erzurum/2018	ME1a			PP866451
	Kopek-248/Ardahan/2018	ME2			PP866452
	Kopek-249/Kars/2018	ME2			PP866453
	Kopek-250/Agri/2018	ME2			PP866454
	Tilki-271/Kahramanmaras/2019	ME1a			PP866465
	Kopek-278/Malatya/2016	ME1a			PP866409
	Kopek-286/Ardahan/2017	ME2			PP866417
	Kopek-287/Ardahan/2017	ME2			PP866416
	Kurt-288/Ardahan/2017	ME2			PP866415
Ege Bölgesi	Kopek-61/Afyon/2020	ME2	PP530383	PP530440	PP866495
	Sigir-62/Afyon/2020	ME2		PP530439	PP866494
	Sigir-132/Manisa/2019	ME2			PP866477
	Keci-138/Manisa/2019	ME2			PP866478
	Sigir-140/Izmir/2019	ME2			PP866473
	Tilki-144/Izmir/2019	ME2	PP530388	PP530431	PP866471
	Koyun-147/Izmir/2019	ME2			PP866479
	Kopek-155/Denizli/2019	ME2			PP866474

Çizelge 3.1. Devam. Çalışılan tanı materyallerinin isimleri, kuduz viruslarının yer aldıkları alt dallar ve GenBank accession numaraları

	Tilki-176/Aydin/2017	ME2	PP530389	PP530434	PP866419
	Tilki-177/Usak/2017	ME2			PP866423
	Kopek-178/Manisa/2017	ME2	PP530391	PP530432	PP866420
	Tilki-179/Izmir/2017	ME2	PP530390	PP530433	PP866418
	Cakal-180/Manisa/2017	ME2			PP866424
	Kedi-181/Izmir/2017	ME2			PP866425
	Porsuk-182/Izmir/2017	ME2			PP866426
	Tilki-185/Manisa/2017	ME2			PP866427
	Kedi-193/Usak/2017	ME2			PP866421
	Kopek-195/Izmir/2017	ME2			PP866422
	Sansar-196/Izmir/2018	ME2			PP866438
	Tilki-197/Izmir/2018	ME2			PP866439
	Tilki-280/Afyon/2016	ME2			PP866413
Güney Doğu Anadolu Bölgesi	Kopek-1/Sanlıurfa/2021	CA2	PP530399		PP866539
	Kopek-2/Sanlıurfa/2021	CA2	PP530400	PP530415	PP866526
	Kopek-3/Sanlıurfa/2021	CA2	PP530402	PP530412	PP866528
	Esek-4/Sanlıurfa/2021	CA2	PP530398	PP530423	PP866531
	At-5/Sanlıurfa/2021	ME1a	PP530409	PP530447	PP866519
	Sigir-6/Sanlıurfa/2021	CA2	PP530403	PP530414	PP866525
	Sigir-7/Sanlıurfa/2021	ME1a	PP530408	PP530446	
	Sigir-8/Sanlıurfa/2021	ME1a	PP530406	PP530445	PP866521
	Kopek-9/Gaziantep/2021	ME2			PP866505
	Kopek-10/Gaziantep/2021	ME1a	PP530404	PP530441	PP866515
	Kopek-34/Diyarbakir/2021	CA2		PP530416	PP866536
	Kopek-35/Diyarbakir/2021	CA2	PP530396	PP530420	PP866537
	Kopek-36/Diyarbakir/2021	CA2		PP530424	PP866540
	Sigir-37/Diyarbakir/2021	CA2	PP530392		PP866529
	Kopek-45/Mardin/2021	CA2	PP530401	PP530413	PP866527
	Kopek-78/Sanlıurfa/2020	CA2			PP866481
	Sigir-79/Sanlıurfa/2020	CA2			PP866482
	Keci-80/Sanlıurfa/2020	ME1a			PP866497
	Kopek-81/Gaziantep/2020	ME1a			PP866498
	Sigir-85/Adiyaman/2020	ME1a			PP866500
	Kopek-113/Diyarbakir/2019	CA2			PP866459
	Kopek-210/Sirnak/2021	CA2			PP866524
	Sigir-211/Sirnak/2021	CA2			PP866523
	Kopek-220/Mardin/2017	ME1a			PP866431

Çizelge 3.1. Devam Çalışılan tanı materyallerinin isimleri, kuduz viruslarının yer aldıkları alt dallar ve GenBank accession numaraları

	Kurt-221/Mardin/2017	ME1a			PP866430
	Kopek-224/Diyarbakir/2017	CA2			PP866414
	Tilki-225/Diyarbakir/2017	ME1a			PP866429
	Kopek-234/Diyarbakir/2018	ME1a			PP866440
	Cakal-235/Diyarbakir/2018	ME1a			PP866441
	Kopek-242/Mardin/2018	ME1a			PP866446
	Kopek-269/Adiyaman/2019	ME1a			PP866462
	Kopek-272/Sanlıurfa/2019	CA2			PP866458
İç Anadolu Bölgesi	Kopek-26/Eskisehir/2021	ME2	PP530384	PP530438	PP866502
	Tilki-57/Aksaray/2020	ME2	PP530385	PP530437	
	Tilki-59/Nigde/2020	ME2	PP530386	PP530436	PP866487
	Sigir-60/Nigde/2020	ME2			PP866483
	Kopek-63/Karaman/2020	ME2	PP530387	PP530435	PP866488
	Kedi-64/Konya/2020	ME2			PP866485
	Sigir-65/Konya/2020	ME2			PP866486
	Sigir-76/Ankara/2020	ME2			PP866484
	Sigir-203/Kayseri/2021	ME1a			PP866514
	Sigir-205/Ankara/2021	ME2			PP866503
	Tilki-279/Konya/2016	ME2			PP866412
	Tilki-291/Kayseri/2018	ME2			PP866456
	Kopek-292/Corum/2019	ME2			PP866476
	Koyun-71/Balikesir/2020	ME2			PP866492
Marmara Bölgesi	Sigir-72/Balikesir/2020	ME2			PP866493
	Sigir-73/Canakkale/2020	ME2			PP866490
	Kopek-74/Canakkale/2020	ME2			PP866491
	Kedi-75/Yalova/2020	ME2			PP866489
	Tilki-282/Balikesir/2016	ME2			PP866411
	Kopek-252/Bayburt/2018	ME1a			PP866457
Karadeniz Bölgesi	Sigir-289/Amasya/2019	ME2			PP866475
	Sigir-290/Giresun/2018	ME2			PP866455

Hayvan türlerine göre dizin bilgileri elde edilen kuduz viruslarının alt dallara dağılımı Çizelge 3.2.'de sunuldu.

Çizelge 3.2. Hayvan türlerine göre dizin bilgileri elde edilen kuduz viruslarının alt dallara dağılımı

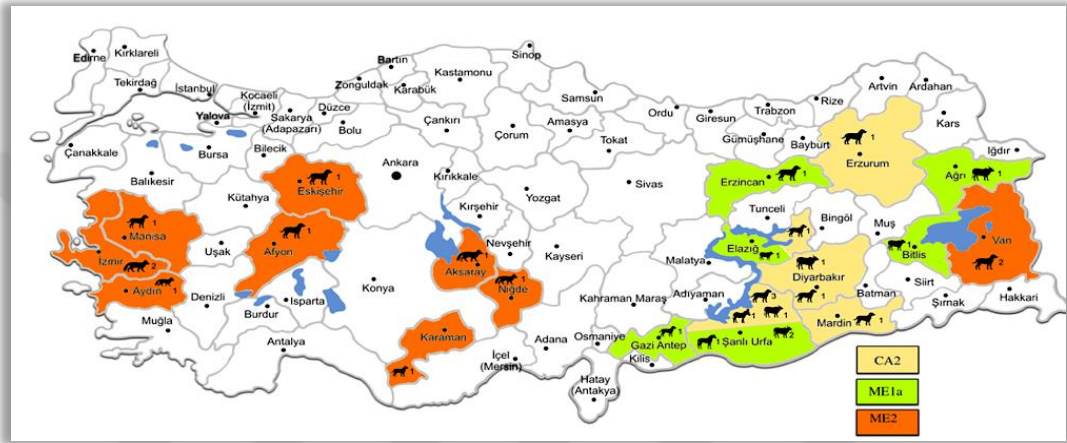
Tür	RABV (n=)	ME1a	ME2	CA2
At	1	1		
Eşek	1			1
Keçi	3	2	1	
Koyun	3	1	2	
Sığır	28	9	13	6
Kedi	6	2	4	
Köpek	66	21	27	18
Kurt	3	2	1	
Porsuk	1		1	
Sansar	2	1	1	
Çakal	2	1	1	
Tilki	19	6	13	
Toplam	135	46	64	25

Her bir gen bölgesi için yapılan moleküler analiz çalışma verileri ayrı başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.

3.1. N Gen Bölgesi için Elde Edilen Bulgular

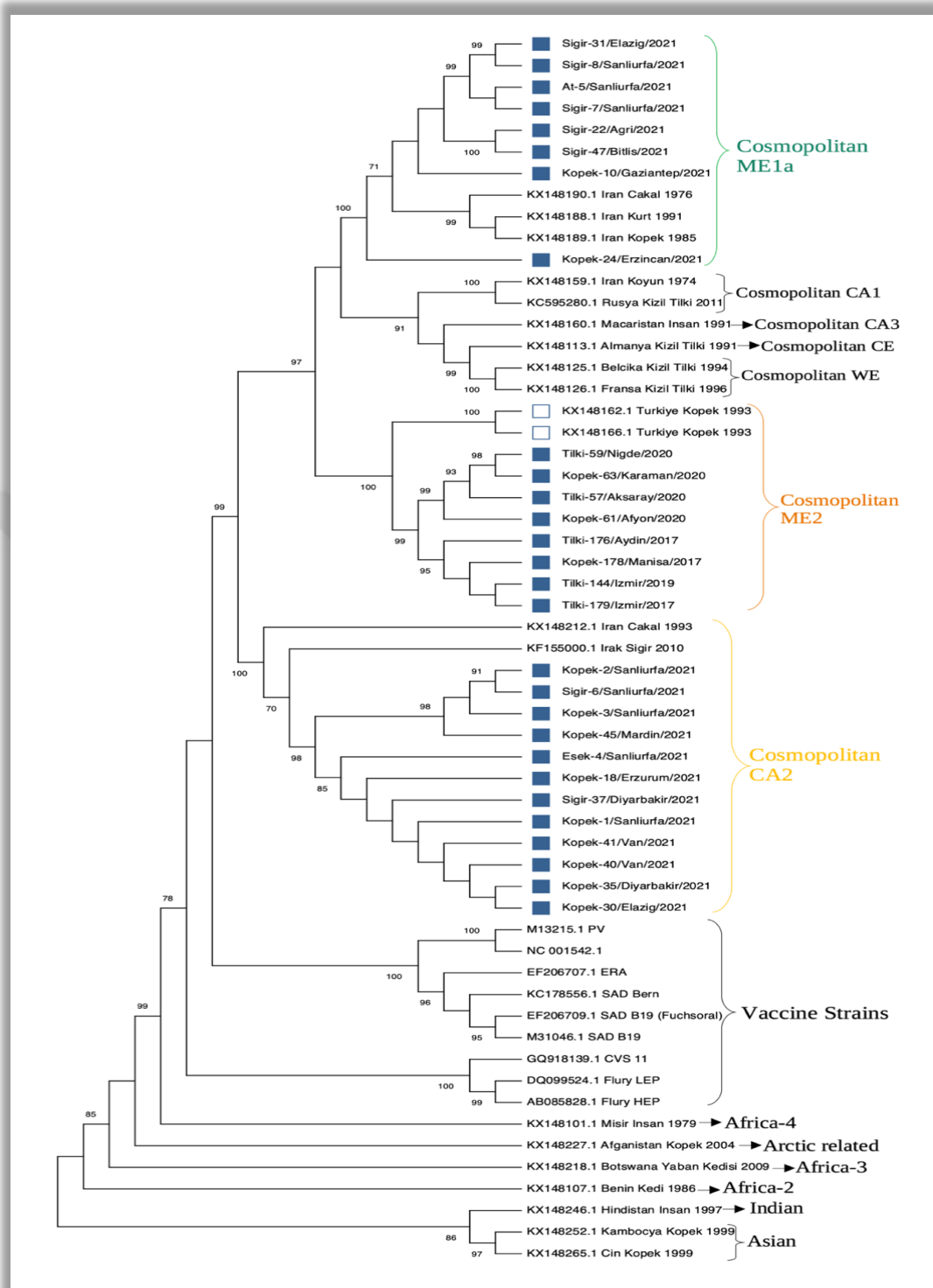
3.1.1. Filogenetik Analiz ve Benzerlik Oranları

GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait kuduz viruslarının N gen bölgesi dizinleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz bu çalışmadaki kuduz viruslarının (n=29) *Cosmopolitan* dalında 3 farklı alt dalda (ME1a, ME2, CA2) yer aldığını ortaya koydu (Çizelge 3.1.) (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. N Gen bölgesi için materyallerin sağlandığı iller, hayvan türleri ve sayıları

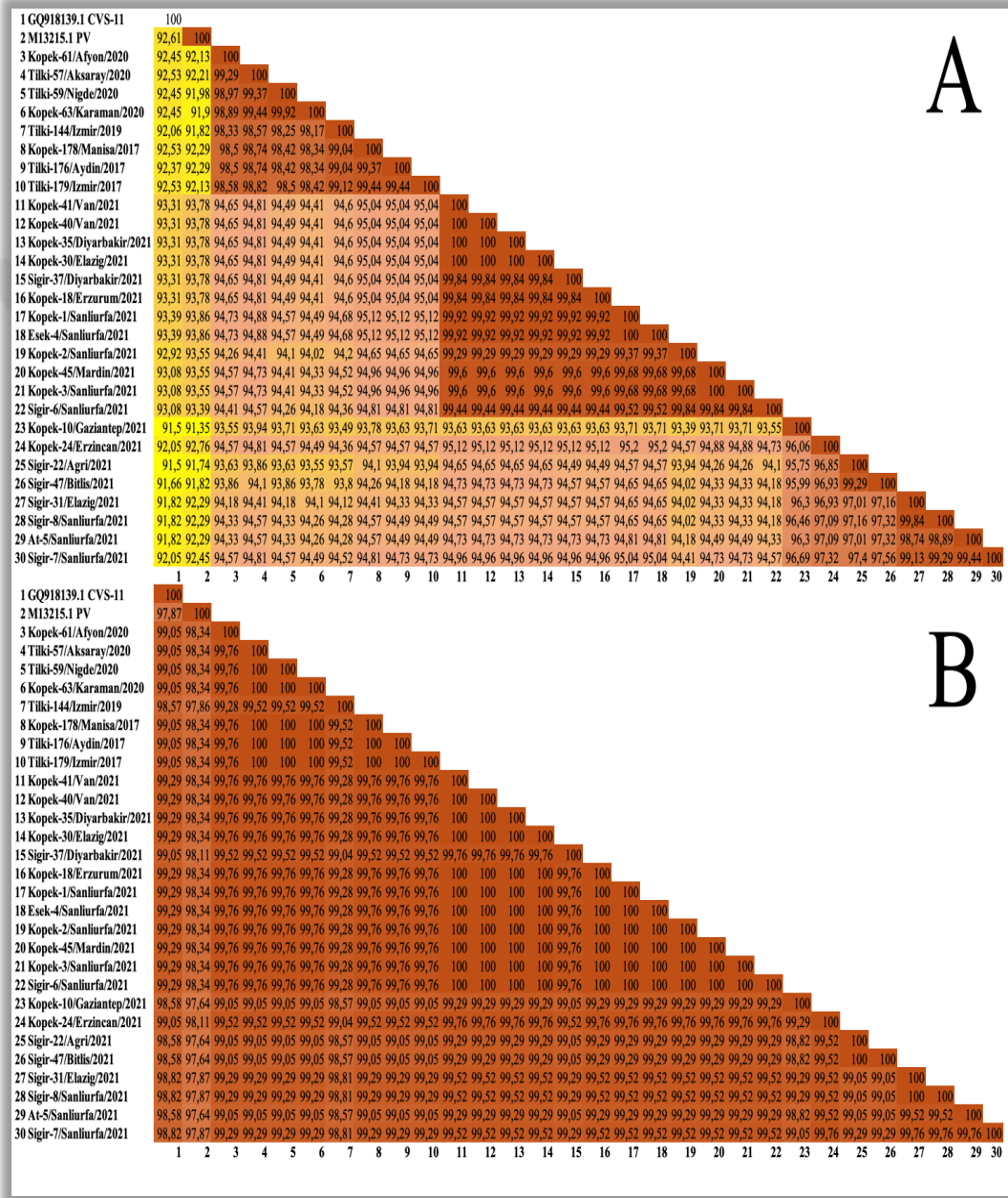
Bu çalışmada kullanılan kuduz virusları ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait kuduz viruslarının N gen bölgesi dizinleri (1272 bp) kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.2.'de sunuldu. Kopek-26/Eskisehir/2021 isimli kuduz virusunun N gen bölgesi nükleotit uzunluğu hazırlanan filogenetik ağaçtaki kuduz viruslarının nükleotit uzunluklarından daha kısa olduğu için bu virus Şekil 3.2.'de sunulan filogenetik ağaçta yer almamaktadır. Söz konusu kuduz virusunun filogenetik ağacı 1216 bp üzerinden yapılmış olup, ME2 alt dalında yer aldığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.).



Şekil 3.2. Bu çalışmada kullanılan kuduz viruslarının N gen bölgesi filogenetik analizi (1272 bp). %70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ işaretlenmiştir. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G+I modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirilmiştir

1272 bp'lik uzunluk ile hazırlanan filogenetik ağaçta bulunan (Şekil 3.2.), bu çalışmadaki kuduz viruslarının N gen bölgesinin nükleotit (nt) benzerlik oranları; kendi

aralarında % 93,39-100, referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla % 91,5 - 93,39 ve % 91,35 - 93,86 olarak bulundu (Şekil 3.3.). Amino asit (aa) benzerlik oranları ise kendi aralarında % 98,57-100; referens suşlardan CVS-11(GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile sırasıyla % 98,57- 99,29 ve % 97,64-98,34 olarak bulundu.

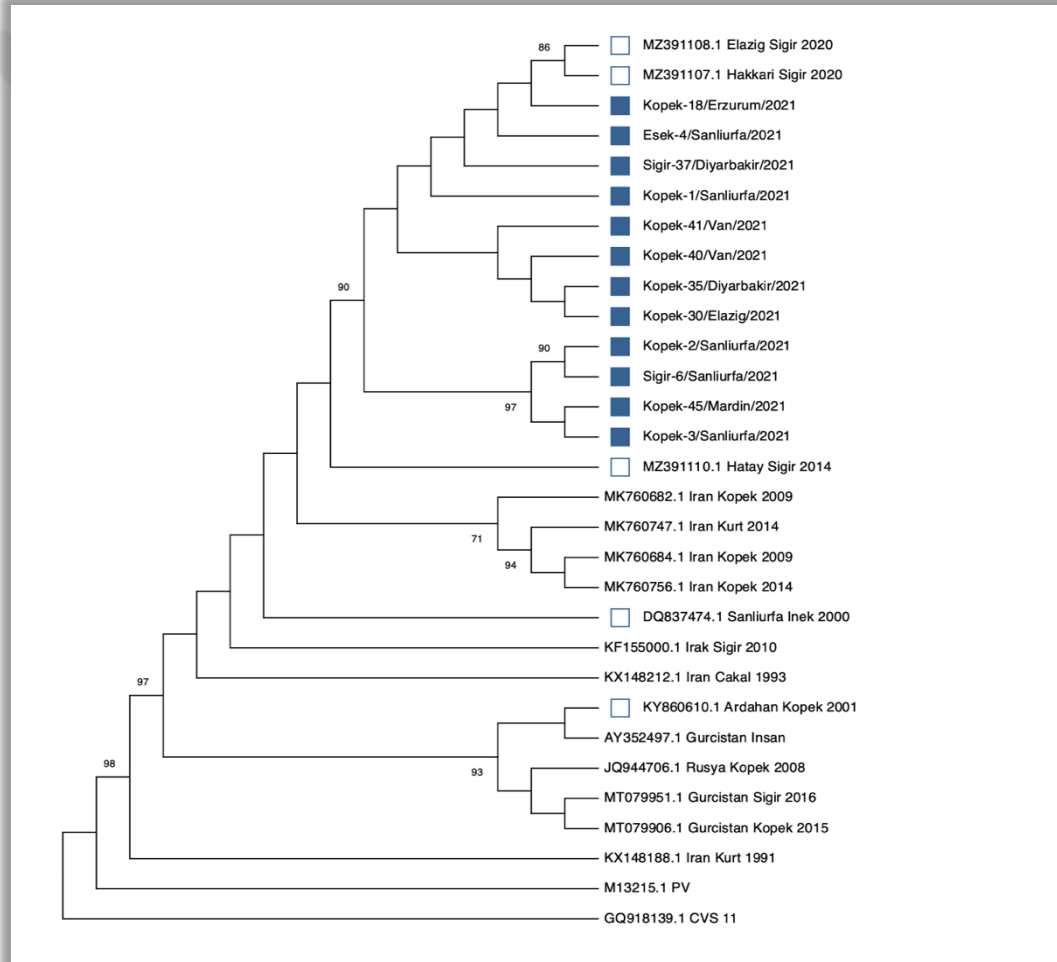


Şekil 3.3. Bu çalışmadaki kuduz viruslarının N gen bölgelerinin kendi aralarında ve referans suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)

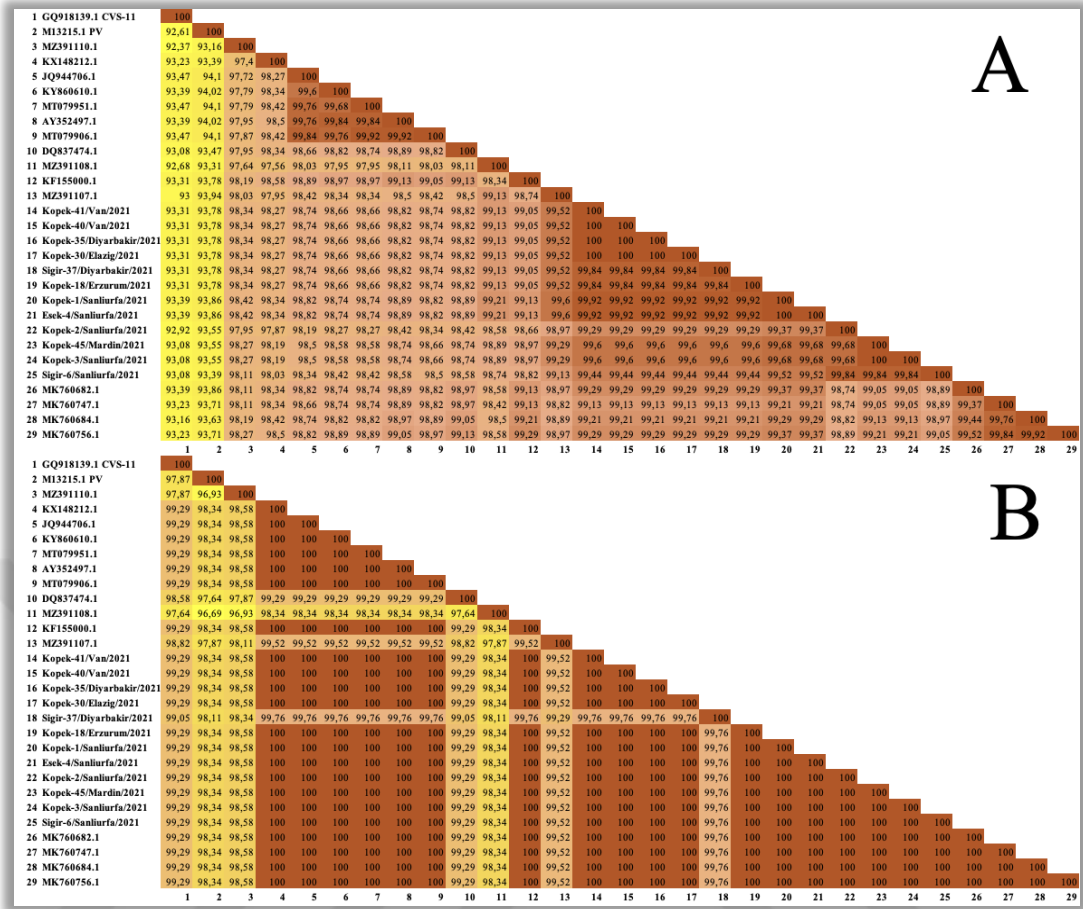
Bu çalışmaya ait RABV'ların yer aldığı her bir alt dal için BLAST veri tabanından yakın ilişkili diğer kuduz virusları seçilerek filogenetik analizi yapıldı.

3.1.1.1. N Gen Bölgesi *Cosmopolitan* CA2 Alt Dalı

Cosmopolitan CA2 alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=12), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz viruslarına ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.4.'de sunuldu. Dış grup olarak referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile ME1a alt dalına ait örnek (KX148188.1) kullanıldı. Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla % 99,29 - 100 (Şekil 3.3.), %97,95 - 99,6, % 97,87 - 99,37 (Şekil 3.5.); amino asit benzerlik oranları ise sırasıyla % 99,76 - 100 (Şekil 3.3.), % 98,11-100 ve % 99,76-100 (Şekil 3.5.) olarak bulundu.



Şekil 3.4. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen bölgesi CA2 alt dalına ait filogenetik analizi (1272bp). %70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

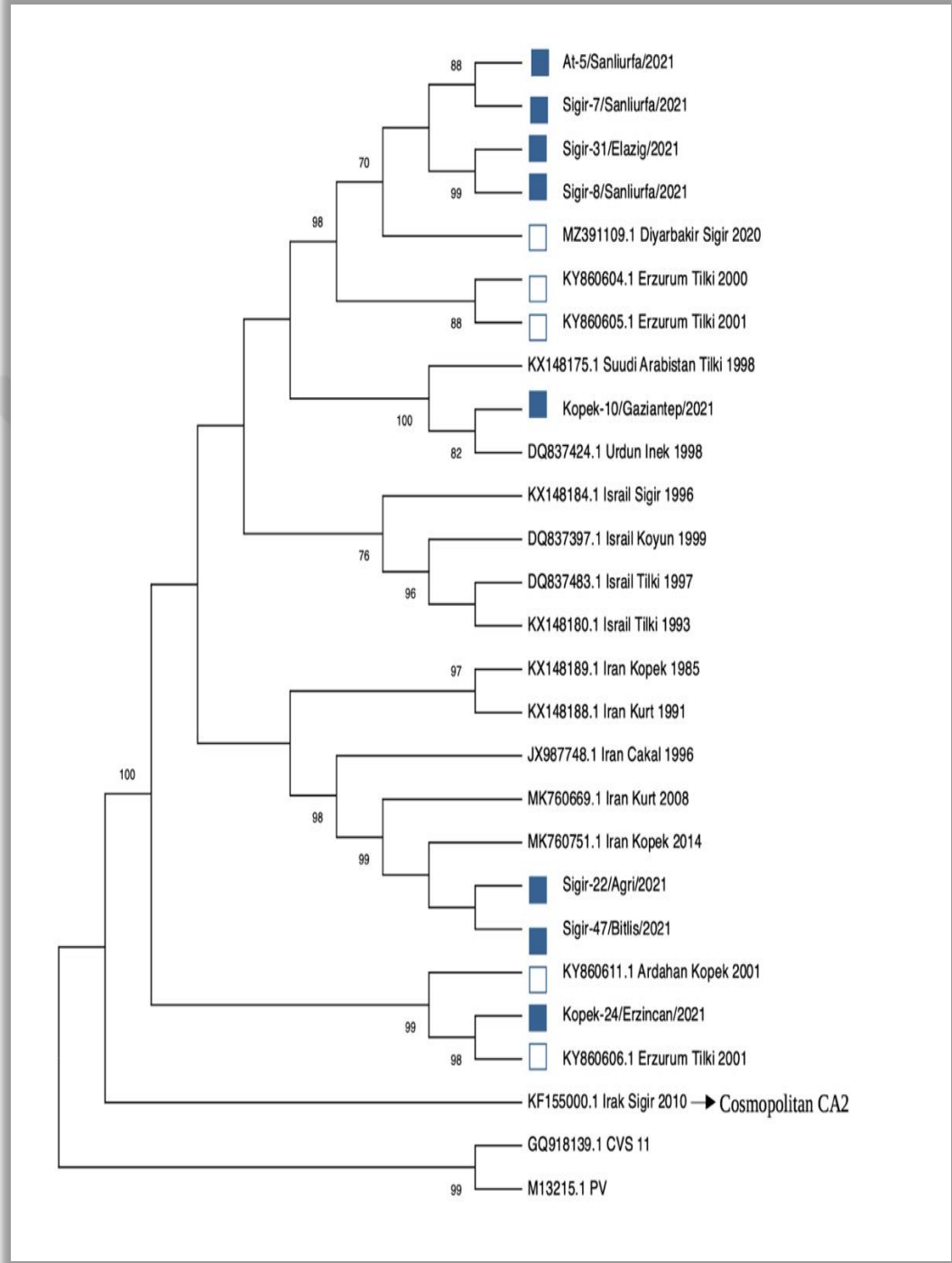


Şekil 3.5. N gen bölgesi CA2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referans suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)

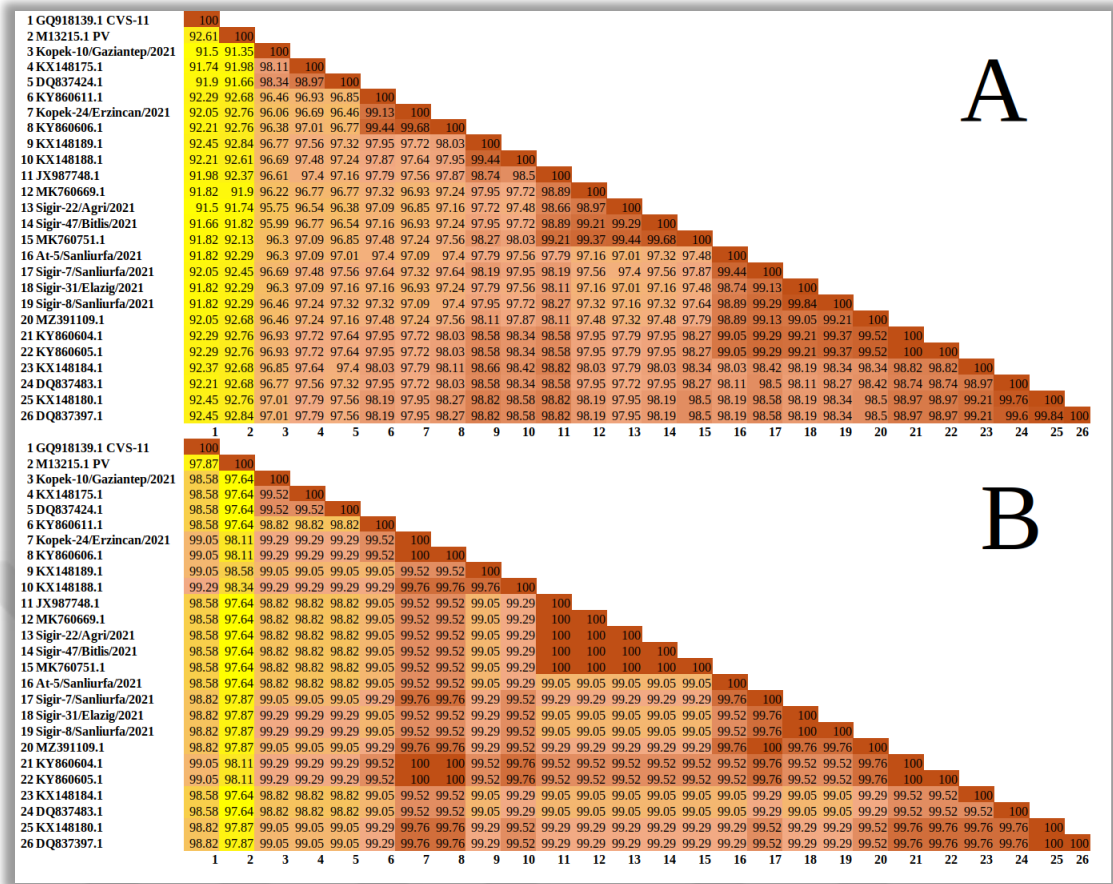
3.1.1.2. N Gen Bölgesi *Cosmopolitan* ME1a Alt Dalı

Cosmopolitan ME1a alt dalında yer alan örnekler tek tek BLAST veri tabanına yüklenerek, başka çalışmalara ait kuduz virusları ile yakın ilişkili olma bakımından incelendiğinde öncelikle İsrail (DQ837397.1, DQ837483.1, KX148180.1) ve İran (KX148189.1, JX987748.1, MK760669.1, MK760751.1) sonrasında ise Suudi Arabistan (KX148175.1) ve Ürdün’deki (DQ837424.1) kuduz virusları ile yakın olduğu görüldü. *Cosmopolitan* ME1a alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=8), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz viruslarına ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.6.’da sunuldu. Dış grup olarak referans suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile CA2 alt dalına ait bir örnek (KF155000.1) kullanıldı. Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla % 95,75- 99,84 (Şekil 3.3.), % 96,38 – 99,68, % 96,22-99,68 (Şekil

3.7.); amino asit benzerlik oranları ise sırasıyla % 98,82-100 (Şekil 3.3.), % 98,82-100 ve % 98,82- 100 (Şekil 3.7.) olarak bulundu.



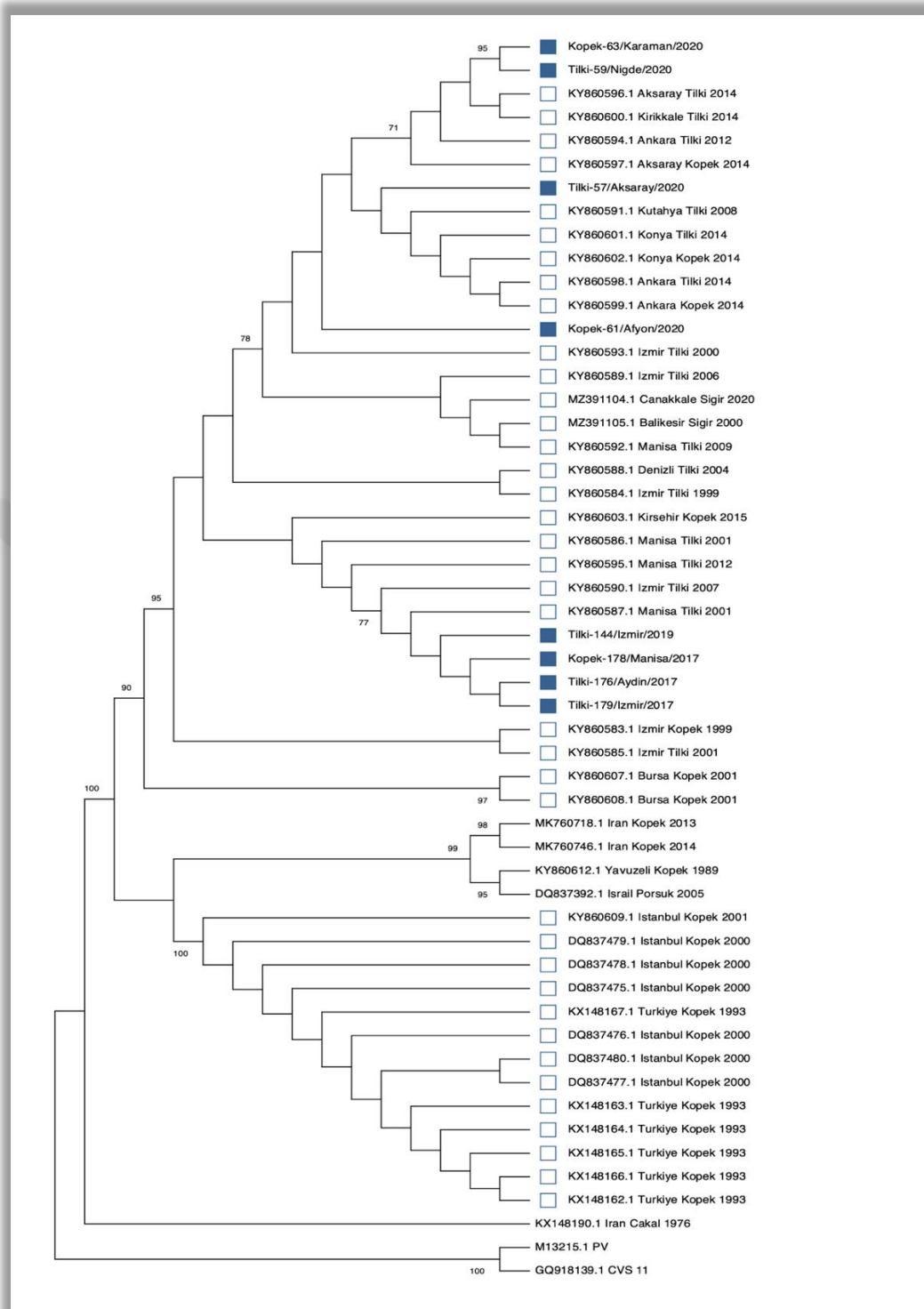
Şekil 3.6. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen bölgesi ME1a alt dalına ait filogenetik analizi (1272bp). %70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi



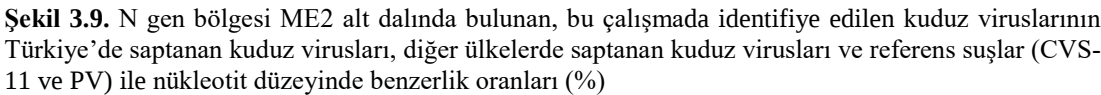
Şekil 3.7. N gen bölgesi ME1a alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referans suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotid düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)

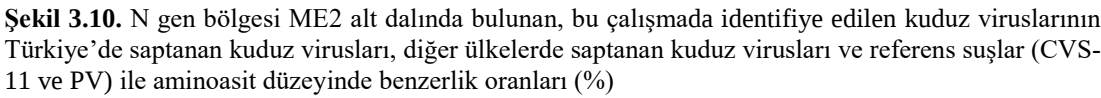
3.1.1.3. N Gen Bölgesi *Cosmopolitan* ME2 Alt Dalı

Cosmopolitan ME2 alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=8), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz virusları ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.8.’de sunuldu. Dış grup olarak referans suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile ME1a alt dalına ait bir örnek (KX148190.1) kullanıldı (Şekil 3.13). Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotid düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla % 98,17-99,92 (Şekil 3.3.), % 97,69-99,68 ve % 97,38-98,03 (Şekil 3.9.); aminoasit benzerlik oranları ise sırasıyla % 99,28 -100 (Şekil 3.3.), % 98,33-100 ve % 99,28- 99,76 (Şekil 3.10.) olarak bulundu.



Şekil 3.8. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen bölgesi ME2 alt dalına ait filogenetik analizi (1272bp). %70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

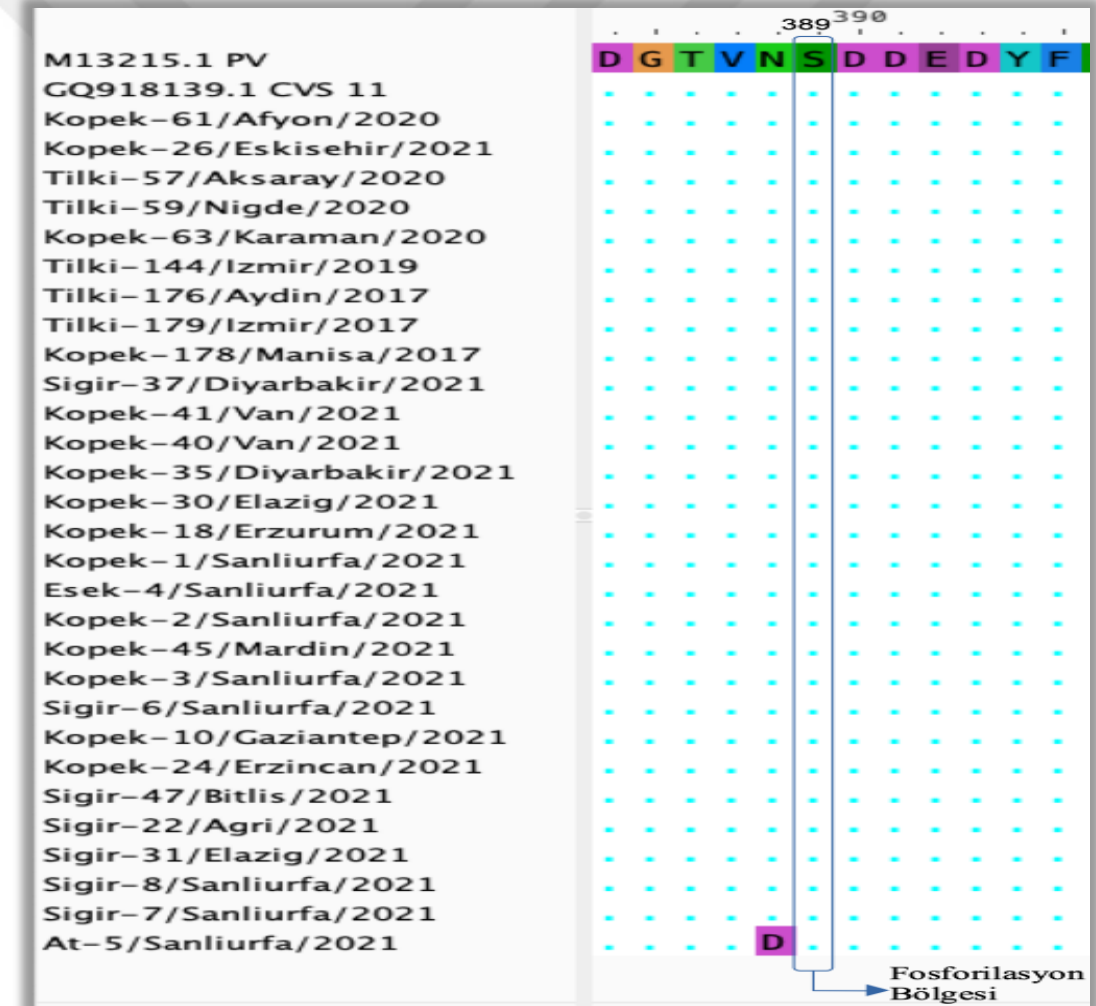




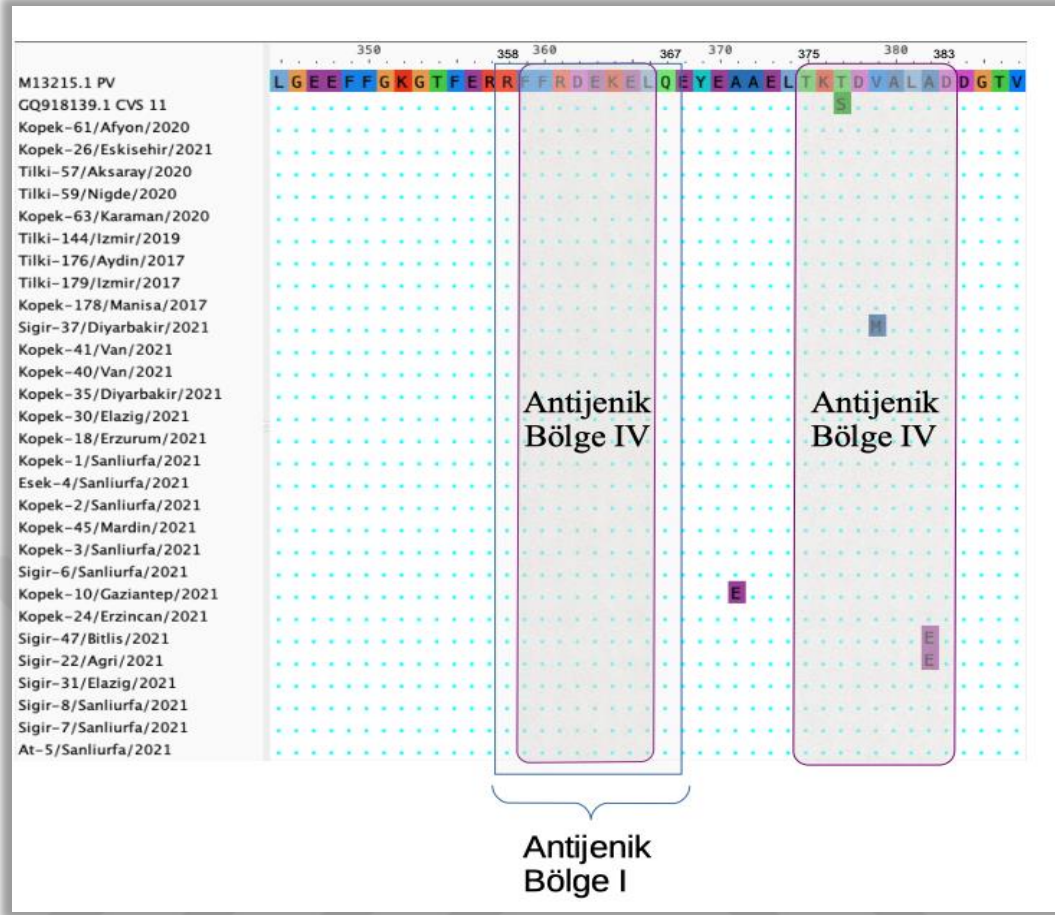
3.1.2. Dizin Analizi Sonuçları

Kuduz virusu N gen bölgesi tarafından kodlanan 389. aa'nin fosforilasyon bölgesi olduğu ve bu bölgenin virusun replikasyon ve transkripsiyonunda önemli olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının tamamında fosforilasyon bölgesindeki serine'in (S) varlığını koruduğu gözlemlendi (Şekil 3.11.).

N gen bölgesinin kodladığı antijenik bölgeler yönünden dizinler incelendiğinde ise antijenik bölge I'de (358-367. aa) herhangi bir amino asit değişimi görülmezken, antijenik bölge IV'te Sigir-37/Diyarbakir/2021 örneğinde 379. aa'de Valine'den (V) Methionine'e (M); 382. aa'de ise Sigir-47/Bitlis/2021 ile Sigir-22/Agri/2021 örneklerinde Alanine'den (A) Glutamic acid'e (E) değişim gözlemlendi (Şekil 3.12.).

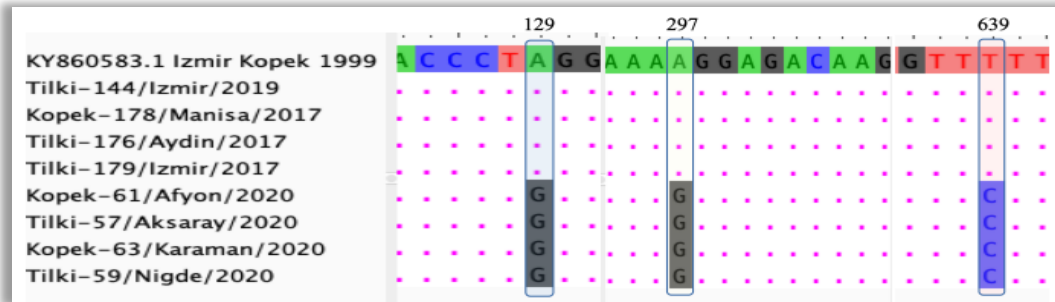


Şekil 3.11. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının N gen fosforilasyon bölgeleri



Şekil 3.12. N gen bölgesi antijenik bölge I ve antijenik bölge IV

Antijenik bölgeler dışında bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının dizinlerinde bazı değişiklikler (SNP) görüldü. Bunlardan Marston vd. (2017) tarafından Türkiye’de saptanan bazı kuduz virusları için bildirilen ve bu çalışmanın verilerinin – tartışma bölümünde ele alınacak- moleküler epidemiyolojik değerlendirmeleri bakımından anlamlı olduğu düşünülen değişiklikler Şekil 3.13.’te verildi. Bu nükleotit değişimlerinin amino asitlerde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı saptandı.



Şekil 3.13. N gen bölgesinde 129, 297 ve 369. nükleotitlerde gözlenen SNP’ler

3.2. G Gen Bölgesi için Elde Edilen Bulgular

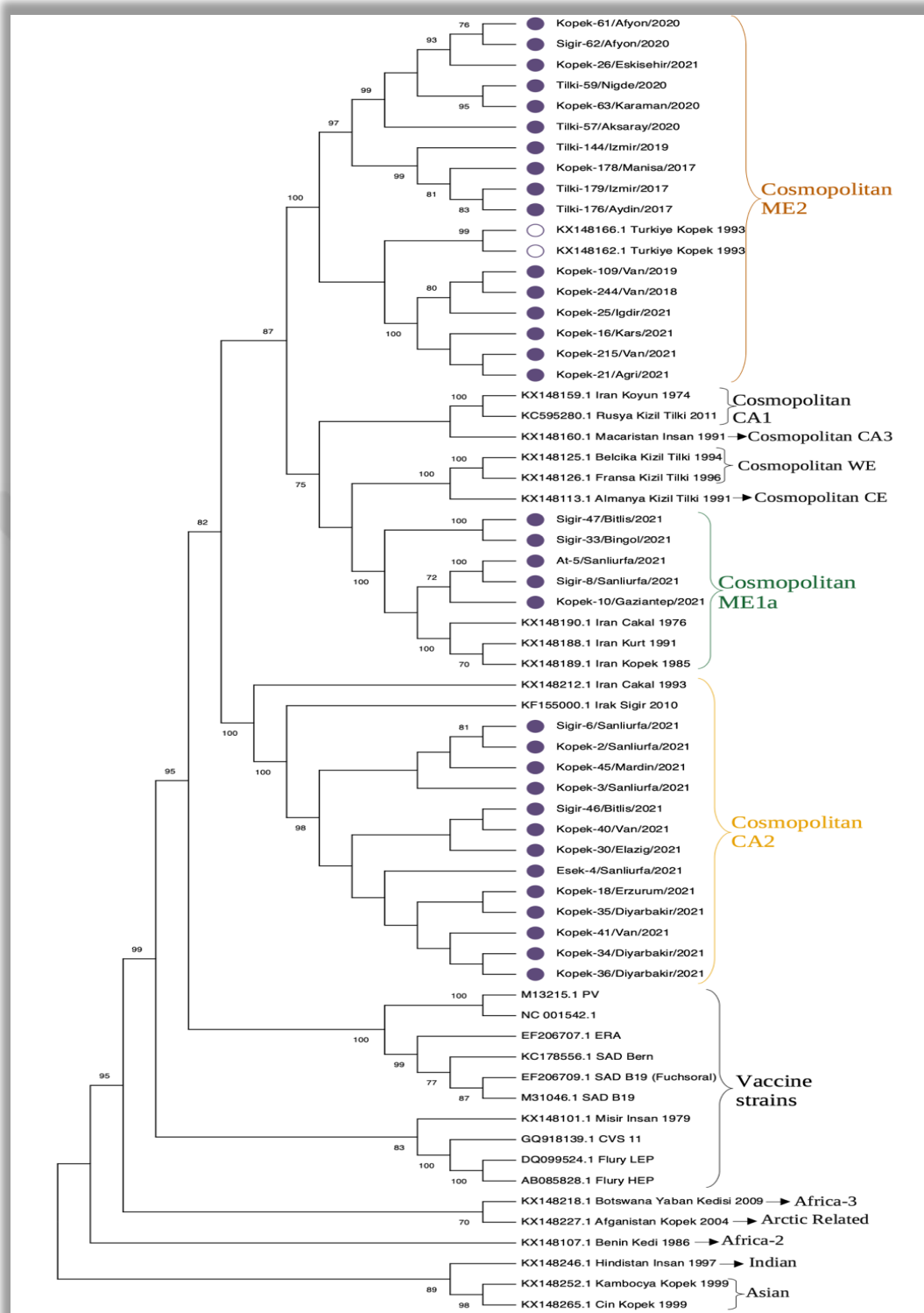
3.2.1. Filogenetik Analiz ve Benzerlik Oranları

GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait kuduz viruslarının G gen bölgesi dizinleri kullanılarak yapılan filogenetik analizde bu çalışmadaki kuduz viruslarının (n=36) *Cosmopolitan* dalında 3 farklı alt dalda (ME1a, ME2, CA2) yer aldığı ortaya koyuldu (Çizelge 3.1.) (Şekil 3.15.). Bu çalışmada kullanılan kuduz virusları ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait kuduz viruslarının G gen bölgesi dizinleri (1538 bp) kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.15.'de sunuldu. Sigir-7/Sanlıurfa/2021 (1093bp) ile Sigir-22/Agri/2021 (1516 bp) olarak adlandırılan kuduz virusları hazırlanan filogenetik ağaçtaki kuduz viruslarının nükleotit uzunluğundan daha kısa olduğu için bu filogenetik ağaçta gösterilmedi. Söz konusu virusların filogenetik ağacı 1093 bp üzerinden yapılmış olup, her ikisinin de ME1a alt dalında yer aldığı tespit edildi (Çizelge 3.1.).

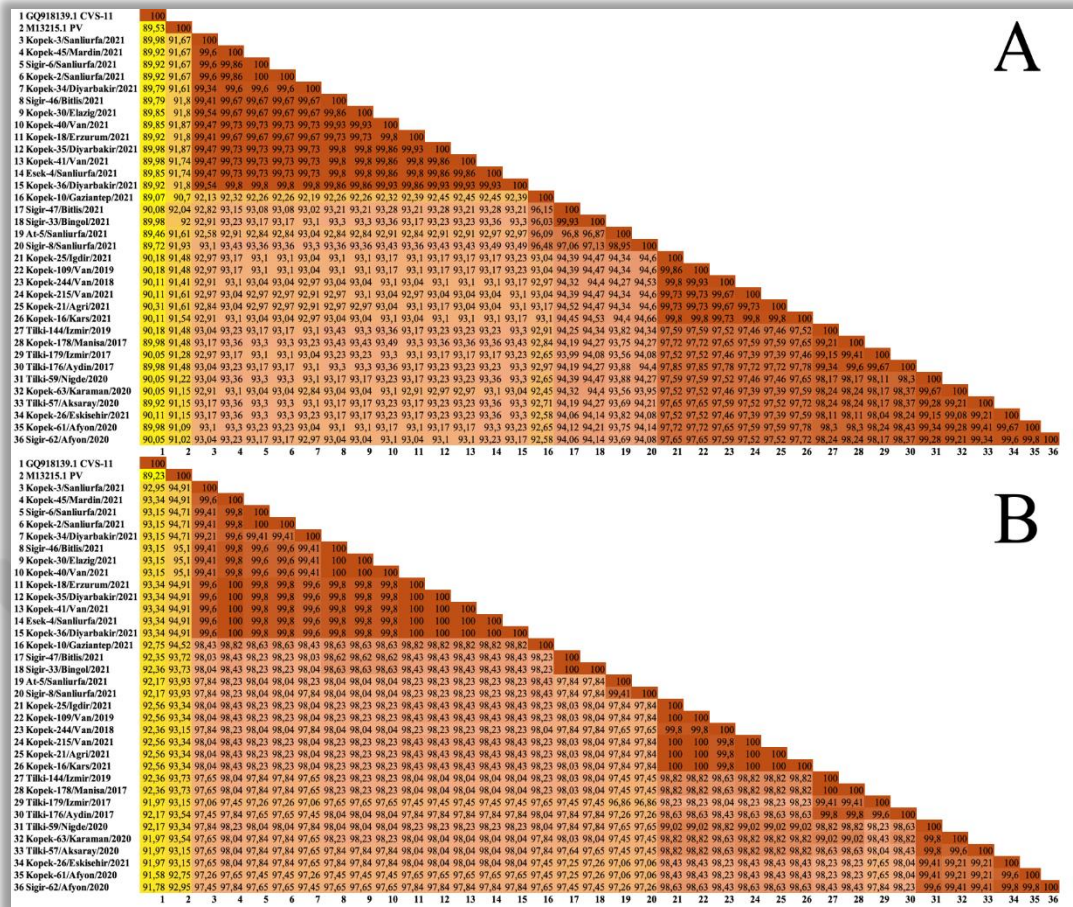
1538 bp'lik uzunluk ile hazırlanan filogenetik ağaçta bulunan (Şekil 3.15.), bu çalışmadaki kuduz viruslarının G gen bölgesinin nükleotit benzerlik oranları; kendi aralarında % 92,13-100, referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla % 89,07-90,31 ve % 90,7- 92,04 olarak bulundu (Şekil 3.16.). Amino asit benzerlik oranları ise kendi aralarında % 96,86-100; referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile sırasıyla % 91,58- 93,34 ve % 92,75-95,1 olarak bulundu (Şekil 3.16.).



Şekil 3.14. G Gen bölgesi için materyallerin sağlandığı iller, hayvan türleri ve sayıları



Şekil 3.15. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi filogenetik analizi (1538 bp). %70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler ● ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise ○ işaretlenmiştir. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, GTR+G+I modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi



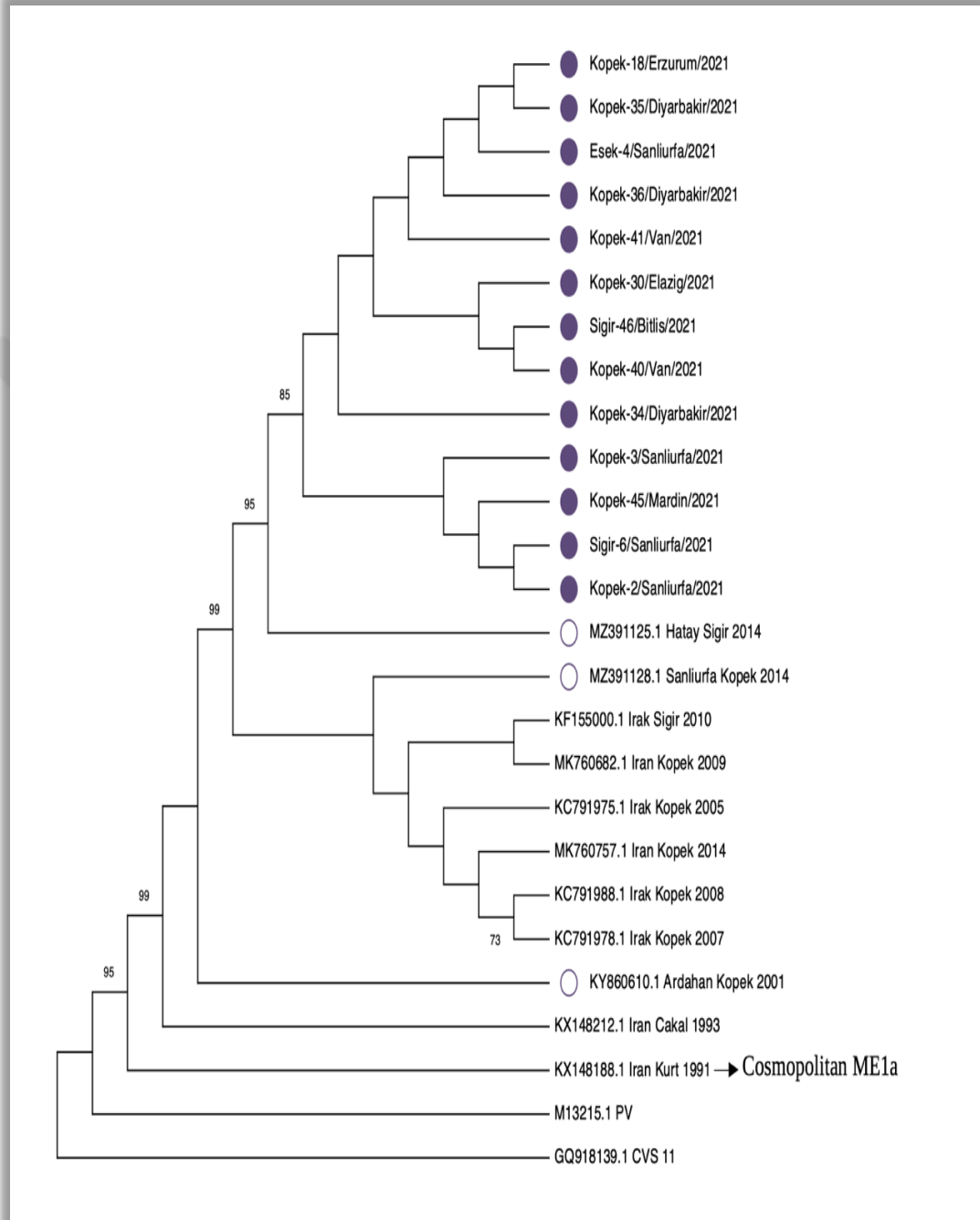
Şekil 3.16. Bu çalışmadaki kuduz viruslarının G gen bölgelerinin kendi aralarında ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve amino asit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)

Bu çalışmaya ait kuduz viruslarının her bir alt dalı için BLAST veri tabanından yakın ilişkili diğer kuduz virusları seçilerek filogeniler oluşturuldu.

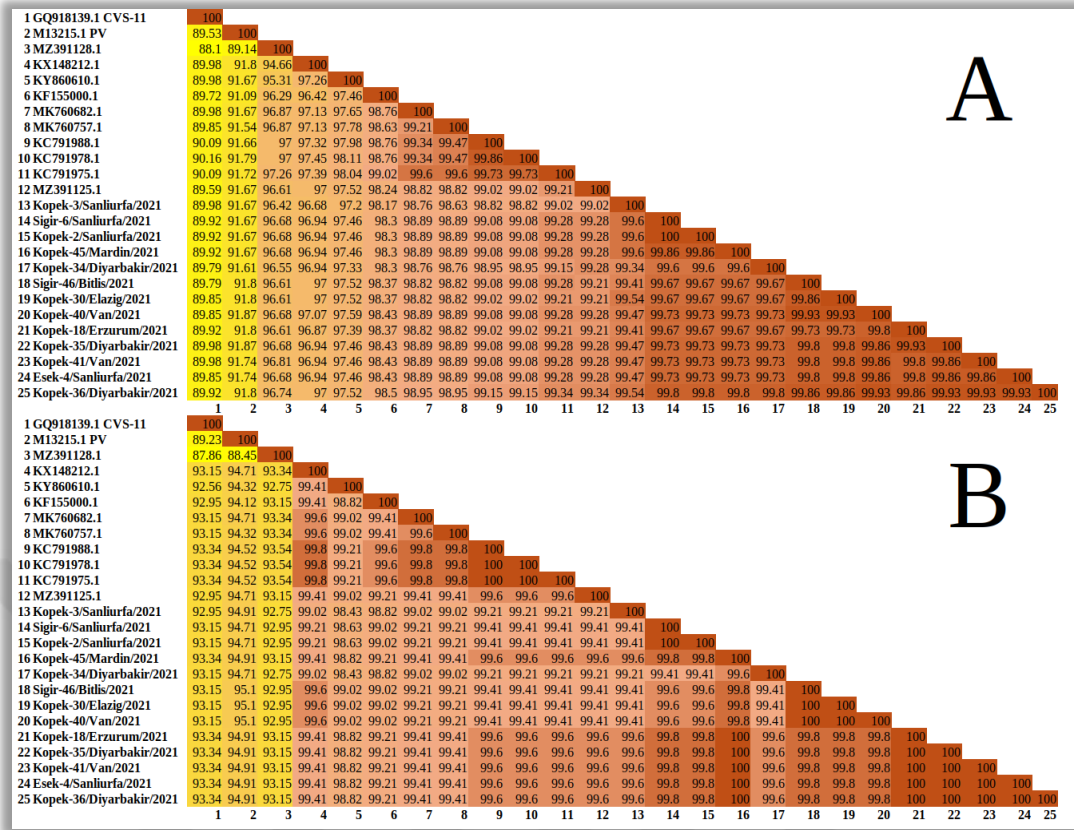
3.2.2. G Gen Bölgesi *Cosmopolitan* CA2 Alt Dalı

Cosmopolitan CA2 alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=13), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz viruslarıyla, ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.17.'de sunuldu. Dış grup olarak referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile ME1a alt dalına ait örnek (KX148188.1) kullanıldı. *Cosmopolitan* CA2 alt dalında yer alan kuduz virusları tek tek BLAST veri tabanına yüklenerek, başka çalışmalara ait kuduz virusları ile yakın ilişkili olma bakımından incelendiğinde her ne kadar Irak (KC791988.1, KC791978.1, KC791975.1) ve İran (MK760682.1, MK760757.1) ile yakınlık bulunmuş olsa da filogenetik ağacın değerlendirmesinde Türkiye örneklerinin kendi içinde ayrı bir dal oluşturduğu kanaatine varıldı. Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerle saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları

sırasıyla % 99,34 -100 (Şekil 3.16.), % 96,42 - 99,34 ve % 96,68 – 99,34 (Şekil 3.18.); aminoasit benzerlik oranları ise sırasıyla % 99,21-100 (Şekil 3.16), % 92,75-99,6 ve % 98,82-99,6 (Şekil 3.18.) olarak bulundu.



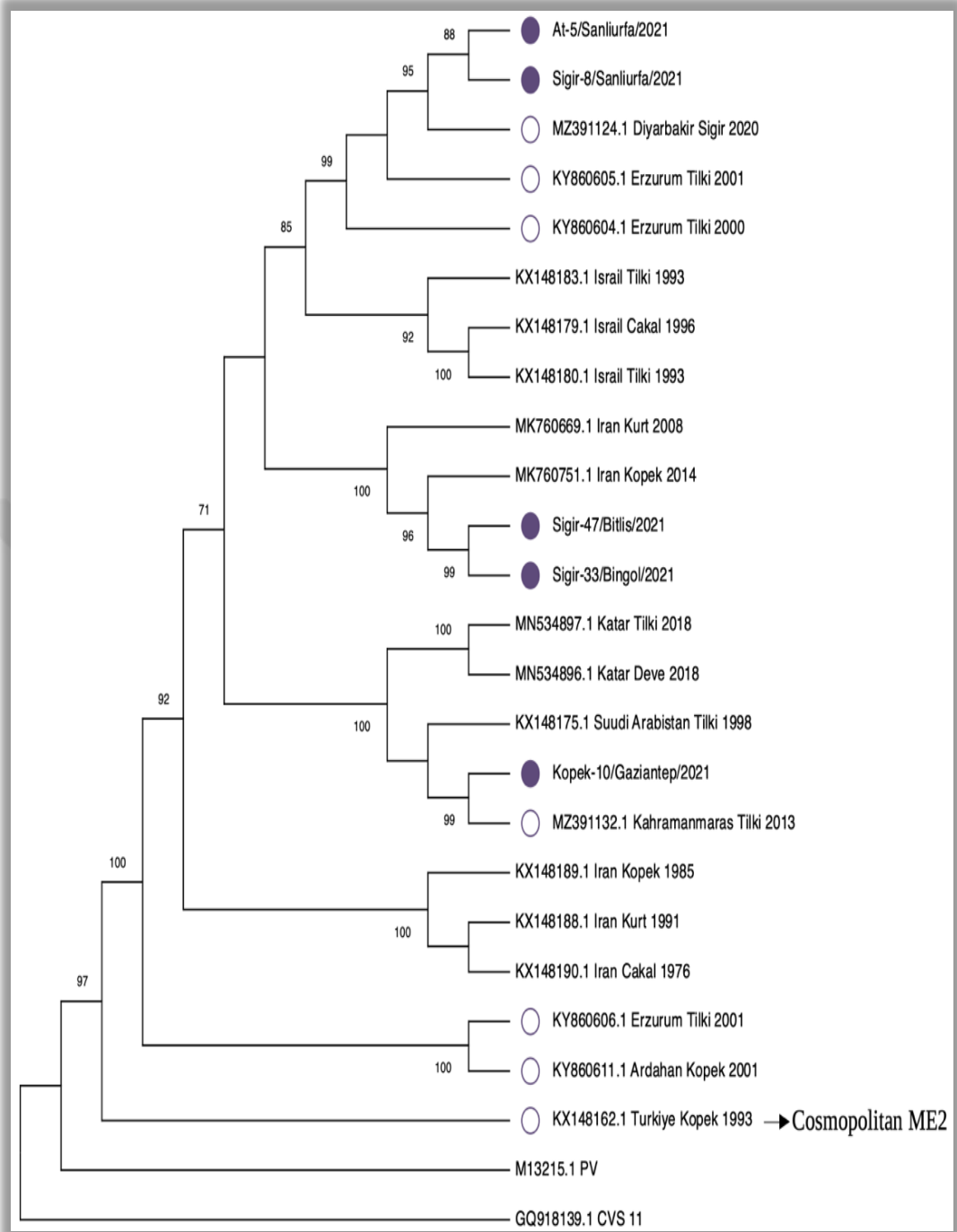
Şekil 3.17. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G Gen bölgesi CA2 alt dalına ait filogenetik analizi (1538bp). % 70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ● ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise ○ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, K2 + G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi



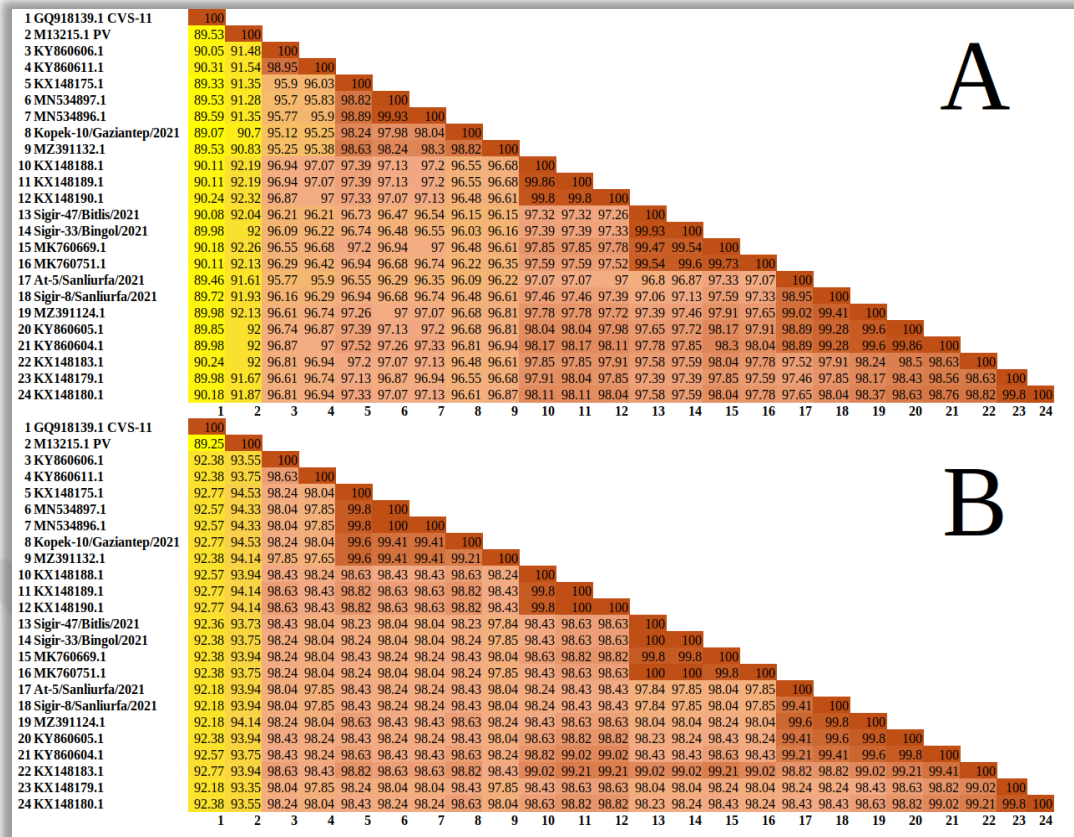
Şekil 3.18. G gen bölgesi CA2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve aminoasit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)

3.2.3. G Gen Bölgesi *Cosmopolitan* ME1a Alt Dalı

Cosmopolitan ME1a alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=5), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz viruslarına ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.19.’da sunuldu. Dış grup olarak referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile ME2 alt dalına ait bir örnek (KX148162.1) kullanıldı. Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerle saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla % 96,03 -99,93 (Şekil 3.16.), % 95,12 - 99,41 ve % 96,48-99,6 (Şekil 3.20.); amino asit benzerlik oranları ise sırasıyla % 97,84 -100 (Şekil 3.16.), % 97,84-99,8 ve % 97,85- 99,8 (Şekil 3.20.) olarak bulundu.



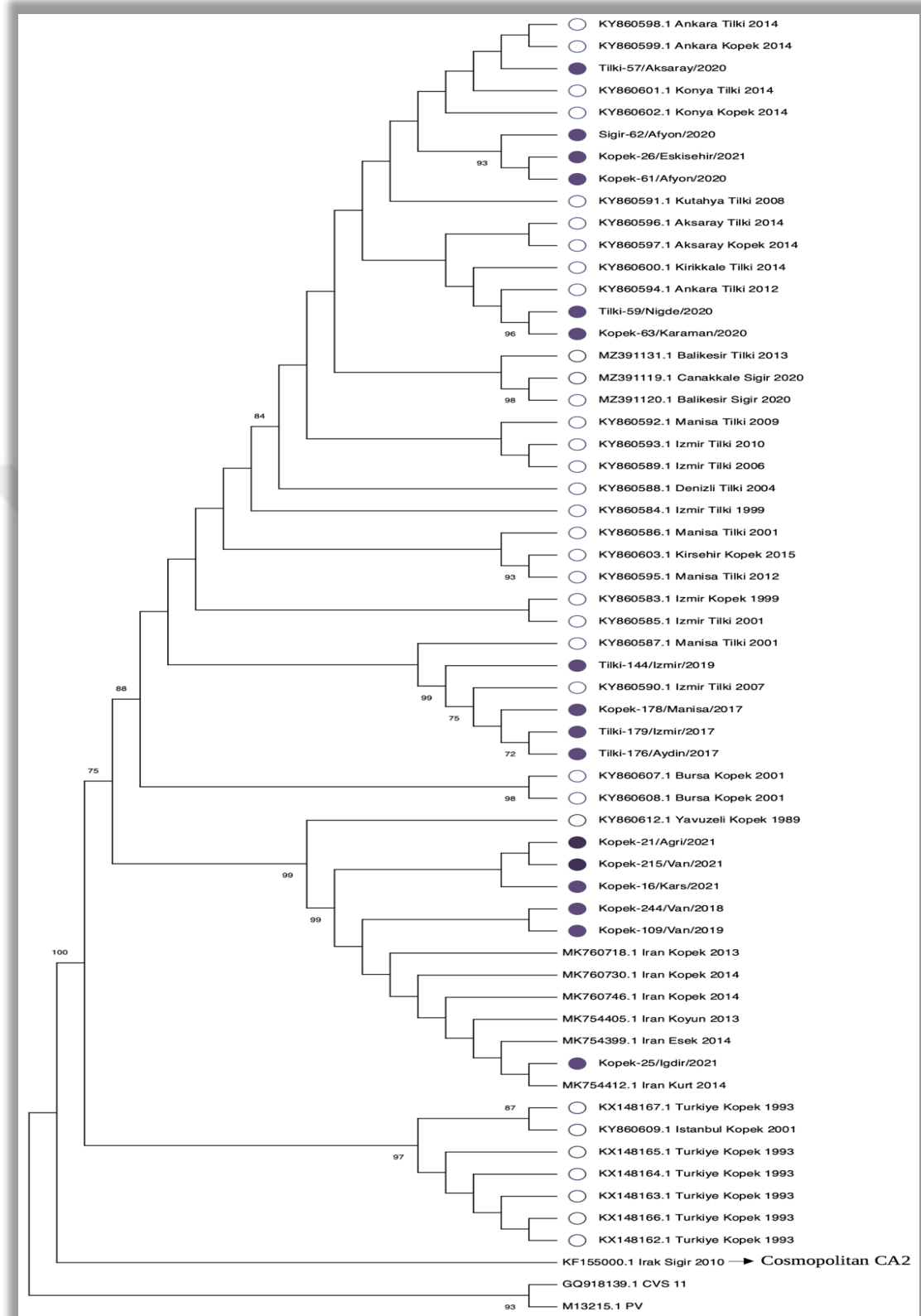
Şekil 3.19. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi ME1a alt dalına ait filogenetik analizi (1538bp). % 70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ● ile, GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise ○ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, K2 + G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi



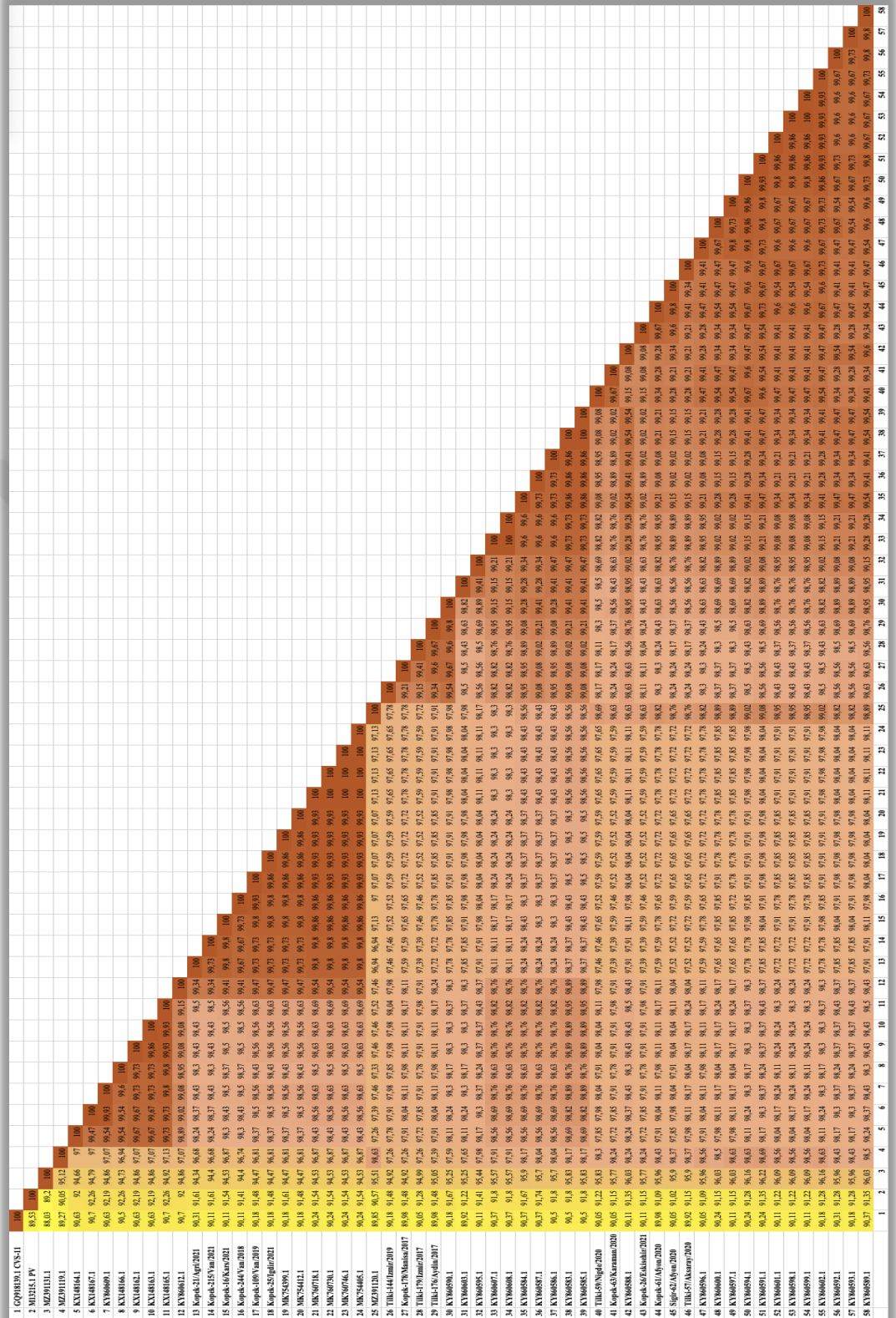
Şekil 3.20. G gen bölgesi ME1a alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virüsleri, diğer ülkelerde saptanan kuduz virüsleri ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotit düzeyinde (A) ve aminoasit düzeyinde (B) benzerlik oranları (%)

3.2.4. G Gen Bölgesi *Cosmopolitan* ME2 Alt Dalı

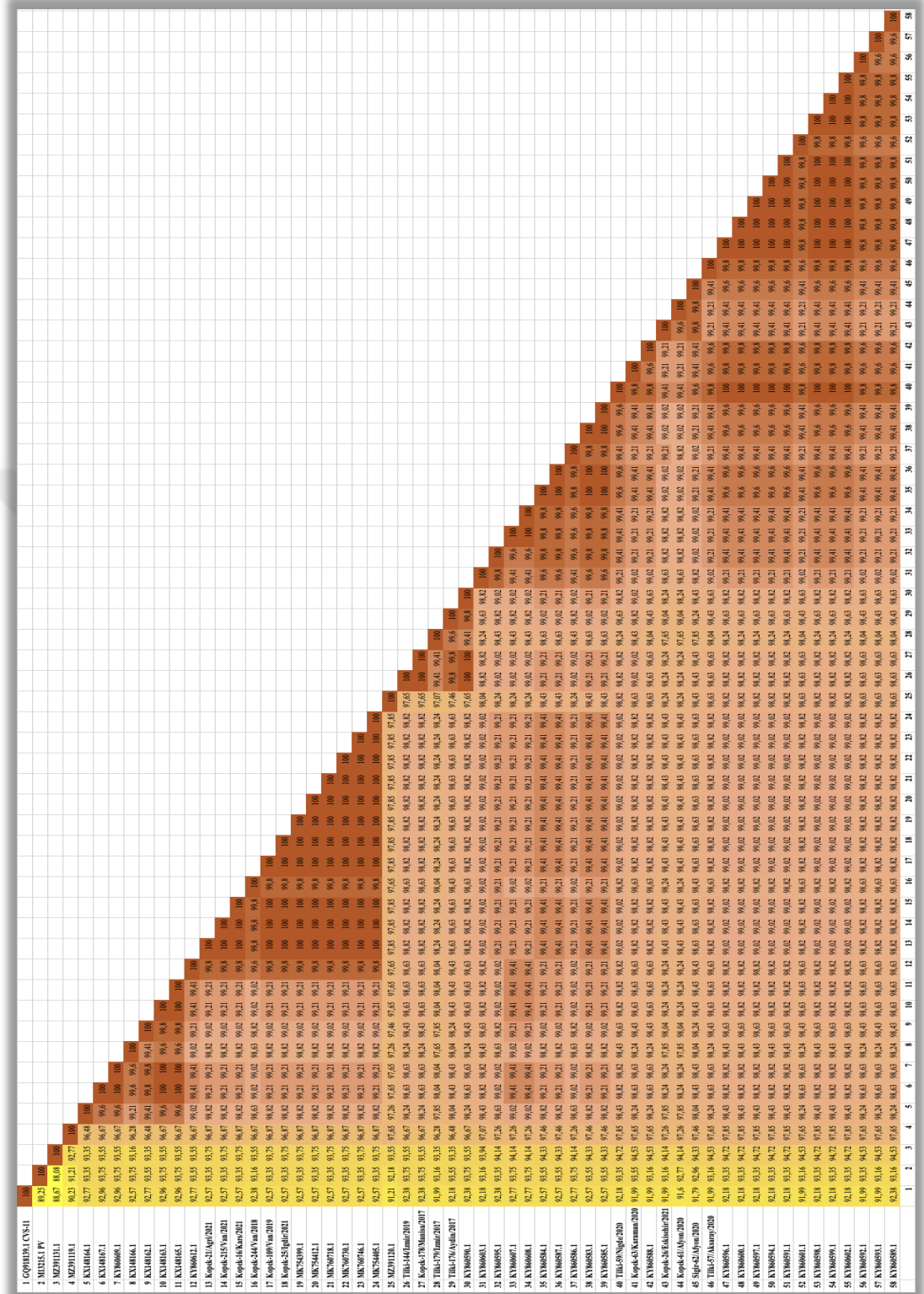
Cosmopolitan ME2 alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=16), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz virüsleri ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.21.’de sunuldu. Dış grup olarak referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile CA2 alt dalına ait bir örnek (KF155000.1) kullanıldı. Söz konusu çalışma virüslerinin kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerle saptanan kuduz virüsleri ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla %97,39-99,93 (Şekil 3.16.), % 94,34-100 ve % 97,39-100 (Şekil 3.22.); amino asit benzerlik oranları ise sırasıyla %97,65-100 (Şekil 3.16.), %93,35-100 ve % 98,24-100 (Şekil 3.23.) olarak bulundu.



Şekil 3.21. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi ME2 alt dalına ait filogenetik analizi (1538bp).% 70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ● ile, GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise ○ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, K2 + G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi



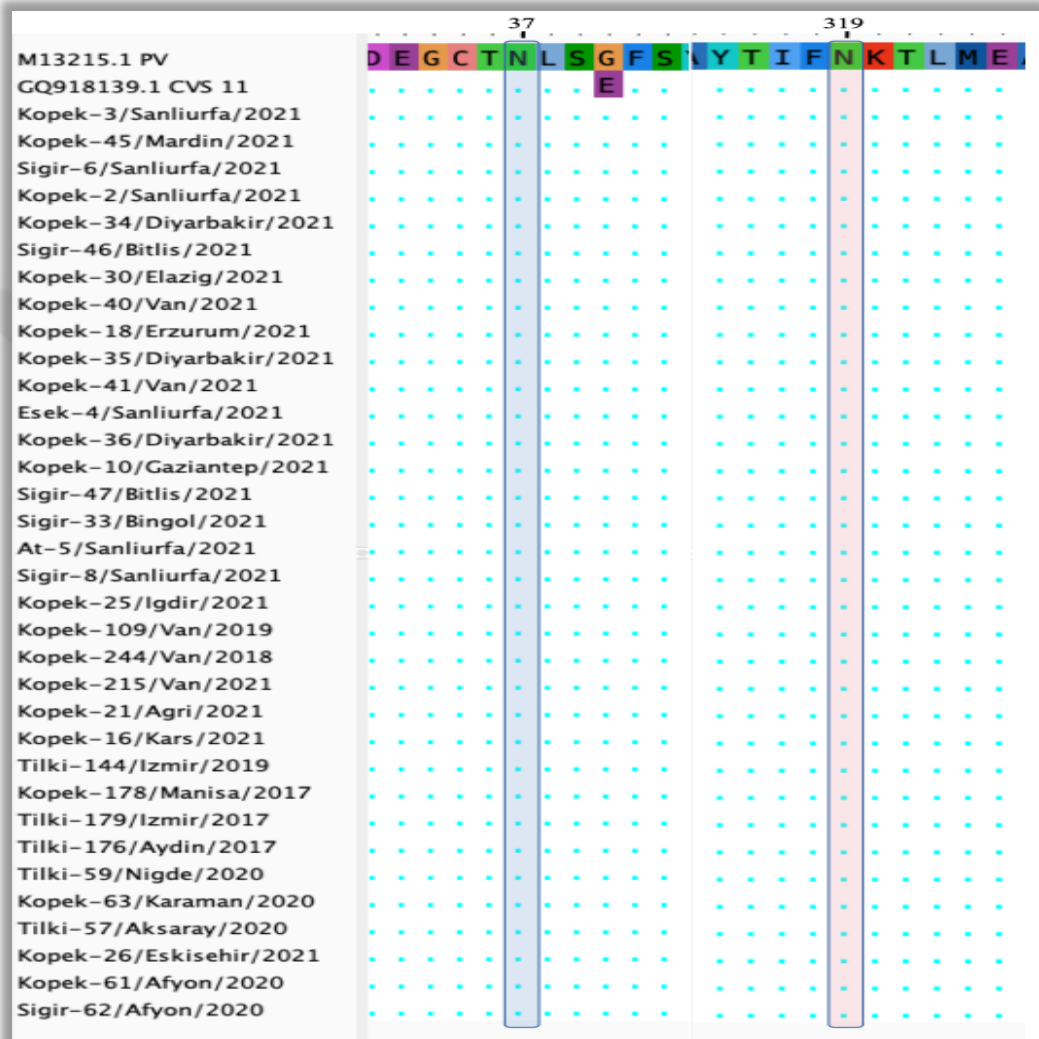
Şekil 3.22. G gen bölgesi ME2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye’de saptanan kuduz virusları, diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ve referens suşlar (CVS-11 ve PV) ile nükleotid düzeyinde benzerlik oranları (%)



Şekil 3.23. G gen bölgesi ME2 alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz virüslerinin Türkiye’de saptanan kuduz virüsleri, diğer ülkelerde saptanan kuduz virüsleri ve referens şuşları (CVS-11 ve PV) ile aminoasit düzeyinde benzerlik oranları (%)

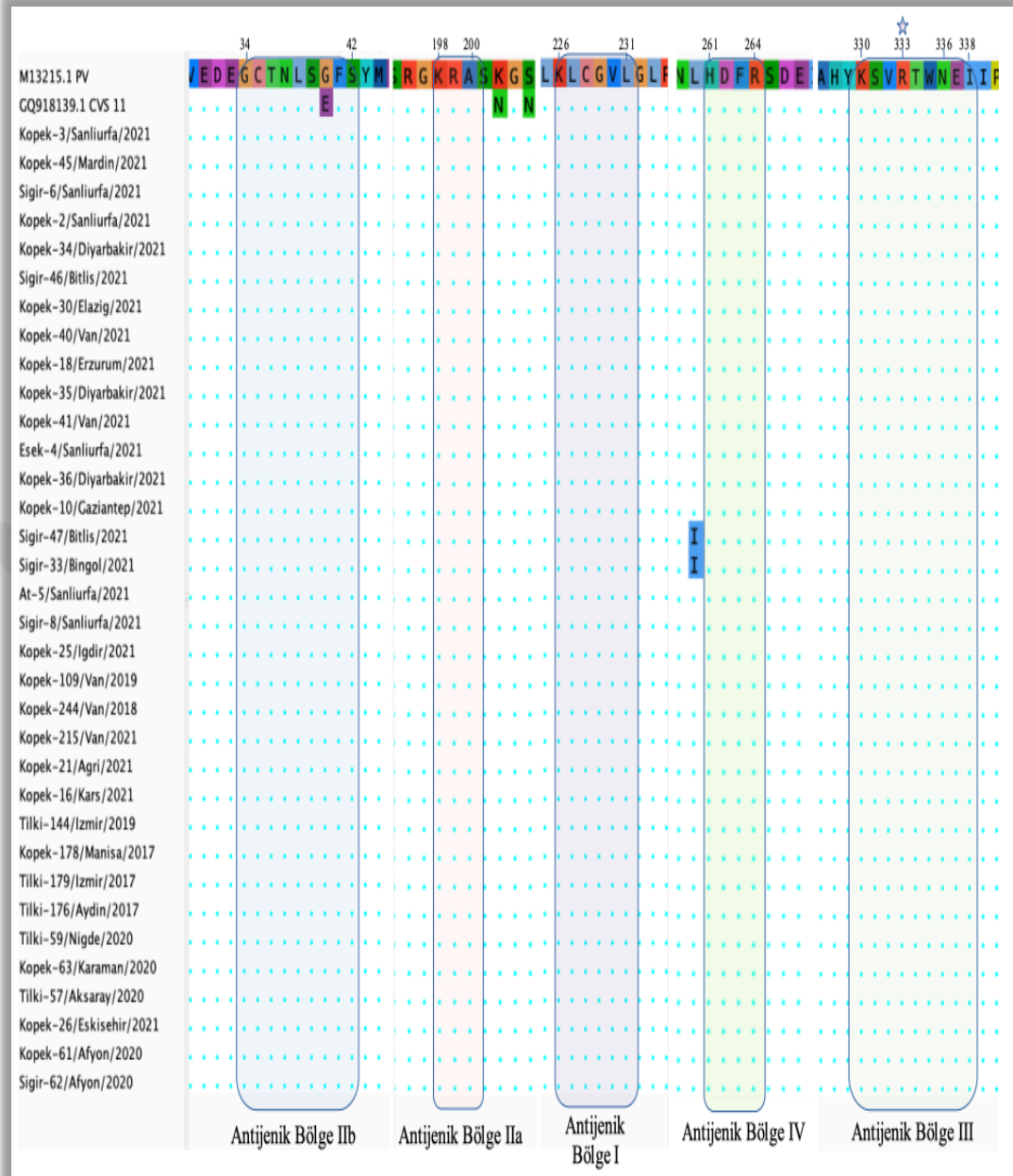
3.2.5. Dizin Analizi Sonuçları

Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgeleri 37. ve 319. aa'lerde bulunan glikozilasyon bölgeleri bakımından analiz edildi ve Asparagine (N)'in korunmuş olduğu tespit edildi (Şekil 3.24.).



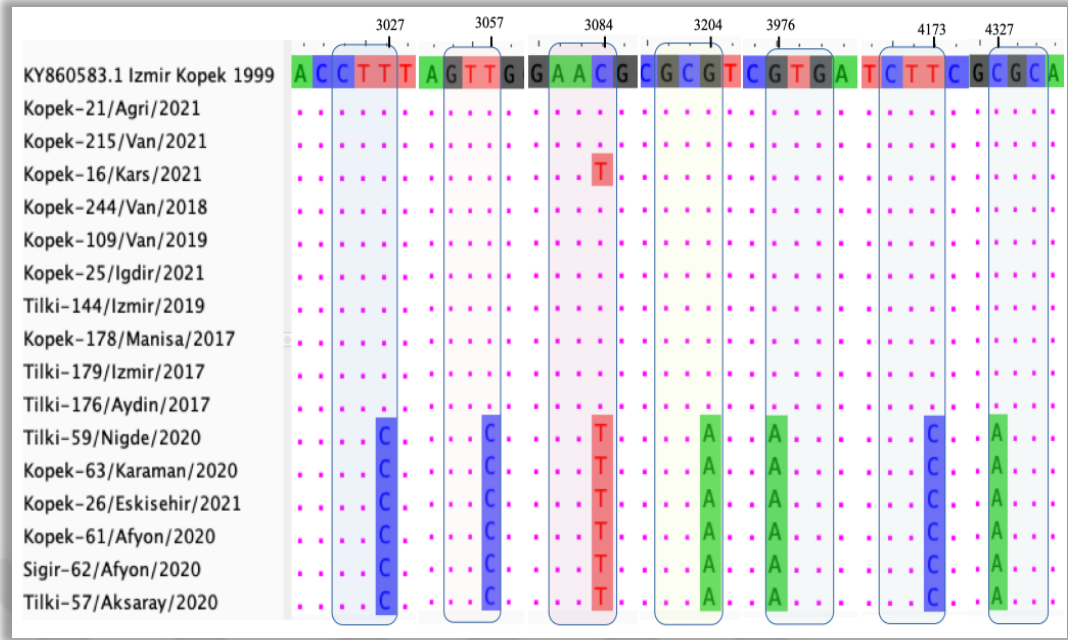
Şekil 3.24. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen glikozilasyon bölgeleri

Kuduz virusu G gen üzerinde 4 antijenik bölge bulunduğu bilinmektedir. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi üzerinde bulunan antijenik bölgelerinde herhangi bir mutasyona rastlanmadı. Kuduz viruslarının patojenitesinde önemli rol oynadığı bilinen G 333. aa'deki arginine'in (R) bu çalışmadaki saha suşlarının tamamında varlığını koruduğu gözlemlendi (Şekil 3.25.). G 333. pozisyon Şekil 3.25.'de ☆ ile gösterilmiştir.

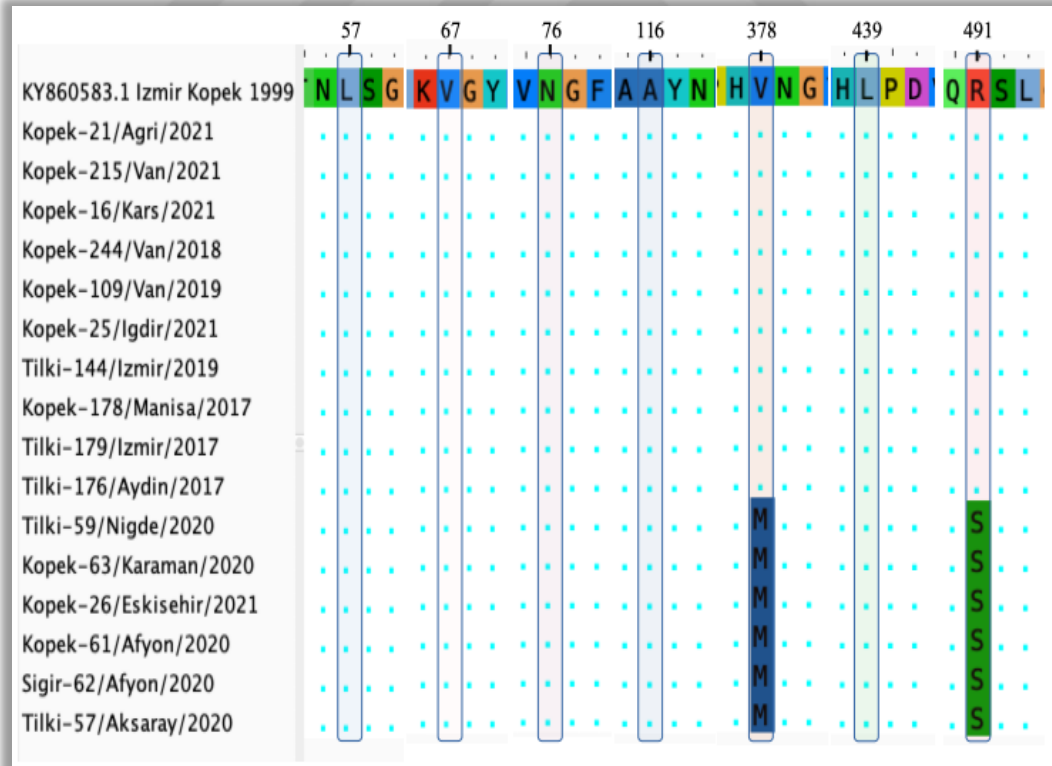


Şekil 3.25. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G gen antijenik bölge dizinleri

Antijenik bölgeler dışında bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının dizinlerinde bazı değişiklikler (SNP) görüldü. Bunlardan Marston vd. (2017) tarafından Türkiye’de saptanan bazı kuduz virusları için bildirilen ve bu çalışmanın verilerinin – tartışma bölümünde ele alınacak- moleküler epidemiyolojik değerlendirmeleri bakımından anlamlı olduğu düşünülen değişiklikler Şekil 3.26.’da ve aminoasitlerde meydana gelen değişimler Şekil 3.27’de verildi.



Şekil 3.26. G gen bölgesi ME2 alt dalında yer alan kuduz viruslarında 3027, 3057, 3084, 3204, 3976, 4173 ve 4327. nükleotitlerde gözlenen değişimler



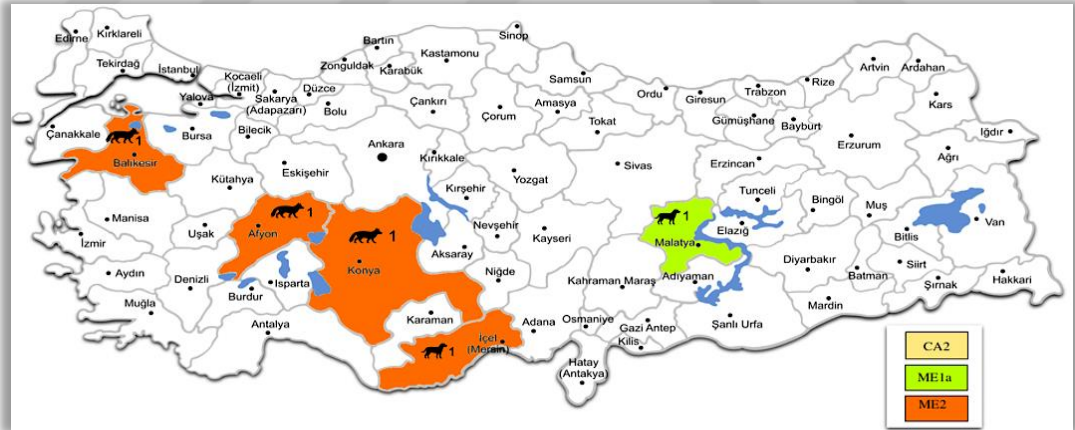
Şekil 3.27. G gen bölgesi ME2 alt dalında yer alan kuduz viruslarında 378 ve 491. aa'de görülen amino asit değişimleri

3.3. G-L İntergenik Bölge için Elde Edilen Bulgular

3.3.1. Filogenetik Analiz ve Benzerlik Oranları

GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölge dizinleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz bu çalışmadaki kuduz viruslarının (n=132) *Cosmopolitan* dalında 3 farklı alt dalda (ME1a, ME2, CA2) yer aldığını ortaya koydu (Çizelge 3.1.). G-L intergenik bölgesi için çalışılan kuduz viruslarının sayıca fazla olması sebebiyle, bu gen bölgesine ait kuduz viruslarının filogenetik ağaçları öncelikle yıllar bazında 519 bp uzunluk ile alt dalları gösterecek şekilde hazırlanmış olup (Ek-3, Ek-4, Ek-5, Ek-6, Ek-7, Ek-8), sonrasında her bir alt dal için, tüm yılları içeren filogenetik ağaçlar düzenlendi.

2016 yılına ait filogenetik ağaçta bulunan (Ek-3), bu çalışmadaki kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin benzerlik oranları; kendi aralarında % 89,76-99,03, referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla % 83,97- 85,32 ve % 82,62-85,32 olarak bulundu. Bu yıla ait kuduz viruslarının bağlı bulundukları *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımı, hayvan tür ve sayılarını ifade eden harita Şekil 3.28.'de verildi.



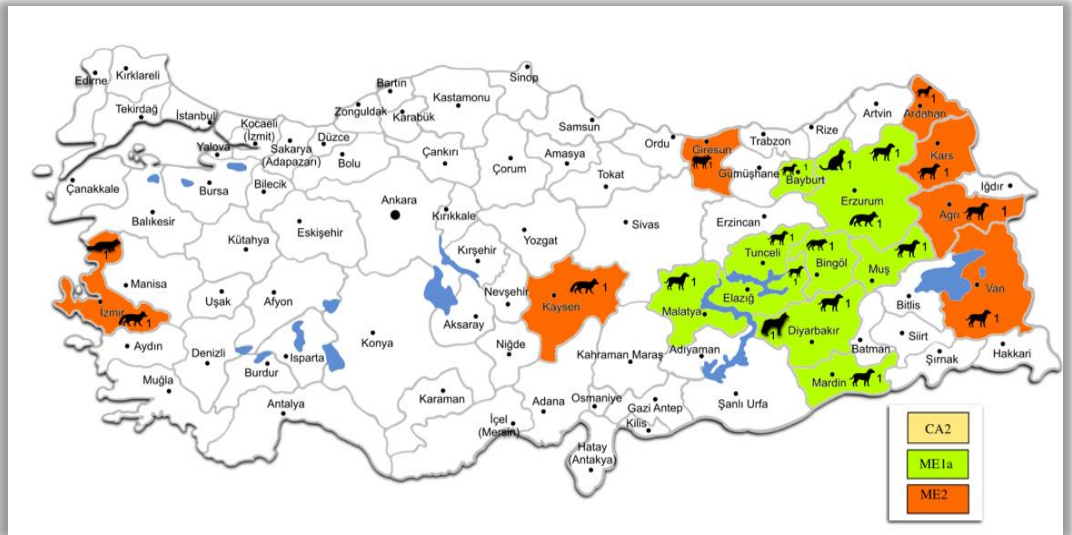
Şekil 3.28. Bu çalışmada elde edilen 2016 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita

2017 yılına ait filogenetik ağaçta bulunan (Ek-4), bu çalışmadaki kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin benzerlik oranları; kendi aralarında % 89-100, referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla % 83,78-86,29 ve % 82,62-85,52 olarak bulundu. Bu yıla ait kuduz viruslarının bağlı bulundukları *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımı, hayvan tür ve sayılarını ifade eden harita Şekil 3.29.'da verildi.



Şekil 3.29. Bu çalışmada elde edilen 2017 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita

2018 yılına ait filogenetik ağaçta bulunan (Ek-5), bu çalışmadaki kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin benzerlik oranları; kendi aralarında % 89,57-100, referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla % 83,59- 86,1 ve % 82,62- 85,13 olarak bulundu. Bu yıla ait kuduz viruslarının bağlı bulundukları *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımı, hayvan tür ve sayılarını ifade eden harita Şekil 3.30.'da verildi.



Şekil 3.30. Bu çalışmada elde edilen 2018 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita

2019 yılına ait filogenetik ağaçta bulunan (Ek-6), bu çalışmadaki kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin benzerlik oranları; kendi aralarında % 88,22-100, referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla %

83,78-86,29, %82,43- 85,32 olarak bulundu. Bu yıla ait kuduz viruslarının bağlı bulundukları *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımı, hayvan tür ve sayılarını ifade eden harita Şekil 3.31.'de verildi.



Şekil 3.31. Bu çalışmada elde edilen 2019 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenetik bölgelerinin *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita

2020 yılına ait filogenetik ağaçta bulunan (Ek-7), bu çalışmadaki kuduz viruslarının G-L intergenetik bölgelerinin benzerlik oranları; kendi aralarında % 88,99-100, referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla % 83,59-85,9, %82,08- 85,52 olarak bulundu. Bu yıla ait kuduz viruslarının bağlı bulundukları *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımı, hayvan tür ve sayılarını ifade eden harita Şekil 3.32.'de verildi.



Şekil 3.32. Bu çalışmada elde edilen 2020 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenetik bölgelerinin *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita

2021 yılına ait filogenetik ağaçta bulunan (Ek-8), bu çalışmadaki kuduz viruslarının G-L intergenetik bölgelerinin benzerlik oranları; kendi aralarında % 88,22-100, referens

suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile benzerlik oranları ise sırasıyla % 83,2-86,29, % 82,23-85,52 olarak bulundu. Bu yıla ait kuduz viruslarının bağlı bulundukları *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımı, hayvan tür ve sayılarını ifade eden harita Şekil 3.33.'de verildi.

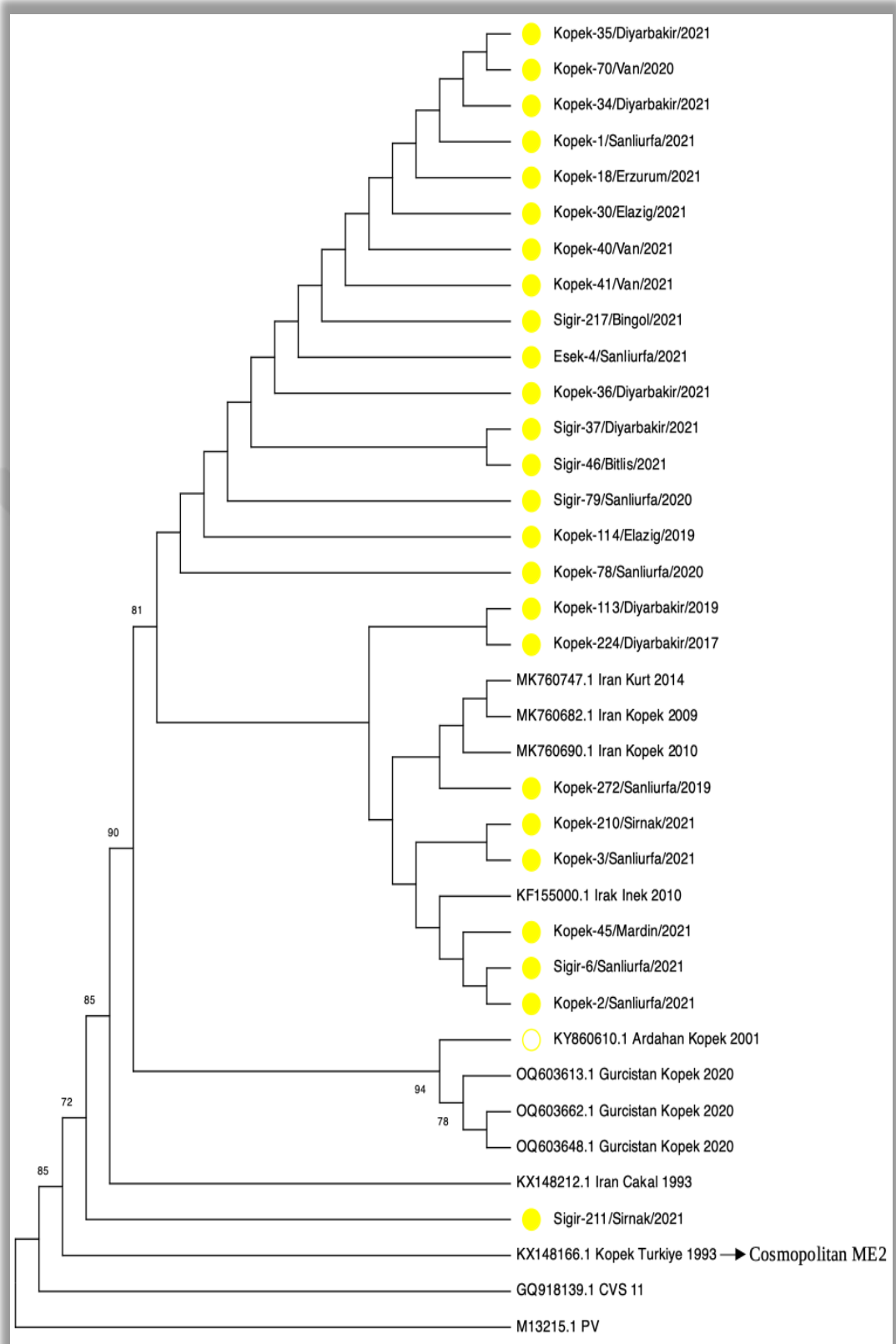


Şekil 3.33. Bu çalışmada elde edilen 2021 yılına ait kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin *Cosmopolitan* alt dalları ve illere göre dağılımını gösteren harita

Bu çalışmadaki tüm yıllara ait kuduz viruslarının her bir alt dalı için, BLAST veri tabanından yakın ilişkili diğer kuduz virusları seçilerek filogeniler oluşturuldu.

3.3.2. G-L İntergenik Bölgesi *Cosmopolitan* CA2 Alt Dalı

Cosmopolitan CA2 alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=25), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz viruslarının ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.34.'de sunuldu. Dış grup olarak referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile ME2 alt dalına ait bir örnek (KX148166.1) kullanıldı (Şekil 3.34.).



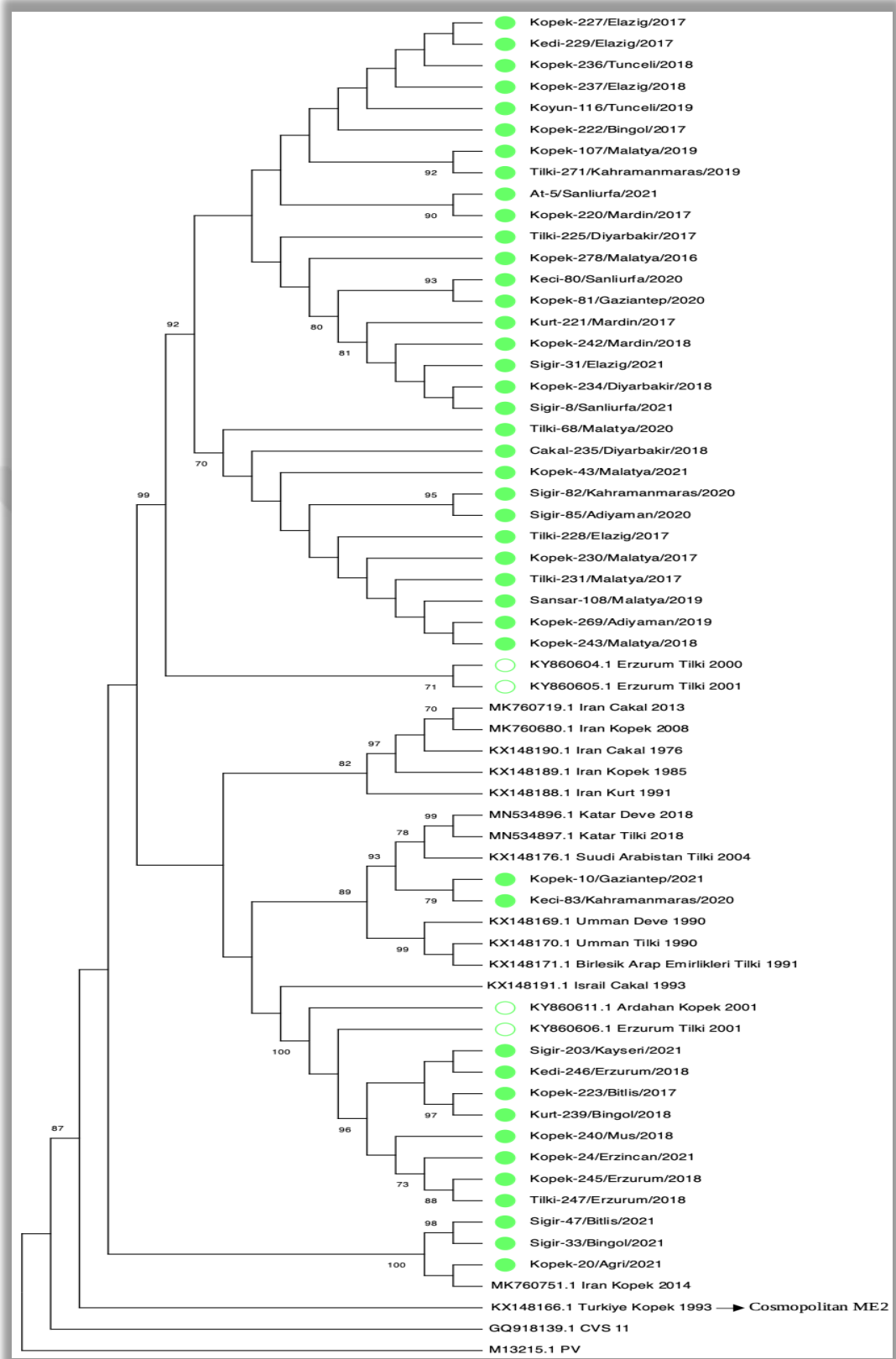
Şekil 3.34. Bu çalışmada elde edilen ve G-L intergenik bölge CA2 alt dalında yer alan tüm yıllara ait kuduz viruslarının filogenetik analizi (519bp). %70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ● ile, GenBanktan elde edilen Türkiye'ye ait bir örnek ise ○ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, K2 + G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

Cosmopolitan CA2 alt dalında yer alan kuduz virusları tek tek BLAST veri tabanına yüklenerek, başka çalışmalara ait kuduz viruslarıyla yakın ilişkili olma bakımından incelendiğinde bazı virusların (örneğin; Köpek-45/Mardin/2021, Köpek-2/Şanlıurfa/2021, Köpek-272/Şanlıurfa/2019 vd) İran (MK760747.1, MK760682.1, MK760690.1) ve Irak'tan (KF155000) bildirilen viruslar ile aynı dallarda yer aldıkları; daha önce Türkiye'den bildirilen bir virusun (KY860610.1/Ardahan/köpek/2001) Gürcistan'da bildirilen viruslar ile (OQ603613.1, OQ603662.1, OQ603648.1) ile aynı dalda yer aldığı görüldü. Ayrıca filogenetik ağaçta bu çalışma viruslarının yıl ve bazı coğrafik lokasyonlar (iller) ile ilişkilendirilebilecek yerleşimleri olduğu görüldü. Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerle saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla % 86,87-100 (Şekil 3.35.), % 94,01-97,49 ve % 93,82-99,8 olarak bulundu (Şekil 3.35.).

3.3.3. G-L İntergenik Bölgesi *Cosmopolitan* ME1a Alt Dalı

Cosmopolitan ME1a alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=44), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz viruslarının ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.36.'da sunuldu. Dış grup olarak referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile ME2 alt dalına ait bir örnek (KX148166.1) kullanıldı (Şekil 3.36.).

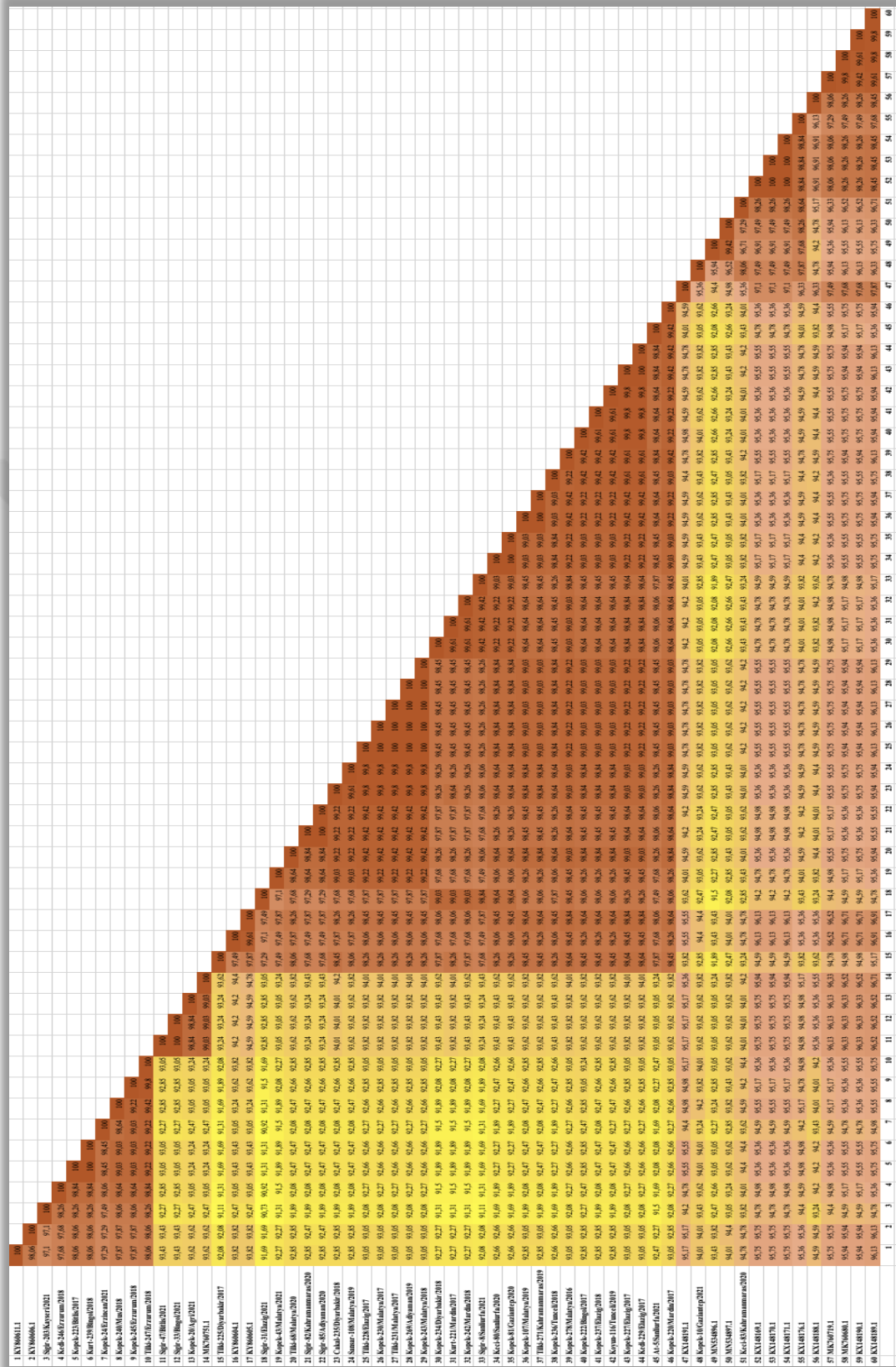




Şekil 3.36. Bu çalışmada elde edilen ve G-L intergenik bölge ME1a alt dalında yer alan tüm yıllara ait kuduz viruslarının filogenetik analizi (519bp). %70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu çalışmada kullanılan örnekler ● ile, GenBanktan elde edilen Türkiye'ye ait bir örnek ise ○ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, K2 + G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

Cosmopolitan ME1a alt dalında yer alan kuduz virusları tek tek BLAST veri tabanına yüklenerek, başka çalışmalara ait kuduz viruslarıyla yakın ilişkili olma bakımından incelendiğinde Suudi Arabistan (KX148176.1, KX148175.1, KX148174.1) ve İran'a (KX148189.1, MK760691.1, MK760680.1) ait kuduz viruslarıyla yakın olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte Türkiye'ye ait örneklerinin bir kısmının kendi aralarında farklı bir dalda toplandığı tespit edildi (Şekil 3.36.) Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla % 90,73-100 (Şekil 3.37.), % 91,69-98,84 ve % 91,5- 99,03 olarak bulundu (Şekil 3.37.).



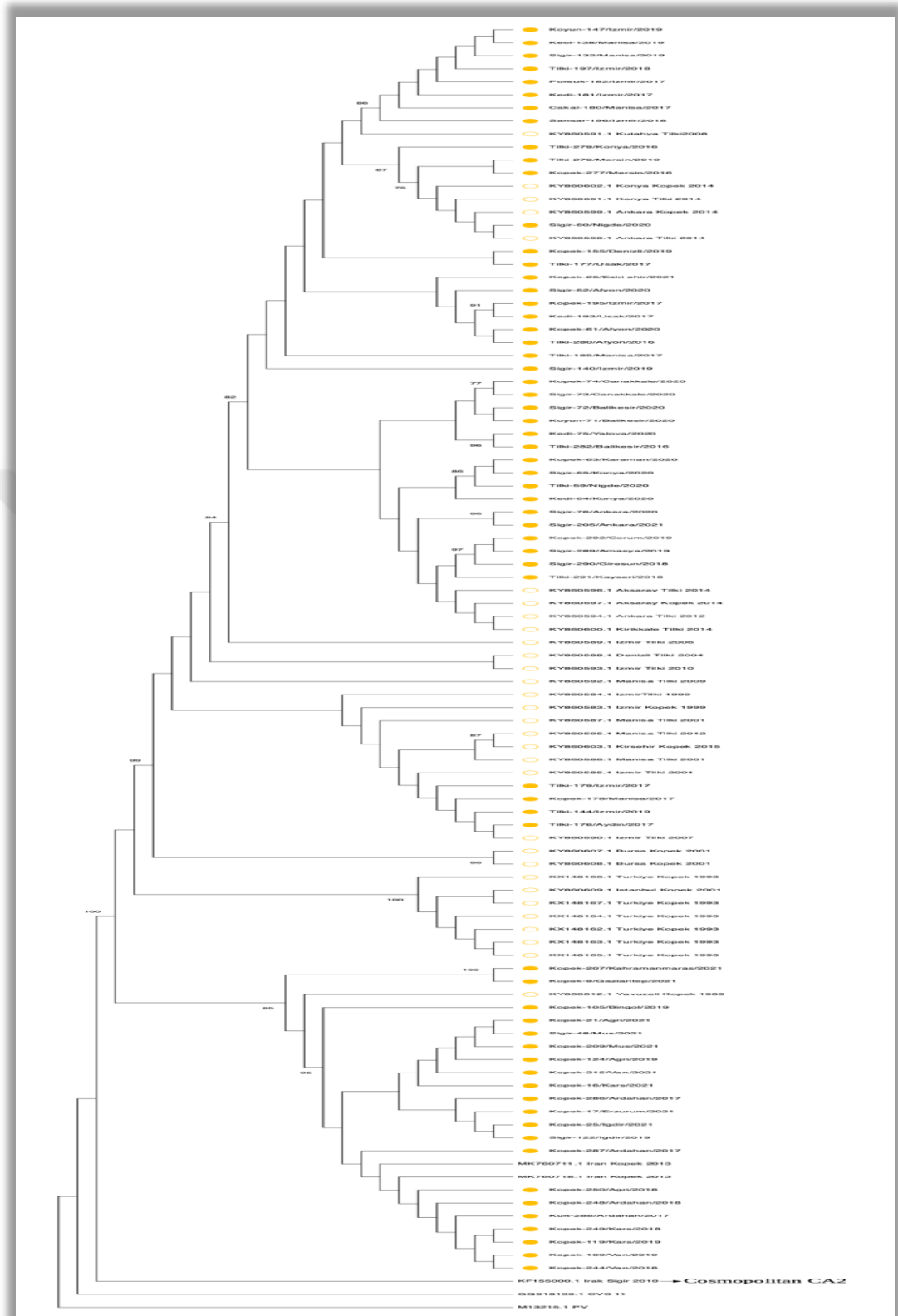


Şekil 3.37. G-L intergenik bölge MEIa alt dalında bulunan, bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının Türkiye ve diğer ülkelerde saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları (%)

3.3.4. G-L İntergenik Bölgesi *Cosmopolitan* ME2 Alt Dalı

Cosmopolitan ME2 alt dalında yer alan kuduz viruslarının (n=63), Türkiye ve diğer ülkelere ait kuduz viruslarının ilgili dizinleri kullanılarak hazırlanan filogenetik ağaç Şekil 3.38.'de sunuldu. Dış grup olarak referens suşlardan CVS-11 (GQ918139.1) ve PV (M13215.1) ile CA2 alt dalına ait bir örnek (KF155000.1) kullanıldı (Şekil 3.38.).





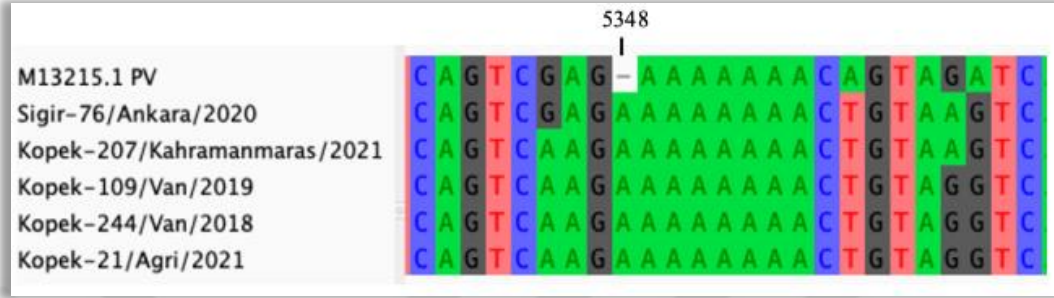
Şekil 3.38. Bu çalışmada elde edilen ve G-L intergenik bölge ME2 alt dalında yer alan tüm yıllara ait kuduz viruslarının filogenetik analizi (519bp). Bu çalışmada kullanılan örnekler ● ile, GenBank'tan elde edilen Türkiye'ye ait bir örnek ise ○ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, K2 + I modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

Cosmopolitan ME2 alt dalında yer alan kuduz virusları tek tek BLAST veri tabanına yüklenerek, başka çalışmalara ait kuduz viruslarıyla yakın ilişkili olma bakımından incelendi. Ülkenin orta ve batı bölgesi ile Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde sirküle olan kuduz viruslarının birbirinden ayrıldığı, orta ve batı bölgelerdekilerin kendi içinde ayrı bir grup oluşturduğu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesindeki virusların ise İran'la (MK760711.1, MK760718.1) daha yakın ilişkili olduğu görüldü (Şekil 3.38.). Söz konusu çalışma viruslarının kendi aralarında, Türkiye ve diğer ülkelerle saptanan kuduz virusları ile nükleotit düzeyinde benzerlik oranları sırasıyla % 93,82-100 (Şekil 3.39.), % 94,4-99,8, %94,98-100 olarak bulundu (Şekil 3.39.).



3.3.5. Dizin Analizi Sonuçları

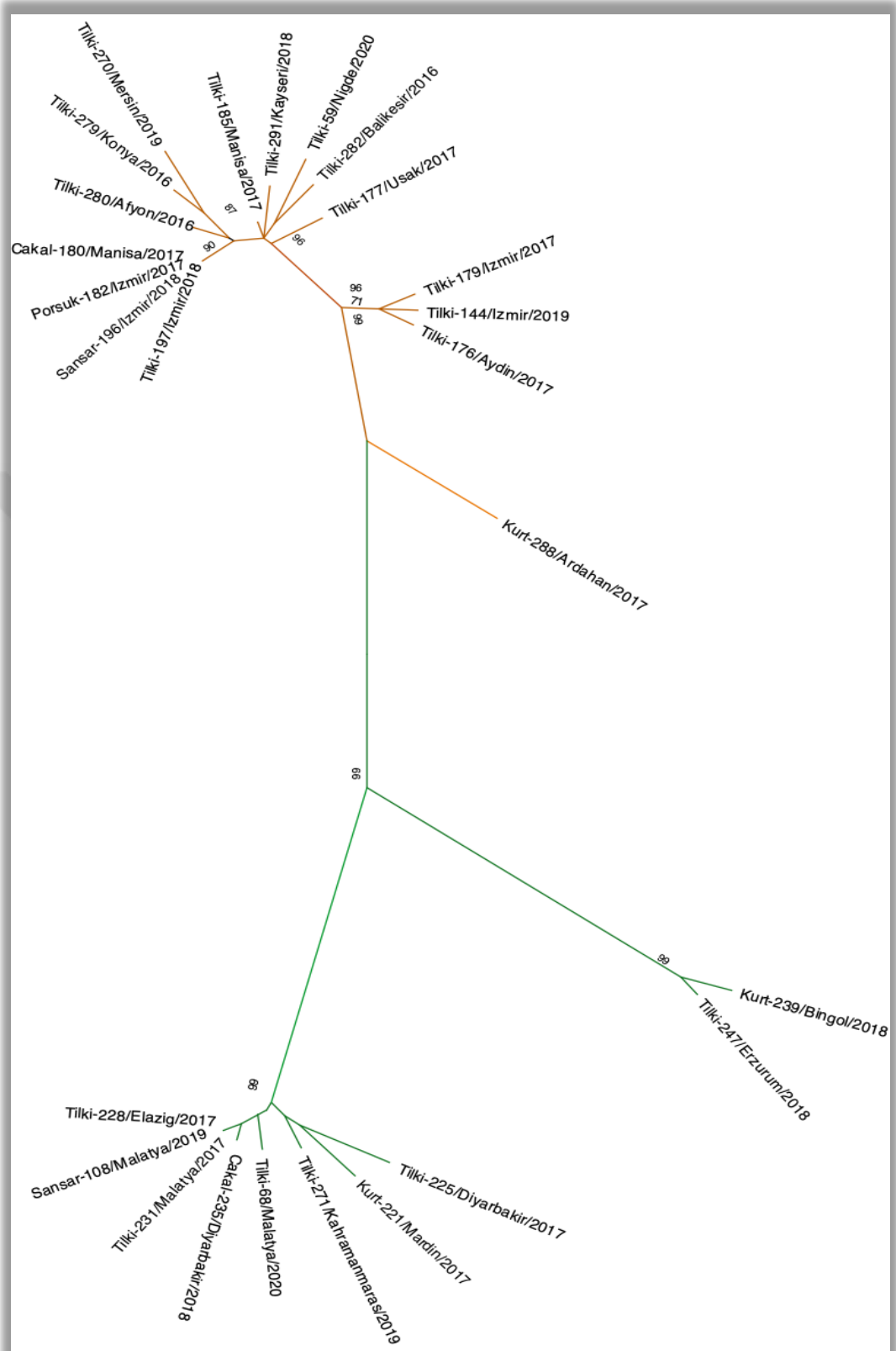
Bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerine ilişkin dizin analiz verileri incelendiğinde bazı virusların 5348. nükleotitinde Adenin (A) insersiyonu olduğu görüldü (Şekil 3.40.)



Şekil 3.40. Bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının G-L intergenik bölgesinde tespit edilen insersiyon

3.4. Yaban Yaşamdaki Hayvanlara İlgili Veriler

Bu çalışmada toplam 27 adet yaban yaşamdaki hayvana ait (19 tilki, 2 çakal, 2 sansar, 3 kurt ve 1 porsuk) kuduz virusunun identifikasyonu yapılmış ve viruslar ME2 ve ME1a alt dallarında identifiye edilmiştir (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2.). Bu viruslardan birisi hariç (Tilki-57/Aksaray/2020) diğerlerinin (n=26) G-L intergenik bölgelerine ait dizinleri bulunmakta olup bu dizinlerin filogenetik analizi (Şekil 3.41.), ülkemizin batısından (Ege ve Orta Anadolu) elde edilen vahşi yaşama ait kuduz viruslarının ME2 alt dalında ve diğer bölgelerden (Doğu ve Güneydoğu Anadolu) elde edilen virusların, Kurt/288/Ardahan/2017 hariç, ME1a alt dalında yer aldıklarını gösterdi.



Şekil 3.41. Vahşi yaşamdan elde edilen kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerine ilişkin filogenetik analizi (519bp). %70 ve üzeri değerler gösterildi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, K2+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçtaki yeşil dallar ME1a alt dalını, turuncu dallar ise ME2 alt dalını temsil etmektedir

4. TARTIŞMA

Epidemiyolojik çalışmalarda doğru sonuçlara ulaşabilmek için virus izolatlarının ayırımında doğru gen bölgelerinin seçimi önem arz etmektedir (Sacramento vd., 1991). Genom bölgelerinin korunaklılık durumları çalışmalarda bir kriter olarak göz önüne alınabilirken, fonksiyonel özellikleri de doğru bölgenin seçimi için önemlidir. Yapılan çalışmalarda korunaklı bölgelerin etken teşhisinde ve uzak ilişkili virusların ayırımında; değişken bölgelerin ise yakın ilişkili virusların ayırımında ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmasının daha anlamlı olacağı belirtilmiştir (Bourhy vd., 1993; Sacramento vd., 1992; Sacramento vd., 1991; Tordo vd., 1993).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada incelenecek gen bölgeleri seçilirken, ülkemizde moleküler epidemiyolojik durumun izlenmesi için daha önce bildirilen sınırlı sayıdaki çalışmada kuduz virus genomunun N gen bölgesi verilerinin değerlendirildiği ve bu çalışmaların en son 2015 yılına ait kuduz viruslarını içerdiği göz önüne alınmış olup; uzun vadede bir değişim olup olmadığını değerlendirmeye olanak sağlaması ve immun yanıtta görev alıyor olması sebebiyle N gen bölgesi; N gen bölgesine göre daha değişken bir bölge olması ve nispeten daha yakın tarihli değişimleri gösterebilecek olması, ayrıca nötralizan antikorların ana hedefi olması dolayısıyla G gen bölgesi ve kodlanmayan, genomun en değişken bölgesi olması sebebiyle olası daha yakın dönem değişimler hakkında bilgi verebileceği ve yakın ilişkili kuduz viruslarının ayırımında kullanılabileceği göz önünde bulundurularak G-L intergenik bölgesi tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak kuduz viruslarının elde edileceği hayvan türü seçiminde ise vahşi yaşama ait hayvan türleri ile köpeklere öncelik verilmiş olup, farklı tür ve coğrafya bilgisi bulunan hayvanlardan elde edilen kuduz virusları seçilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler 40 farklı il ve 12 farklı hayvan türünden toplamda 135 farklı kuduz virusunun (en az 1 gen bölgesi çalışılmıştır) moleküler identifikasyonunu sunmaktadır.

Lyssavirusların genom uzunlukları ve nükleotit dizinleri arasında farklılıklar olmakla beraber, farklı gen bölgeleriyle yapılan çalışmaların benzer ağaç topolojilerini verdiği ortaya koyulmuştur (Bourhy vd., 2008; Johnson vd., 2002; Tordo vd., 1993; Wu vd., 2007).

Bu çalışma sırasında elde edilen ön verilerin değerlendirilmesi sonucunda, 2 ya da 3 gen bölgesi dizini kullanılarak yapılan filogenetik analizlerin aynı alt dal identifikasyonunu ortaya koyması da göz önüne alınarak, süreç ağırlıklı olarak G-L intergenik bölgesinin çalışılması yönünde sürdürülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada 21 kuduz virusu için hedeflenen 3 gen bölgesi dizini, 11 kuduz virusu için G-L ve G gen bölgesi dizini, 4 kuduz virusu için G-L ve N gen bölgesi dizini, 3 kuduz virusu için de N ve G gen bölgesi için ortak veri elde edilmiş olup (Çizelge 3.1.), her bir gen bölgesi için hazırlanan filogenetik ağaçlar (Şekil 3.2., Şekil 3.15., Ek-3, Ek-4, Ek-5, Ek-6, Ek-7, Ek-8) , her bir virusun aynı alt dallarda tanımlandığını ortaya koymuştur.

Gen bölgelerinin korunaklı olma durumuna bakıldığında literatür bilgisinde bu 3 bölge için en korunaklı N gen, sonrasında G gen, en az korunaklı bölge ise G-L intergenik bölge olarak bildirilmektedir (Sacramento vd., 1992; Wu vd., 2007). Bu çalışmada ortak olan 21 kuduz virusunun N, G gen bölgeleri ve G-L intergenik bölgeleri için nükleotit benzerlik oranları sırasıyla % 93,39-100 (Şekil 3.3.), % 92,13-100 (Şekil 3.16.) ve % 88,99-100 (Ek-9) olarak belirlenmiş olup literatür verilere benzer şekilde gen bölgelerinin korunaklılık durumu N gen bölgesi, G gen bölgesi ve G-L intergenik bölgesi şeklinde sıralanmıştır. Kodlanmayan G-L intergenik bölgesi değişikliklere duyarlılığı ile bilinmektedir (Meng vd., 2007) ve bu yüzden yakın tarihli olası değişikliklerin takibi için önerilmektedir (Szanto vd., 2011). Bununla birlikte söz konusu bölge dizinleri, N ve G gen bölgesi dizinleri kullanılarak yapılan filogenetik analizlere benzer şekilde, *Cosmopolitan* dalı/alt dalı identifikasyonu için amaca (Çizelge 3.1.) uygun bulunmuştur.

Lyssavirusların N gen bölgesinde 4 antijenik bölge tanımlanmıştır. Bu antijenik bölgelerden antijenik bölge I tüm kuduz virus suşlarında korunmuş durumdayken, antijenik bölge IV'ün değişkenlik gösterebildiği belirtilmiştir (He vd., 2006; Rahmahani vd., 2019). Bu çalışmada da dizinlenen kuduz viruslarının antijenik bölge I'inde herhangi bir mutasyona rastlanmazken, 3 kuduz virusunda antijenik bölge IV'te amino asit değişimleri tespit edilmiştir (Şekil 3.12.). Bunlar Sigir-37/Diyarbakir/2021 olarak adlandırılan kuduz virusunda 379. aa'de Valine'den Methionine'e; Sigir-47/Bitlis/2021 ile Sigir-22/Agri/2021 olarak adlandırılan kuduz viruslarında 382. aa'de Alanine'den Glutamic acid'e olan değişimlerdir. Sigir-37/Diyarbakir/2021 CA2 alt dalında yer alırken, Sigir-47/Bitlis/2021 ile Sigir-22/Agri/2021'in ME1a alt dalında yer aldıkları görülmüştür. ME1a alt dalında yer alan söz konusu virusların filogenetik ağaçtaki yerleşimleri (Şekil 3.6.) ve benzerlik oranları (Şekil 3.7.) örneklenen tür ve illerin komşuluk ilişkisi dikkat çekicidir.

Virusun transkripsiyon ve replikasyonunda çok önemli rol oynadığı bilinen (Yang vd., 1999) ve N gen 389. amino asitinde yer alan fosforilasyon bölgesindeki serine (S)'in çalışmadaki tüm numunelerde varlığını koruduğu tespit edilmiştir.

Kuduz viruslarının en önemli antijenik bölgelerinin G gen bölgesi üzerindeki ektodomain'de (Antijenik bölge I: 226-231.aa; Antijenik bölge II: 34-42.aa ve 198-200. aa; Antijenik bölge III: 330-338.aa; Antijenik bölge IV: 261-264.aa; Antijenik bölge a: 342-343.aa) yer aldığı bildirilmiştir (Badrane vd., 2001; Lafon vd., 1983). Bu çalışmada identifiye edilen kuduz viruslarının G gen bölgesi amino asit dizinleri ektomodain üzerinde bulunan antijenik bölgeler bakımından incelendiğinde herhangi bir değişim görülmemiştir. (Şekil 3.25.). Ayrıca patojenitede önemli rol oynadığı bilinen 333.aa'te arginine'in (R) varlığının korunduğu (Şekil 3.25.); virusun nöronlara bağlanması ve motonöronlarda çoğalmasında rol oynadığı bilinen 330. aa'deki lysine (K)'in mevcudiyetinin de devam ettiği görülmüştür (Şekil 3.25.). Tüm bu bilgiler ülkemizde sirküle olan kuduz viruslarının hala patojen karakterlerini koruduğunu ortaya koymuştur.

Kuduz viruslarının G gen bölgeleri üzerinde bulunan ve virusun hücreye girişinde, hücreden hücreye yayılmasında, replikasyon, enfeksiyon, patogeneze ve immün yanıttan kaçış gibi virusun devamlılığını sürdürebilmesi için önemli fonksiyonlarda etkisi olan (Vigerust ve Shepherd, 2007) ve çoğu saha suşunda korunmuş olduğu bilinen 37. ve 319. aa glikozilasyon bölgeleri incelendiğinde bu çalışmadaki saha suşlarında da söz konusu bölgelerin korunduğu (Şekil 3.24.) görülmektedir. 319. aa'te meydana gelecek bir mutasyonun doğru katlanmanın önüne geçeceği bilgisi de göz önüne alınırsa, korunur durumda olması beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Cai vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada 261. aa'de histidine (H), 262. aa'de aspartic asit (D), 263. aa'te feninalenin (F) ve 264. aa'te arginine (R) olduğunu belirtmişlerdir. Bu bölgelerin filogrup I'de oldukça korunaklı olduğu tespit edilmiştir (Dietzschold vd., 1990). Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının Cai vd. (2010) tarafından belirtilen amino asit bölgeleri incelendiğinde literatür bilgisiyle paralel sonuç verdiği, söz konusu bölgelerde herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Yapılan filogenetik analizler çalışmada kullanılan kuduz viruslarının tümünün *Cosmopolitan* dalında 3 farklı alt dalda yer aldığını ortaya koymuştur. Bunlar: Middle East 1a (ME1a), Middle East 2 (ME2) ve Central Asia 2 (CA2) alt dallarıdır. Bu alt dalların dağılımı incelendiğinde, ME2 alt dalının Batı Anadolu, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu'da; ME1a alt dalının İç Anadolu, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu'da, CA2 alt

dalının ise Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu’da sirküle olduğu görülmektedir. Alt dalların dağılımı örneklerin sağlandığı iller/bölgeler ve yıllar itibarıyla değerlendirildiğinde, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde 3 alt dalında da ilerleyen yıllarda daha fazla ile sirayet etme eğilimi gösterdiği, bu noktada özellikle CA2 alt dalının dominant olduğu kanaatine varılmıştır (Çizelge 3.1., Şekil 3.1, Şekil 3.14., Şekil 3.28., Şekil 3.29., Şekil 3.30., Şekil 3.31., Şekil 3.32., Şekil 3.33.). Bununla birlikte bu çalışmada kullanılan tanı materyallerinden elde edilen kuduz viruslarının bölgeye ait kuduz viruslarının sınırlı bir kısmını temsil ettiği, yıllar ve iller itibarıyla kullanılan kuduz virusu sayısının sınırlı sayıda olduğunu ifade etmekte yarar vardır.

Eski yıllara ait Türkiye’deki kuduz viruslarını içeren genetik analize ilişkin çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte, Johnson vd. (2003)’nin yaptığı çalışmada Ardahan’daki bir köpekten saptanan bir adet kuduz virusunun (AY091619.1) daha önce Türkiye’de bildirilenlerden farklılık gösterdiği ve Kuzeydoğu/Kafkas olarak nitelendirildiği belirtilmektedir. Söz konusu virusa ait dizinlerin bu çalışmadaki virusların dizinleri ile filogenetik analizinde CA2 alt dalında yer aldığı tespit edilmiştir. 2016-2021 yılları arasındaki kuduz viruslarını içeren bu çalışmada CA2 alt dalının Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yaygınlığı ve yıldan yıla artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.28., Şekil 3.53., Şekil 3.30., Şekil 3.31., Şekil 3.32., Şekil 3.33.). Bunun sebebi CA2 alt dalının sonraki yıllarda Ardahan’dan ya da yakın bir mihraktan diğer şehirlere yayılmış olması olabileceği gibi, önceki yıllarda çalışılan numune sayılarının az olmasından da kaynaklanabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Nitekim Horton vd. (2015) yaklaşık 75 yıl kadar önce bu alt dalın İran veya Türkiye’deki bir atadan köken alarak Kafkasya ve Orta Doğu’ya yayıldığını bildirmişlerdir. Bu alt dalın halen komşu ülkelerden İran (Dellicour vd., 2019), Irak (Kuzmina vd., 2013; Marston vd., 2013) ve Gürcistan’dan (Condori vd., 2023; Huaman vd., 2023) bildirilen kuduz vakalarından sorumlu olması ve bu çalışmada saptanan CA2 alt dalındaki virusların söz konusu ülkelerden elde edilen kuduz viruslarından bazıları ile filogenetik ağaçlardaki yerleşimi (Şekil 3.4., Şekil 3.17., Şekil 3.34.) ve benzerlik oranları (Şekil 3.5., Şekil 3.18., Şekil 3.35.) dikkat çekicidir. Bir diğer önemli konu CA2 alt dalının daha önce de bildirilmemiş olduğuna benzer bir şekilde, bu çalışmada ülkemizin batı kesimlerinde saptanmamış olmasıdır.

1987 yılından bir tilkiye ait KU888640.1 accession numaralı kuduz virusu NCBI ve BLAST veri tabanlarından ulaşılabilen Türkiye’den elde edilen en eski kuduz viruslarından biri olarak karşımıza çıkmıştır. Yalnızca G gen bölgesi verisi bulunan bu kuduz virusu, bu çalışmada G gen bölgesi verisi bulunan kuduz virusları ile dizinlenmiş ve ME1a alt dalında

yer aldığı görülmüştür. Bu da ME1a alt dalının eski yıllardan beri ülkemizde sirküle olduğunu göstermekle birlikte, ilgili çalışmada (De Benedictis vd., 2016) elde edilen numunenin hangi ilden sağlandığına dair bilgiye yer verilmemiştir. Bu çalışmada elde edilen verilerle ME1a alt dalının ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu kesimlerinde yaygın olduğu tespit edilmiştir. İç Anadolu’da Sigir-203/Kayseri/2021 olarak adlandırılan kuduz virusu ME1a alt dalına ait olarak bulunmuş olup diğer bölgelerde ME1a alt dalına rastlanmamıştır. Bu durum bugüne kadar çalışılan numune sayısının kısıtlı olmasına bağlı olarak ME1a alt dalının varlığının tespit edilememiş olması olasılığını dışlamaksızın, bugüne kadar ME1a alt dalının ülkenin doğu kesimlerinde varlığını sürdürmüş olduğu ve yakın yıllarda (2021 ya da hemen öncesinde) iç bölgelere geçiş yaptığına dair bir işaret olarak yorumlanabilir. Yine Horton vd. (2015)’nin yaptığı çalışmada ME1a alt dalının yaklaşık 80 yıl önce Türkiye veya İran’dan köken aldığı ve yapılan analizlerde ağırlıklı olarak yaban yaşama ait numunelerin bu alt dalda bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadaki yaban yaşamdan elde edilen veriler her ne kadar ayrı başlık altında değerlendirilmiş olsa da ME1a alt dalı için kısaca bir değerlendirme yapmak adına; ülkenin doğu kesiminde yaban yaşama ait kuduz viruslarının ME1a alt dalında yer aldığı görülmektedir. BLAST veri tabanından yapılan karşılaştırmalarda, bu virusların nükleik asit dizinlerinin özellikle İran’dan elde edilen kuduz virusları (KX148189.1, KX148188.1, JX987748.1, MK760669.1, MK760747.1) ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Geçmişten günümüze ülkemizde sirküle olan kuduz viruslarına ilişkin epidemiyolojik çalışmalara bakıldığında, Türkiye’ye ait kuduz viruslarına ilişkin ilk filogenetik analizin Bourhy vd. (1999)’nin çalışmasında karşımıza çıktığı görülmektedir. 1992 ve 1993 yıllarında iki köpekten elde edilen bu kuduz viruslarının (U43014.1 ve U43015.1) her ikisi de ME2 alt dalında yer almıştır (Bourhy vd., 1999). Yine N gen bölgesi bulunan ve ulaşılan en eski kuduz viruslarından olan KY860612 accession numaralı 1989 yılında Yavuzeli’nden bir köpekten izole edilen kuduz virusunun ME2 alt dalında yer aldığı görülmektedir. GenBank’tan ulaşılabilen en eski örneklerin de ME2 alt dalında yer alıyor olmasından hareketle, ME2 alt dalının eski yıllardan beri ülkemizde sirküle olduğu ve günümüzde hemen hemen her bölgede bulunduğu tespit edilmiştir. ME2 alt dalı ülkemizin tüm bölgelerine yayılmış olmakla birlikte, batı kesimlerde yalnızca ME2 alt dalının yer aldığı görülmektedir. ME2 alt dalının daha önceki çalışmalarda (Horton vd., 2015; Johnson vd., 2006) da belirtildiği üzere ülke içerisinde diğer alt dallara göre daha izole bir şekilde sirküle olduğu gözlenmiştir. Filogenetik ağaçlara bakıldığında (Şekil 3.8., Şekil 3.21., Şekil 3.38.) ülkemizin batısındaki ve doğusundaki örnekler aynı alt dalda yer alsalar da birbirlerinden ayrı alt gruplara ayrılmaktadırlar.

Türkiye’de uzun yıllar boyunca kuduzun temel vektörü köpekler olmuştur. 1999 yılında Ege bölgesinde artmaya başlayan tilki vakalarıyla birlikte ülkedeki kuduz seyrine yeni bir boyut eklenmiş ve yaban yaşam kuduzu gündeme alınmıştır. Marston vd. (2017) 1999-2014 yılında köpek ve tilkilerden saptanmış olan kuduz viruslarını değerlendirdiği bir çalışmada köpeklerden tilkilere başarılı bir konakçı aktarımı gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. Söz konusu araştırmada değerlendirilen viruslar (ME2 alt dal) konakçı değişimi sonrasındaki erken dönem (1999-2007 yılı Ege bölgesinde saptanan viruslar) ve geç dönem (2008-2015 yılı, orta Anadolu bölgesinde saptanan viruslar) virusları olarak değerlendirilmiş olup erken dönem virusların da 2 farklı alt dalda yer aldığı bildirilmiştir. I. dalda yer alan viruslarda toplam nükleotit sayısı 11.923 iken, II. dalda yer alan viruslarda toplam nükleotit sayısı 11924-5 olarak bildirilmiştir. Bu farkın II. dalda bulunan viruslarda M-G intergenik bölgesindeki (3193. pozisyonda) ekstra baz varlığından (A) kaynaklandığı ortaya koyulmuştur (11924 nükleotit ile sonuçlanmaktadır). Ayrıca II. daldaki bazı viruslarda G-L intergenik bölgesinde 5348. pozisyonundaki ekstra baz (A) varlığından da söz edilmektedir. Bu çalışmada identifiye edilen ME2 kuduz virusları konakçı değişimi olmadan önceki bir kuduz virusu ile (KY860583.1) Marston vd. (2017)’nin belirttiği değişiklikler bakımından incelenmiştir (Şekil 3.13., Şekil 3.26.).

Tilki-57/Aksaray/2020, Tilki-59/Nigde/2020, Kopek-61/Afyon/2020, Kopek-63/Karaman/2020 olarak adlandırılan kuduz viruslarının N gen bölgelerinde, II. dalda tanımlanan viruslarda bildirilen nukleotit değişimlerinin (Şekil 3.13.); söz konusu viruslar yanı sıra Kopek-26/Eskisehir/2021 ve Sigir-62/Afyon/2020 olarak adlandırılan kuduz viruslarının G gen bölgelerinde de Marston vd. (2017)’nin belirttiği nükleotit ve amino asit değişimlerinin (Şekil3.26. ve 3.27.) olduğu görülmüştür. Kopek-16/Kars/2021’de yalnızca 3084. nükleotitinde bir değişim görülmüş olup, bu durumun spontan bir mutasyona işaret ettiği değerlendirilmiştir. Bu bilgiler ışığında, 1999 yılında gerçekleşen konakçı aktarımı sonrası döneme ait II. daldaki virusların ülkemizde halen sirkülasyonda olduğu, sığır, köpek, tilki gibi farklı hayvan türlerinde bulunduğu ve bu virusların Marston vd. (2017)’nin çalışmasında bildirilen II. daldaki viruslara benzer şekilde Orta Anadolu Bölgesindeki konakçılardan saptanan kuduz virusları olduğu görülmüştür. Bu verilerin ilerleyen yıllar için filojeografik takip yönünden önemli olabileceği düşünülmektedir.

Yine aynı çalışmada (Marston vd., 2017) bazı kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinde 5348. pozisyonundaki ekstra baz (A) varlığı olabileceğini belirtmiştir. Bu pozisyonundaki ekstra bazın bir anlam ifade etmediği, bölgenin değişkenliğinden kaynaklandığı ve total genom uzunluğunu etkilediği belirtilmektedir. Bu çalışmada G-L intergenik bölgeleri

incelendiğinde 5348. pozisyonunda bahsi geçen 8. Alanine (A)'in varlığı Sigir-76/Ankara/2020, Kopek-207/Kahramanmaraş/2021, Kopek-109/Van/2019, Kopek-244/Van/2018, Kopek-21/Agri/2021 olarak adlandırılan kuduz viruslarında tespit edilmiştir (Şekil 3.40.). Bu kuduz viruslarının tamamı söz konusu çalışmadaki (Marston vd., 2017) viruslar ile aynı alt dalda (ME2) yer almaktadır.

Aşılama kampanyalarındaki başarılarla rağmen, Orta Anadolu bölgesinde farklı türlerde hastalığın varlığı ortaya koyulmaktadır (Çizelge 3.1.). Bu noktada özellikle tilkiler olmak üzere (Tilki-57/Aksaray/2020, Tilki-59/Niğde/2020, Tilki-279/Konya/2016, Tilki-280/Afyon/2016, Tilki-291/Kayseri/2018) vahşi yaşam hayvanlarının bir risk oluşturma potansiyeli olduğu dikkat çekicidir. Nitekim Tarım ve Orman Bakanlığı önceki oral aşılama kampanyalarında söz konusu bölge aşılama bölgesine dahil olduğu halde, köprü aşılama kampanyasında da bölgenin gözardı edilmediği görülmektedir (Aylan, 2023). Bununla birlikte 2023 yılı aşılama alanı verileri değerlendirildiğinde Orta Anadolu ile Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesi dikey bir hat halinde ayrılıyor olduğu görülmektedir. Bu çalışma verileri her ne kadar 2016-2021 yılı verilerini içeriyor ise de özellikle 2020-2021 yılı tanı materyallerinde saptanan virusların ait olduğu iller (Ankara, Afyon, Konya, Karaman, Kayseri, Niğde, Eskişehir) ve hayvan türleri değerlendirildiğinde, Orta Anadolu'nun halen olası mihraklar yönünden yüksek riskli bir bölge olarak hatırdta bulundurulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Aylan (2023) tarafından bildirildiği üzere, 2014 yılında yeni Avrupa Birliği projesi başlamadan önce Türkiye'deki kuduz hastalığı mihrak durumu, oral aşılama kampanyası başladıktan sonra 2020 yılı sığır-köpek pozitifliğine ilişkin veriler ve 2021 yılı hayvan türlerine göre pozitif örnek sayıları incelendiğinde oral aşılama kampanyasının ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri haricindeki kesimlerinde kuduz hastalığı kontrolünde önemli başarı sağladığı görülmektedir. Bununla birlikte aynı veriler Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde evcil hayvanların parenteral aşılama ve bölgedeki eğitim çalışmalarına bağlı olarak belli oranda kontrol edilmiş olduğunu gösteriyor olsa da özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesindeki köpek-sığır kuduz pozitifliği ve mihrak sayısı dikkat çekmektedir. Nitekim Keskin (2019) "Türkiye'de 2014-2018 yılları arasında tespit edilen köpek ve kedi kuduz vakalarının kümelenme analizi ile incelenmesi" konulu yüksek lisans tez çalışmasında, özellikle Diyarbakır, Şanlıurfa illerinde köpek kuduz vaka oranlarının yüksek olduğu bildirilmiş ve Diyarbakır'da 5 yıl içinde 3 yıl (2014-2016) aynı ilçede mihrak tespit edildiği vurgulanmıştır. Bu noktada gerek bölgenin vahşi hayattaki rezervuar hayvanlar için sağladığı yaşam ortamı bakımından, gerekse kontrolsüz sınır ötesi hareketlerine olanak

sağlayan coğrafi özellikleri göz önüne alındığında, özellikle köpek aracılı kuduz olgularının evcil hayvanlarda ve hatta örneklerini bildiğimiz insan olgularında (EKMUD, 2023; Şanlıurfa Tabip Odası, 2023) önemli yeri olduğu açıktır.

Bu çalışmada tanı materyallerinin seçiminin, kuduz pozitiflik oranlarının tür, coğrafik bölge vb bazında yapıldığı daha önce bildirilmiştir. Aylan (2023) tarafından bildirilen 2021 ve 2022 verilerinden de görülebileceği üzere, Marmara, Akdeniz ve Karadeniz bölgesi kuduz pozitiflik oranları diğer bölgelere göre oldukça azdır. Nitekim bu çalışmada Marmara Bölgesindeki tanı materyallerinden 6, Akdeniz bölgesine ait 2 kuduz virusu identifiye edilmiş olup (Çizelge 3.1.) tamamının ME2 alt dalında yer aldığı görülmüştür. Benzer olarak Karadeniz Bölgesinden sağlanarak bu çalışmada değerlendirilen materyal sayısı da (n=3) sınırlıdır. Bu virustan Sigir-289/Amasya/2019 ve Sigir-290/Giresun/2018 ME2 alt dalında; Kopek-252/Bayburt/2018 ME1a alt dalında yer almaktadır. Bayburt ili her ne kadar coğrafik olarak Karadeniz bölgesinde yer alıyor ise de söz konusu bu alt dal tespitinin Şekil 3.30'da sunulan 2018 yılı kuduz virus alt dallarına ilgili veriler ışığında, Doğu Anadolu bölgesindeki virus yayılımından bağımsız olmayabileceği değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada evcil hayvanların yanı sıra yaban yaşamındaki hayvanlara ait materyallerin kullanımı ve yaban yaşam ile evcil hayvanlar arasında virus sirkülasyonunun sorgulanması da amaçlanmıştır. Bu bağlamda çalışmanın her aşamasında yapılan seçimlerde (viral RNA varlığı ve çalışmaya dahil etme süreci, amplikonun dizin bilgisi elde edilmesi için ticari hizmet alımı vb.) yaban yaşamındaki hayvanlara ait örneklerle öncelik verilmiştir. Yaban yaşama ait tanı materyallerinden toplam 27 (19 tilki, 2 çakal, 2 sansar, 3 kurt ve 1 porsuk) kuduz virusu identifikasyonu yapılmış olup, viruslar ME2 ve ME1a alt dallarında identifiye edilmiştir. Çizelge 3.1. incelendiğinde, diğer türler ile benzer şekilde ülkenin batı kısmında yaban yaşamındaki hayvanlarda da ME2 alt tipinin dolaşımında olduğu, doğu illerinde ise, 2017 yılında Ardahan ilinden bir kurtta ait olan kuduz virusu (Kurt-288/Ardahan/2017) hariç, ME1a alt tipinin dolaşımında olduğu görülmektedir. Bu noktada 2017'de sözü edilen tespit sonrasındaki yıllarda Ardahan ve çevre illerinden değerlendirilebilen örnek sayısı yaban hayvanlarda bu alt dalın devamlılığı noktasında bir değerlendirmeyi olanaklı kılmamaktadır. Diğer yandan Ardahan'da 2017 yılında köpeklerle ait tanı materyallerindeki kuduz viruslarının (örnek no: Kopek-286/Ardahan/2017, Kopek-287/Ardahan/2017) saptanması, 2018 yılı ve sonrasında bölgede köpekler ve diğer evcil hayvanlardan ME2 tespitinin sıklıkla yapılmış olması (Çizelge 2.3.) yaban yaşamındaki hayvanlar ve -özellikle köpekler olmak üzere- evcil yaşamındaki hayvanlar arasındaki virus paylaşımı noktasının bölgede kuduz hastalığının kontrolü çalışmaları bağlamında (özellikle de oral aşılama) sorgulanması gereken bir diğer

konu olduğunu bildirmekte yarar görülmüştür. Diğer yandan yaban yaşam hayvanlarından saptanan virüslara ilgili filogenetik ağaçta ME2 alt dalındaki virüslerin yerleşimi (Şekil 3.41.) ve bu virüslarda Marston vd 2017’de bildirilen, I. ve II. daldaki virüsler ile benzer G ve/veya N gen bölgesi nükleotit dizilimlerinin belirlenmiş olması nedeniyle (Şekil 3.13., Şekil 3.26., Şekil 3.27.) yukarıda detaylı olarak bildirildiği üzere, özellikle orta Anadolu bölgesi ve bölgeler arası olası virüs yayılımlarının sorgulanmasında, yaban yaşam hayvanlarına ilgili moleküler epidemiyolojik izlemin önemini vurgulamakta da yarar olduğu kanaatine varılmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Ülkemiz coğrafi konumu dolayısıyla Asya ve Avrupa ülkeleriyle komşudur. Sınır ötesi kontrolsüz geçişlerin önlenmesi her hastalıkta olduğu gibi kuduzda da oldukça önemlidir. Ancak coğrafi konumu dolayısıyla özellikle ülkenin doğu ve güneydoğu kesimlerinde, vahşi yaşam adına bu kontrol çok da mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla ülkede sirküle olan suşların başka bölgelerden gelen yeni bir suş kaynaklı mı olduğu yoksa mevcut olan kuduz viruslarıyla aynı soydan mı geldiği; ülkedeki konakçılarda bir değişiklik olup olmadığı gibi enfeksiyon dinamiklerinin doğru ve zamanında tespiti sürdürülebilir kontrol yöntemleri için oldukça büyük önem arz etmektedir.

- Ülkemizde kuduz hastalığının tanısı ve epidemiyolojisi konusunda, uluslararası organizasyonlar ile iş birliği içerisinde, uzun yıllardır çok önemli çalışmalar yapılmaktadır. Güncel tanı yöntemlerinin laboratuvarlara kazandırılması, evcil ve vahşi hayvanlara yönelik aşı kampanyaları bu çalışmaların önemli konularıdır. Moleküler epidemiyolojik çalışmaların, kuduz hastalığının kontrolünde diğer paydaşların (Sağlık Bakanlığı, belediyeler vb) yanı sıra belki de en önemli sorumluluğu taşıyan Tarım ve Orman Bakanlığı'nın yapacağı çalışmaların (oral aşılama çalışmalarının planlanması, sahipli /sahipsiz köpeklerle ilgili olarak sürdürülen aşı kampanyaları vb) planlanmasında önemi açıktır.

- Bu çalışmadaki gen bölgelerinin seçiminde yakın tarihli değişikliğin sorgulanması amacıyla G-L intergenik bölge seçilmiş olup, elde edilen veriler ışığında çalışılan kuduz viruslarının sınırlı alanlar (il/çevre il) ya da bölgesel bazı farklılıklar taşıyor oldukları ve bu farklılıkların tespitinin sonraki moleküler epidemiyolojik çalışmalar ve değerlendirmeler için kullanılabilir olduğu değerlendirilmiştir.

- Antijenik bölgelerin ve virusun patojenitesi, replikasyonu, transkripsiyonu için önemli olan bölgelerin değerlendirilmesi sonucunda, sirkulasyonda olan virusların patojen karakterlerini korumaya devam ettikleri, ticari aşı ve ELISA kitlerinin kullanıma uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

- Bu çalışmanın verileri genel olarak değerlendirildiğinde; ülkemizde *Cosmopolitan* dalına bağlı 3 farklı alt dalın yer aldığı (ME2, ME1a, CA2), köpeklerin her üç alt dalı da taşıdığı, yaban yaşam ve evcil yaşam hayvanlar arasındaki sirkülasyon yanı sıra özellikle bazı bölgelerimizde köpekler arasındaki virus aktarımının halen özellikle ülkemizin doğu ve güneydoğu bölgelerinde köpeğe bağlı kuduz olguları şeklinde halk sağlığını tehdit eder boyutunun oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Nitekim 2022 yılında Bitlis'te 10 yaşındaki bir çocuğa kuduz tanısı koyulmuş, kuduz köpekle teması olan başka bir çocuk ise

uygun aşılama ve immunoglobulin uygulaması ile kurtulmuştur (EKMUD, 2023). 13 Temmuz 2023'te Şanlıurfa'da başka bir vatandaşımız yine köpek ısırması sonucu kuduz teşhisi ile hayatını kaybetmiştir (Şanlıurfa Tabip Odası, 2023).

- 2030 yılında dünya genelinde insanlarda köpek aracılı kuduz ölümlerinin önüne geçmek hedeflenirken, ulusal mücadele programlarının belirlenmesi gerekliliği bildirilmiştir. İnsanlardaki ve hayvanlardaki kuduz enfeksiyonunun seyrinin anlaşılabilmesi ve kontrol stratejilerinin geliştirilebilmesi için teşhis koyulan vakalarda etkenin tiplendirmesine ve epidemiyolojik verilere ihtiyaç bulunmaktadır (Singh vd., 2017). Bu çalışma ile 2016-2021 yılları için ülkemizin tüm coğrafik bölgelerini ve farklı türleri temsil eden örnekler kullanılarak RABV sirkülasyonu ile ilgili olarak elde edilen veri ve değerlendirmelerin, ülkemizde kuduz hastalığı için kamunun yapacağı çalışmalara önemli katkı sunacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla benzeri moleküler izlem çalışmalarının aksatılmadan devam ettirilmesi ve RABV'un ülkedeki dağılımının yakinen takip edilmesi gereğinin bir kez daha ifade edilmesinde yarar görülmektedir.

- Uygulanacak olan koruma ve kontrol yöntemlerinin konakçı türüne uygun seçilmesi ve tüm rezervuar türlerine eş zamanlı mücadele yöntemlerinin uygulanması, yapılacak aşılama çalışmalarının belli bir kesimde yoğunlaşmasından ziyade, hayvan sayısına paralel olarak ülke genelinde en az % 70'lik düzeyde aşılama yapılması, özellikle yaban yaşamındaki oral aşılama programlarının komşu ülkelerle iş birliği içerisinde ve eş zamanlı düzenlenmesinin mücadeleye katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abraham, S., Ravindran, J., Abishaw, N., Sandam, N., Thimmareddy, P., & Govindaraju, G. (2017). Review on rabies and vaccines. *ICJMAS*, 6, 2064-2085. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.237>
- Albertini, A., Baquero, E., Ferlin, A., & Gaudin, Y. (2012). Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses*, 4, 117-139. <https://doi.org/10.3390/v4010117>
- Albertini, A., Ruigrok, R., & Blondel, D. (2011). Rabies virus transcription and replication. *Advances in virus research*, 79, 1-22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00001-9>
- Arya, S. C. (1994). Transmissible spongiform encephalopathies and sheep-brain derived rabies vaccines.
- Ashwini, M. A., Pattanaik, A., & Mani, R. S. (2024). Recent updates on laboratory diagnosis of rabies. *Indian J Med Res*, 159(1), 48-61. https://doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_131_23
- Atıcı, Y. T., & Oğuzoğlu, T. (2022). The comparison of full G and N gene sequences from Turkish rabies virus field strains. *Virus Res*, 315, 198790. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198790>
- Aylan, O. (2023). *Ülkemizde kuduz hastalığının güncel durumu ve yaban hayatında oral aşılama* [Bildiri sunumu]. Yıl sonu değerlendirme toplantısı. https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2023/09/Orhan.Aylan-Yil-Sonu-Deg.-Topl_compressed.pdf
- Badrane, H., Bahloul, C., Perrin, P., & Tordo, N. (2001). Evidence of two lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of Virology*, 75(7), 3268-3276. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.7.3268-3276.2001>
- Badrane, H., & Tordo, N. (2001). Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol*, 75(17), 8096-8104. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8096-8104.2001>
- Baer, G. M., Shaddock, J. H., Houff, S. A., Harrison, A. K., & Gardner, J. J. (1982). Human rabies transmitted by corneal transplant. *Archives of Neurology*, 39(2), 103-107. <https://doi.org/10.1001/archneur.1982.00510140037010>
- Banyard, A., & Fooks, A. (2021). Rabies and the other lyssaviruses (Rhabdoviridae). *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20936-9>
- Barber-Lomax, J. W. (1960). The biting of madde dogges. *Journal of Small Animal Practice*, 1(1-4), 101-108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1960.tb06059.x>
- Bengoumi, M., Mansouri, R., Ghram, B., & Mérot, J. (2018). Rabies in North Africa and the Middle East: Current situation, strategies and outlook. *Rev Sci Tech*, 37(2), 497-510. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2818> (La rage dans les pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient : situation actuelle et perspectives.)

- Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., & Lafay, F. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *Journal of Virology*, 65, 4198-4203. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4198-4203.1991>
- Blanton, J. D., & Wallace, R. M. (2015). The ancient curse: Rabies. *Microbiology Spectrum*, 3(6), 10.1128/microbiolspec.iol1125-0018-2015. <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.iol5-0018-2015>
- Bourhy, H., Kissi, B., Audry, L., Smreczak, M., Sadkowska-Todys, M., Kulonen, K., Tordo, N., Zmudzinski, J. F., & Holmes, E. C. (1999). Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*, 80(10), 2545-2557. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>
- Bourhy, H., Kissi, B., & Tordo, N. (1993). Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology*, 194(1), 70-81. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1236>
- Bourhy, H., Reynes, J.-M., Dunham, E., Dacheux, L., Larrous, F., Huong, V., Xu, G., Yan, J.-X., Miranda, M. E., & Holmes, E. (2008). The origin and phylogeography of dog rabies virus. *The Journal of general virology*, 89, 2673-2681. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003913-0>
- By, C., Pringle, C. R., Schwemmler, M., Carbone, K. M., Tomonago, K., Nowotny, N., Garten, W., Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R. G., Fang, R.-X., Jackson, A., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R. B., Walker, P., Feldmann, H., Geisbert, T. W., & Will, H. (2005). The negative sense single stranded RNA viruses. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-249951-7.50014-6>
- Carnieli, P., Jr., Fahl Wde, O., Brandão, P. E., Oliveira Rde, N., Macedo, C. I., Durymanova, E., & Castilho, J. G. (2010). Comparative analysis of rabies virus isolates from Brazilian canids and bats based on the G gene and G-L intergenic region. *Arch Virol*, 155(6), 941-948. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0671-7>
- Castel, G., Chtéoui, M., Caignard, G., Prehaud, C., Méhouas, S. p., Réal, E. o., Jallet, C., Jacob, Y., Ruigrok, R., & Tordo, N. (2009). Peptides that mimic the amino-terminal end of the rabies virus phosphoprotein have antiviral activity. *Journal of Virology*, 83, 10808-10820. <https://doi.org/10.1128/JVI.00977-09>
- CDC. (2024a, 24 Mayis). Global rabies: what you should know. *U.S. Centers for Disease Control and Prevention*. <https://www.cdc.gov/rabies/around-world/index.html>
- CDC. (2024b). Rabies status: Assessment by country. *U.S. Centers for Disease Control and Prevention*. <https://www.cdc.gov/rabies/country-risk/index.html>
- Celis, E., Ou, D., Dietzschold, B., & Koprowski, H. (1988). Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. *Journal of Virology*, 62(9), 3128-3134. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.62.9.3128-3134.1988>
- Chomel, B. B., & Sykes, J. E. (2021). 21 - Rabies. *Greene's infectious diseases of the dog and cat (Fifth Edition)* (ss. 260-270). Philadelphia: W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50934-3.00021-5>

- Cliquet, F., Aubert, M., & Sagné, L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*, 212(1), 79-87. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00212-3)
- Coetzer, A., Scott, T. P., Amparo, A. C., Jayme, S., & Nel, L. H. (2018). Formation of the Asian Rabies Control Network (ARACON): A common approach towards a global good. *Antiviral Res*, 157, 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.018>
- Columella, L. J. M. (M.S. 60). *De re rustica, books 3-12; reproduction of ms. Cod. Sangermenensis Petropolitanus 207, now Cd. L.F.v.N.1, in the State Library at Leningrad.* <https://search.library.wisc.edu/catalog/999825593402124>
- Commission, E. (2024, 05 Mayıs). ADIS (Animal Disease Information System). *European Commission*. <https://webgate.ec.europa.eu/tracesnt/adis/public/notification>
- Condori, R. E., Kartskhia, N., Avaliani, L., Donduashvili, M., Elbakidze, T., Kapanadze, A., Pieracci, E. G., Maghlakelidze, G., Wadhwa, A., Morgan, C. N., Reynolds, M., Li, Y., & Ninidze, L. (2023). Comparing the genetic typing methods for effective surveillance and rabies control in Georgia. *Front Microbiol*, 14, 1243510. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1243510>
- Constantine, D. G. (1962). Rabies transmission by nonbite route. *Public Health Reports (1896-1970)*, 77(4), 287-289. <https://doi.org/10.2307/4591470>
- Conzelmann, K. K., Cox, J. H., Schneider, L. G., & Thiel, H. J. (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*, 175(2), 485-499. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90433-r](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90433-r)
- Coulon, P., Ternaux, J. P., Flamand, A., & Tuffereau, C. (1998). An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro. *J Virol*, 72(1), 273-278. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.1.273-278.1998>
- De Benedictis, P., Minola, A., Rota Nodari, E., Aiello, R., Zecchin, B., Salomoni, A., Foglierini, M., Agatic, G., Vanzetta, F., Lavenir, R., Lepelletier, A., Bentley, E., Weiss, R., Cattoli, G., Capua, I., Sallusto, F., Wright, E., Lanzavecchia, A., Bourhy, H., & Corti, D. (2016). Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis. *EMBO Molecular Medicine*, 8(4), 407-421. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emmm.201505986>
- Dellicour, S., Troupin, C., Jahanbakhsh, F., Salama, A., Massoudi, S., Moghaddam, M. K., Baele, G., Lemey, P., Gholami, A., & Bourhy, H. (2019). Using phylogeographic approaches to analyse the dispersal history, velocity and direction of viral lineages - Application to rabies virus spread in Iran. *Mol Ecol*, 28(18), 4335-4350. <https://doi.org/10.1111/mec.15222>
- Demirden, S. F., Alptekin, K., Kımız Geboloğlu, I., & Öncel, S. Ş. (2022). History of vaccination and vaccine production in Türkiye: From past to present. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 52(4), 247-264. <https://doi.org/10.54453/tmcd.2022.52244>
- Dietzschold, B., Lafon, M., Wang, H., Otvos, L., Celis, E., Wunner, W. H., & Koprowski, H. (1987). Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Research*, 8(2), 103-125. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1702\(87\)90023-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1702(87)90023-2)

- Dietzschold, B., Tollis, M., Rupprecht, C. E., Celis, E., & Koprowski, H. (1987). Antigenic variation in rabies and rabies-related viruses: cross-protection independent of glycoprotein-mediated virus-neutralizing antibody. *J Infect Dis*, 156(5), 815-822. <https://doi.org/10.1093/infdis/156.5.815>
- Dietzschold, B., Wiktor, T. J., Trojanowski, J. Q., Macfarlan, R. I., Wunner, W. H., Torres-Anjel, M. J., & Koprowski, H. (1985). Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro. *Journal of Virology*, 56(1), 12-18. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.56.1.12-18.1985>
- Ebrahimzadeh, L. H., & Bannazadeh, B. H. (2020). Rabies elimination by 2030: What challenges does Iran face? *Iran J Public Health*, 49(7), 1397-1398. <https://doi.org/10.18502/ijph.v49i7.3603>
- Eggerbauer, E., de Benedictis, P., Hoffmann, B., Mettenleiter, T. C., Schlottau, K., Ngoepe, E. C., Sabeta, C. T., Freuling, C. M., & Müller, T. (2016). Evaluation of six commercially available rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of rabies in brain material. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(6), e0004776. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004776>
- Evans, J. S., Selden, D., Wu, G., Wright, E., Horton, D. L., Fooks, A. R., & Banyard, A. C. (2018). Antigenic site changes in the rabies virus glycoprotein dictates functionality and neutralizing capability against divergent lyssaviruses. *J Gen Virol*, 99(2), 169-180. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000998>
- Fallahi, F., Wandeler, A. I., & Nadin-Davis, S. A. (2016). Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of escape mutants. *Virus Research*, 220, 161-171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.019>
- FAO, W., WHO, GARC. (2018). *Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030* (9241513837). <https://www.fao.org/3/i8956en/I8956EN.pdf>
- Fooks, A. R., Cliquet, F., Finke, S., Freuling, C., Hemachudha, T., Mani, R. S., Müller, T., Nadin-Davis, S., Picard-Meyer, E., Wilde, H., & Banyard, A. C. (2017). Rabies. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17091. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>
- Fooks, A. R., Johnson, N., Freuling, C. M., Wakeley, P. R., Banyard, A. C., McElhinney, L. M., Marston, D. A., Dastjerdi, A., Wright, E., Weiss, R. A., & Müller, T. (2009). Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(9), e530. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000530>
- Fooks, A. R., Shipley, R., Markotter, W., Tordo, N., Freuling, C. M., Müller, T., McElhinney, L. M., Banyard, A. C., & Rupprecht, C. E. (2021). Renewed public health threat from emerging lyssaviruses. *Viruses*, 13(9), 1769. <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/9/1769>
- Freuling, C. M., Hampson, K., Selhorst, T., Schröder, R., Meslin, F. X., Mettenleiter, T. C., & Müller, T. (2013). The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1623), 20120142. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0142>
- GARC. (2024). Turkey rabies elimination progress. <https://rabiesalliance.org/country/turkey>
- Garg, S. (2014). *Rabies in man and animals*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1605-6>

- Gilbert, A. T., & Chipman, R. B. (2020). Chapter 19 - Rabies control in wild carnivores. *Rabies (Fourth Edition)* (ss. 605-654). Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818705-0.00019-4>
- Gluska, S., Zahavi, E. E., Chein, M., Gradus, T., Bauer, A., Finke, S., & Perlson, E. (2014). Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery. *PLoS Pathog*, 10(8), e1004348. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004348>
- Goto, H., Minamoto, N., Ito, H., Ito, N., Sugiyama, M., Kinjo, T., & Kawai, A. (2000). Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol*, 81(Pt 1), 119-127. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-119>
- Gürel, A. (1990). Türkiye’de ve Avrupa’da kuduz hastalığı ve Marmara Bölgesindeki kuduz çalışmaları. *Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri*, 1(3), 142-151. https://jag.journalagent.com/scie/pdfs/KEAH_1_3_142_151.pdf
- Hemachudha, T., Griffin, D. E., Chen, W. W., & Johnson, R. T. (1988). Immunologic studies of rabies vaccination-induced Guillain-Barré syndrome. *Neurology*, 38(3), 375-375. <https://doi.org/doi:10.1212/WNL.38.3.375>
- Hemachudha, T., Laothamatas, J., & Rupprecht, C. E. (2002). Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *The Lancet Neurology*, 1(2), 101-109. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(02\)00041-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00041-8)
- Hildegund, E. (2020). *Rabies and rabies vaccines*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21084-7>
- Horton, D. L., McElhinney, L. M., Freuling, C. M., Marston, D. A., Banyard, A. C., Goharriz, H., Wise, E., Breed, A. C., Saturday, G., Kolodziejek, J., Zilahi, E., Al-Kobaisi, M. F., Nowotny, N., Mueller, T., & Fooks, A. R. (2015). Complex epidemiology of a zoonotic disease in a culturally diverse region: phylogeography of rabies virus in the Middle East. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(3), e0003569. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003569>
- Huaman, C., Paskey, A. C., Clouse, C., Feasley, A., Rader, M., Rice, G. K., Luquette, A. E., Fitzpatrick, M. C., Drumm, H. M., Yan, L., Cer, R. Z., Donduashvili, M., Buchukuri, T., Nanava, A., Hulseberg, C. E., Washington, M. A., Laing, E. D., Malagon, F., Broder, C. C., . . . Schaefer, B. C. (2023). Genomic surveillance of rabies virus in Georgian canines. *Viruses*, 15(9), 1797. <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/9/1797>
- Hyun, B. H., Lee, K. K., Kim, I. J., Lee, K. W., Park, H. J., Lee, O. S., An, S. H., & Lee, J. B. (2005). Molecular epidemiology of rabies virus isolates from South Korea. *Virus Res*, 114(1-2), 113-125. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.06.004>
- ICTV. (2024). Current ICTV taxonomy release. <https://ictv.global/taxonomy>
- Jackson, A. C. (2020). Chapter 9 - Pathogenesis. *Rabies (Fourth Edition)* (ss. 303-345). Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818705-0.00009-1>
- Jadeja, N. B., & Tamim Vanak, A. (2023). High-throughput techniques to understand evolution and transmission trends of rabies virus in Asian countries. *CABI Books*, 220-234. <https://doi.org/10.1079/9781800622975.0018>

- Javadi, M. A., Fayaz, A., Mirdehghan, S. A., & Ainollahi, B. (1996). Transmission of rabies by corneal graft. *Cornea*, 15(4), 431-433. https://journals.lww.com/corneajrnl/fulltext/1996/07000/transmission_of_rabies_by_corneal_graft.14.aspx
- Jayakar, H. R., Jeetendra, E., & Whitt, M. A. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Research*, 106(2), 117-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.08.009>
- Johnson, N., Black, C., Smith, J., Un, H., McElhinney, L. M., Aylan, O., & Fooks, A. R. (2003). Rabies emergence among foxes in Turkey. *J Wildl Dis*, 39(2), 262-270. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.262>
- Johnson, N., McElhinney, L. M., Smith, J., Lowings, P., & Fooks, A. R. (2002). Phylogenetic comparison of the genus *Lyssavirus* using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes. *Arch Virol*, 147(11), 2111-2123. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0877-4>
- Johnson, N., Un, H., Fooks, A. R., Freuling, C., Müller, T., Aylan, O., & Vos, A. (2010). Rabies epidemiology and control in Turkey: past and present. *Epidemiol Infect*, 138(3), 305-312. <https://doi.org/10.1017/s0950268809990963>
- Johnson, N., Un, H., Vos, A., Aylan, O., & Fooks, A. R. (2006). Wildlife rabies in Western Turkey: the spread of rabies through the western provinces of Turkey. *Epidemiol Infect*, 134(2), 369-375. <https://doi.org/10.1017/s0950268805005017>
- Keskin, F. İ. (2019). *Türkiye’de 2014-2018 yılları arasında tespit edilen köpek ve kedi kuduz vakalarının kümelenme analizi ile incelenmesi* [Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi]. Ankara. <https://avesis.ankara.edu.tr/yonetilen-tez/a926549f-81bf-447e-9d57-9275669399db/turkiyede-2014-2018-yillari-arasinda-tespit-edilen-kopek-ve-kedi-kuduz-vakalarinin-kumelenme-analizi-ile-incelenmesi>
- Kilic, B., Unal, B., Semin, S., & Konakci, S. K. (2006). An important public health problem: rabies suspected bites and post-exposure prophylaxis in a health district in Turkey. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 248-254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.05.010>
- Kissi, B., Tordo, N., & Bourhy, H. (1995). Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*, 209(2), 526-537. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1285>
- Klein, A., Fahrion, A., Finke, S., Eyngor, M., Novak, S., Yakobson, B., Ngoepe, E., Phahladira, B., Sabeta, C., De Benedictis, P., Gourlaouen, M., Orciari, L. A., Yager, P. A., Gigante, C. M., Knowles, M. K., Fehlner-Gardiner, C., Servat, A., Cliquet, F., Marston, D., . . . Freuling, C. M. (2020). Further evidence of inadequate quality in lateral flow devices commercially offered for the diagnosis of rabies. *Trop Med Infect Dis*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5010013>
- Koury, R., & Warrington, S. J. (2024). Rabies. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.
- Kuzmin, I. V., Wu, X., Tordo, N., & Rupprecht, C. E. (2008). Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-

- coding regions. *Virus Research*, 136(1), 81-90.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.021>
- Kuzmina, N., Kuzmin, I., Ellison, J., & Rupprecht, C. (2013). Conservation of binding epitopes for Monoclonal Antibodies on the rabies virus glycoprotein. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals*, 5, 037-043. <https://doi.org/10.4172/jaa.1000061>
- Lafon, M. (2011). Chapter 3 - Evasive strategies in rabies virus infection. *Advances in virus research* (ss. 33-53). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00003-2>
- Lafon, M., Wiktor, T., & Macfarlan, R. (1983). Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: Analysis with monoclonal antibodies. *The Journal of general virology*, 64 (Pt 4), 843-851. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-4-843>
- Lafon, M., & Wiktor, T. J. (1985). Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. *J Gen Virol*, 66 (Pt 10), 2125-2133. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2125>
- Le Mercier, P., Jacob, Y., & Tordo, N. (1997). The complete Mokola virus genome sequence: Structure of the RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of general virology*, 78 (Pt 7), 1571-1576. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-7-1571>
- Léchenne, M., Naïssengar, K., Lepelletier, A., Alfaroukh, I. O., Bourhy, H., Zinsstag, J., & Dacheux, L. (2016). Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field surveillance in developing countries. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(10), e0005010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005010>
- Lentz, T. L., Wilson, P. T., Hawrot, E., & Speicher, D. W. (1984). Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Science*, 226(4676), 847-848. <https://doi.org/doi:10.1126/science.6494916>
- MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2017). *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00002-7>
- Madhusudana, S. N., Subha, S., Thankappan, U., & Ashwin, Y. B. (2012). Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virol Sin*, 27(5), 299-302. <https://doi.org/10.1007/s12250-012-3265-6>
- Malik, Y., Singh, R. K., & Dhama, K. (2020). *Animal-origin viral zoonoses*. Singapore: Springer.
- Marston, D. A., Banyard, A. C., McElhinney, L. M., Freuling, C. M., Finke, S., de Lamballerie, X., Müller, T., & Fooks, A. R. (2018). The lyssavirus host-specificity conundrum—rabies virus—the exception not the rule. *Current Opinion in Virology*, 28, 68-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.11.007>
- Marston, D. A., Horton, D. L., Nunez, J., Ellis, R. J., Orton, R. J., Johnson, N., Banyard, A. C., McElhinney, L. M., Freuling, C. M., Firat, M., Ünal, N., Müller, T., de Lamballerie, X., & Fooks, A. R. (2017). Genetic analysis of a rabies virus host shift event reveals within-host viral dynamics in a new host. *Virus Evol*, 3(2), vex038. <https://doi.org/10.1093/ve/vex038>

- Marston, D. A., McElhinney, L. M., Ellis, R. J., Horton, D. L., Wise, E. L., Leech, S. L., David, D., de Lamballerie, X., & Fooks, A. R. (2013). Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics*, 14(1), 444. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-444>
- Marston, D. A., McElhinney, L. M., Johnson, N., Müller, T., Conzelmann, K. K., Tordo, N., & Fooks, A. R. (2007). Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *Journal of General Virology*, 88(4), 1302-1314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/vir.0.82692-0>
- Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Sawaki, Y., Koyama, H., & Sugiyama, M. (2010). Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J Virol*, 84(8), 4002-4012. <https://doi.org/10.1128/jvi.02220-09>
- Maurya, I., Vagholkar, K., Patel, B., Siddiqui, M., Tiwari, S., & Maurya, P. (2015). State of globe: rabies: the lethality since antiquity! *J Glob Infect Dis*, 7(1), 1-2. <https://doi.org/10.4103/0974-777x.150880>
- McGettigan, J. P. (2010). Experimental rabies vaccines for humans. *Expert Rev Vaccines*, 9(10), 1177-1186. <https://doi.org/10.1586/erv.10.105>
- Mebatsion, T., Weiland, F., & Conzelmann, K. K. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol*, 73(1), 242-250. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.242-250.1999>
- Meltzer, M. I., & Rupprecht, C. E. (1998). A Review of the economics of the prevention and control of rabies. *PharmacoEconomics*, 14(5), 481-498. <https://doi.org/10.2165/00019053-199814050-00003>
- Nadin-Davis, S. A., & Real, L. A. (2011). Chapter 11 - Molecular phylogenetics of the lyssaviruses—Insights from a coalescent approach. *Advances in virus research* (ss. 203-238). Amerika Birleşik Devletleri: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00011-1>
- Okumura, A., & Harty, R. N. (2011). Rabies virus assembly and budding. *Adv Virus Res*, 79, 23-32. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387040-7.00002-0>
- Organization, W. H. (1977). Rabies in a laboratory worker. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 52(30), 247-248.
- Osada, N., Kohara, A., Yamaji, T., Hirayama, N., Kasai, F., Sekizuka, T., Kuroda, M., & Hanada, K. (2014). The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Res*, 21(6), 673-683. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
- Pieracci, E. A.-O., Wallace, R., Maskery, B., Brouillette, C. A.-O., Brown, C., & Joo, H. (2024). Dogs on the move: Estimating the risk of rabies in imported dogs in the United States, 2015-2022. LID - 10.1111/zph.13122 [doi]. *Zoonoses and Public Health*(1863-2378 (Electronic)). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/zph.13122>

- Racey, P. A., Hutson, A. M., & Lina, P. H. C. (2013). Bat Rabies, Public Health and European Bat Conservation. *Zoonoses and Public Health*, 60(1), 58-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01533.x>
- Ravkov, E. V., Smith, J. S., & Nichol, S. T. (1995). Rabies virus glycoprotein gene contains a long 3' noncoding region which lacks pseudogene properties. *Virology*, 206(1), 718-723. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(95\)80095-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80095-6)
- Rupprecht, C. E., Freuling, C. M., Mani, R. S., Palacios, C., Sabeta, C. T., & Ward, M. (2020). Chapter 1 - A history of rabies—The foundation for global canine rabies elimination. *Rabies (Fourth Edition)* (ss. 1-42). Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818705-0.00001-7>
- Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., & Hemachudha, T. (2002). Rabies re-examined. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(6), 327-343. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00287-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00287-6)
- Rupprecht, C. E., Kuzmin, I. V., & Meslin, F. X. (2017). Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Research*, 6.
- Sacramento, D., Badrane, H., Bourhy, H., & Tordo, N. (1992). Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *Journal of General Virology*, 73(5), 1149-1158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-5-1149>
- Sacramento, D., Bourhy, H., & Tordo, N. (1991). PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol Cell Probes*, 5(3), 229-240. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(91\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0890-8508(91)90045-1)
- Saeed, B., & Al-Mousawi, M. (2017). Rabies acquired through kidney transplantation in a child: a case report. *Exp Clin Transplant*, 15(3), 355-357.
- Schatz, J., Fooks, A., McElhinney, L., Horton, D., Echevarria, J., Vázquez-Moron, S., Kooi, E., Rasmussen, T. B., Müller, T., & Freuling, C. (2013). Bat rabies surveillance in Europe. *Zoonoses and Public Health*, 60(1), 22-34.
- Scott, T. P., Coetzer, A., de Balogh, K., Wright, N., & Nel, L. H. (2015). The Pan-African Rabies Control Network (PARACON): A unified approach to eliminating canine rabies in Africa. *Antiviral Research*, 124, 93-100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.002>
- Scott, T. P., Fischer, M., Khaibeb, S., Freuling, C., Höper, D., Hoffmann, B., Markotter, W., Müller, T., & Nel, L. H. (2013). Complete genome and molecular epidemiological data infer the maintenance of rabies among Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) in Namibia. *PLOS ONE*, 8(3), e58739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058739>
- Seif, I., Coulon, P., Rollin, P. E., & Flamand, A. (1985). Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol*, 53(3), 926-934. <https://doi.org/10.1128/jvi.53.3.926-934.1985>
- Servat, A., Picard-Meyer, E., Robardet, E., Muzniece, Z., Must, K., & Cliquet, F. (2012). Evaluation of a rapid immunochromatographic diagnostic test for the detection of rabies from brain material of European mammals. *Biologicals*, 40(1), 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.12.011>

- Shabansalmani, N., Pourhoseein, B., Khosravy, M., Farahtaj, F., Fazeli, M., & Bashar, R. (2023). A notable increase in human rabies mortality after ten years in Iran in 2022: A case series study. *Epidemiol Health System J*, 10(4), 187-190. <https://doi.org/10.34172/ehsj.25202>
- Shi, C., Sun, P., Yang, P., Liu, L., Tian, L., Liu, W., Wang, M., Zheng, X., & Zheng, W. (2022). Research progress on neutralizing epitopes and antibodies for the Rabies virus. *Infect Med (Beijing)*, 1(4), 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2022.09.003>
- Sillero-Zubiri, C., Marino, J., Gordon, C. H., Bedin, E., Hussein, A., Regassa, F., Banyard, A., & Fooks, A. R. (2016). Feasibility and efficacy of oral rabies vaccine SAG2 in endangered Ethiopian wolves. *Vaccine*, 34(40), 4792-4798. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.021>
- Singh, R., Singh, K. P., Cherian, S., Saminathan, M., Kapoor, S., Manjunatha Reddy, G. B., Panda, S., & Dhama, K. (2017). Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 37(1), 212-251. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1343516>
- Smith, D., Yager, A., & Baer, M. (1996). Laboratory techniques in rabies. In F. X. Meslin, M. M. Kaplan, & H. Koprowski (Eds.), (4th ed. ed.). Geneva: World Health Organization.
- Smith, J. S., Fishbein, D. B., Rupprecht, C. E., & Clark, K. (1991). Unexplained rabies in three immigrants in the United States. *New England Journal of Medicine*, 324(4), 205-211. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJM199101243240401>
- Spickler, A. R. (2021, 2021). Rabies and rabies related lyssaviruses. <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>
- T. C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı. (2023). *Kuduz riskli temas ve kuduz vakaları (Türkiye, 2013-2023)*. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/dokumanlar-zoonotik.html>
- T.C. Sağlık Bakanlığı. (2019). *Kuduz profilaksi rehberi*. (978-975-590-728-4). Ankara
- Tarantola, A. (2017). Four thousand years of concepts relating to rabies in animals and humans, its prevention and its cure. *Trop Med Infect Dis*, 2(2). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed2020005>
- Taylor, E., Del Rio Vilas, V., Scott, T., Coetzer, A., Prada, J. M., Alireza, G., Alqadi, N. A., Berry, A., Bazzal, B., Barkia, A., Davlyatov, F., Farahtaj, F., Harabech, K., Imnadze, P., Mahiout, F., Majeed, M. I., Nedosekov, V., Nel, L., Rich, H., . . . Horton, D. (2021). Rabies in the Middle East, Eastern Europe, Central Asia and North Africa: Building evidence and delivering a regional approach to rabies elimination. *J Infect Public Health*, 14(6), 787-794. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.009>
- Thoulouze, M.-I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H., & Lafon, M. (1998). The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of Virology*, 72(9), 7181-7190. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.72.9.7181-7190.1998>
- Tollis, M., Dietschold, B., Volia, C. B., & Koprowski, H. (1991). Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine*, 9(2), 134-136. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90270-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90270-G)

- Tordo, N., Badrane, H., Bourhy, H., & Sacramento, D. (1993). Molecular epidemiology of lyssaviruses: focus on the glycoprotein and pseudogenes. *Onderstepoort J Vet Res*, 60(4), 315-323.
- Tordo, N., & Poch, O. (1988). Structure of rabies virus. *Rabies* (ss. 25-45). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1755-5_2
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., & Rougeon, F. (1986). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(11), 3914-3918. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3914>
- Tsiang, H., Lycke, E., Ceccaldi, P.-E., Ermine, A., & Hirardot, X. (1989). The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. *Journal of General Virology*, 70(8), 2075-2085. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-8-2075>
- Tuffereau, C., Bénéjean, J., Blondel, D., Kieffer, B., & Flamand, A. (1998). Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *Embo j*, 17(24), 7250-7259. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7250>
- Tuffereau, C., Leblois, H., Bénéjean, J., Coulon, P., Lafay, F., & Flamand, A. (1989). Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology*, 172(1), 206-212. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90122-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90122-0)
- Un, H., Eskiizmirli, S., Unal, N., Freuling, C. M., Johnson, N., Fooks, A. R., Müller, T., Vos, A., & Aylan, O. (2012). Oral vaccination of foxes against rabies in Turkey between 2008 and 2010. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 125(5-6), 203-208.
- Van der Vlugt, R. A., & Stijger, C. (2021). Encyclopedia of virology.
- Vos, A., Freuling, C., Eskiizmirli, S., Un, H., Aylan, O., Johnson, N., Gürbüz, S., Müller, W., Akkoca, N., Müller, T., Fooks, A. R., & Askaroglu, H. (2009). Rabies in foxes, Aegean region, Turkey. *Emerg Infect Dis*, 15(10), 1620-1622. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090203>
- Wallace, R. M., & Blanton, J. (2020). Chapter 4 - Epidemiology. *Rabies (Fourth Edition)* (ss. 103-142). Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818705-0.00004-2>
- Wandeler, A. I., Capt, S., Kappeler, A., & Hauser, R. (1988). Oral immunization of wildlife against rabies: concept and first field experiments. *Rev Infect Dis*, 10 Suppl 4, S649-653. https://doi.org/10.1093/clinids/10.supplement_4.s649
- WHO. (2005). *WHO Expert consultation on rabies first report*.
- WHO. (2018). *Rabies vaccines: WHO position paper* [Epidemiological report].
- WHO. (2024a). *Control of neglected tropical diseases (NTD)*. W. H. Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091535>
- WHO. (2024b). Rabies. https://www.who.int/health-topics/rabies#tab=tab_1
- WHO. (2024c, 05.06.2024). Rabies. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>

- WHO. (2024d). Rabies bulletin. <https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/classification>
- WHO. (2024e). Rabies transmission and pathogenesis. <https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/transmission-and-pathogenesis>
- Winkler, W. G., Fashinell, T. R., Leffingwell, L., Howard, P., & Conomy, J. P. (1973). Airborne rabies transmission in a laboratory worker. *Jama*, 226(10), 1219-1221.
- WOAH. (2009). Rabies. *CFSPH Center for Food Security & Public Health*. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/rabies-1.pdf>
- WOAH. (2023, 2023). Chapter 3.1.18 Rabies (Infection with rabies virus and other lyssaviruses). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf
- Wu, X., Franka, R., Velasco-Villa, A., & Rupprecht, C. E. (2007). Are all lyssavirus genes equal for phylogenetic analyses? *Virus Research*, 129(2), 91-103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.06.022>
- Wunner, W. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies-virus receptor? *Trends in Neurosciences*, 5, 413-415. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236\(82\)90227-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-2236(82)90227-2)
- Wunner, W. H., & Conzelmann, K.-K. (2020). Chapter 2 - Rabies virus. *Rabies (Fourth Edition)* (ss. 43-81). Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818705-0.00002-9>
- Yamada, K., Noguchi, K., & Nishizono, A. (2014). Efficient N-glycosylation at position 37, but not at position 146, in the street rabies virus glycoprotein reduces pathogenicity. *Virus Res*, 179, 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.10.015>
- Yıldırım, A. A., Doğan, A., Kurt, C., & Çetinkol, Y. (2022). Evaluation of our rabies prevention practices: Is our approach correct? *Iran J Public Health*, 51(9), 2128-2134. <https://doi.org/10.18502/ijph.v51i9.10568>

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Raporu

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 02/02/2022
TOPLANTI NO : 2022-3
DOSYA NO : 2022-16
KARAR NO : 2022-3-30

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Feray ALKAN'ın yaptığı; araştırmacı olarak Deniz Acun YILDIZ'ın katıldığı "Türkiye'de Saptanan Kuduz Viruslarının N, G, G-L Gen Bölgelerinin Genetik Analizi ve Moleküler Epidemiyolojisi" başlıklı çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" nin 7-h maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve çalışmanın Etik Kurul iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 01/03/2022-01/03/2024

ASLININ AYNIDIR
02/02/2022

Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

Ek-2. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü İzin Yazısı



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

GIDANKODU
GIDA KONTROL KODU

Sayı : E-71037622-806.01.03-1035577

01.04.2021

Konu : Doktora Tezi Hk.

VETERİNER KONTROL MERKEZ ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 30.03.2021 tarihli ve E-76899830-806.01.03[020]-1002167 sayılı yazınız.

İlgi yazı incelenmiş olup; söz konusu yazı içeriğinde belirtilen Enstitü Müdürlüğünüz personeli Veteriner Hekim Deniz ACUN YILDIZ'ın doktora tez konusu olarak "Türkiye'de Saptanan Kuduz Viruslarının N, G, G-L Gen Bölgelerinin Genetik Analizi ve Moleküler Epidemiyolojisi" çalışmasının Genel Müdürlüğümüz tarafından uygun olacağı değerlendirilmektedir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Selman AYAZ
Genel Müdür V.

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

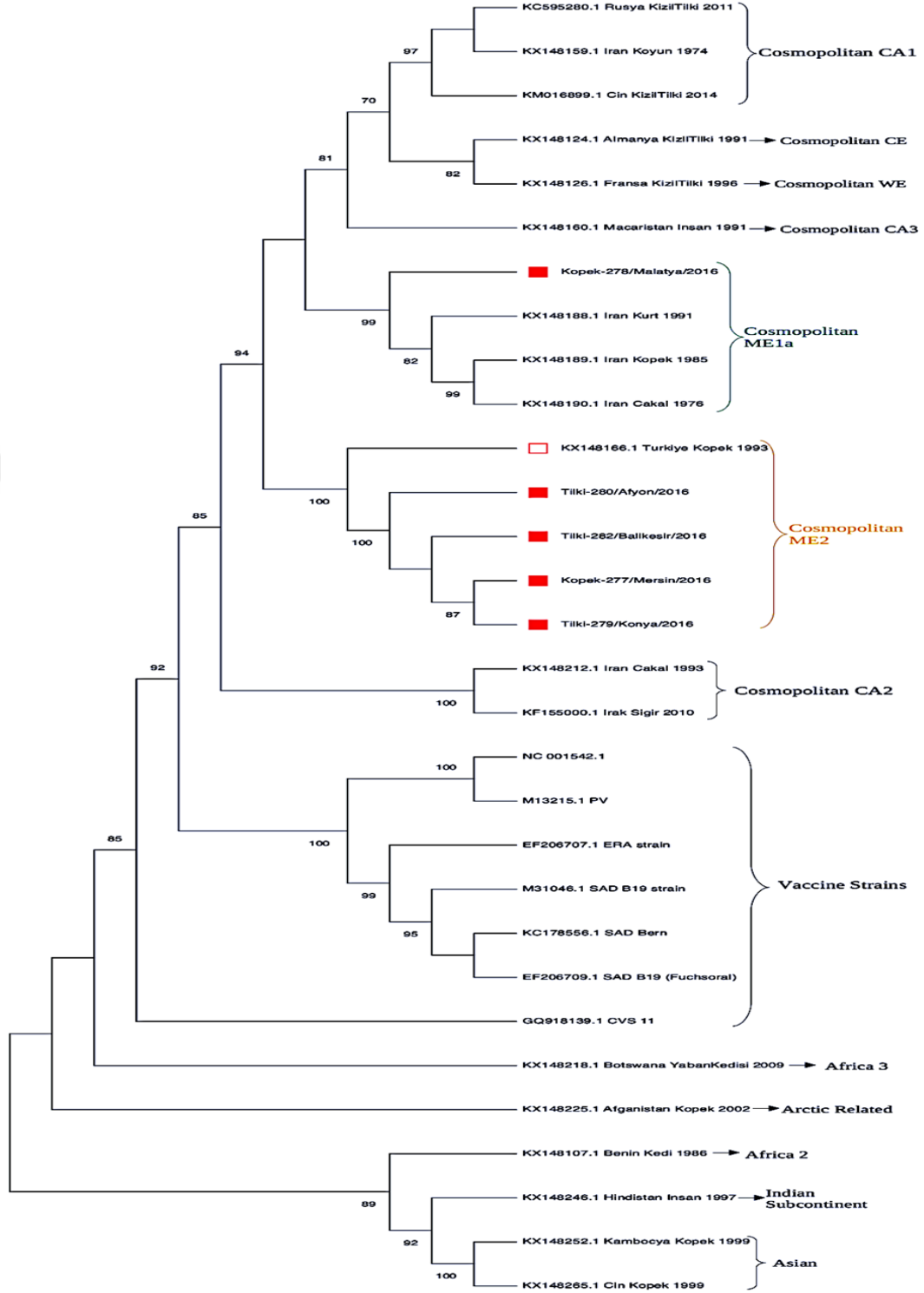
Doğrulama Kodu: 9A921A47-6841-4898-8029-72BB943EA51C

Doğrulama Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/tarim-ebys>

Bilgi için: Ali ŞİMŞEK
Veteriner Hekim
Telefon No: (312) 258 75 99



Ek-3.2016 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)



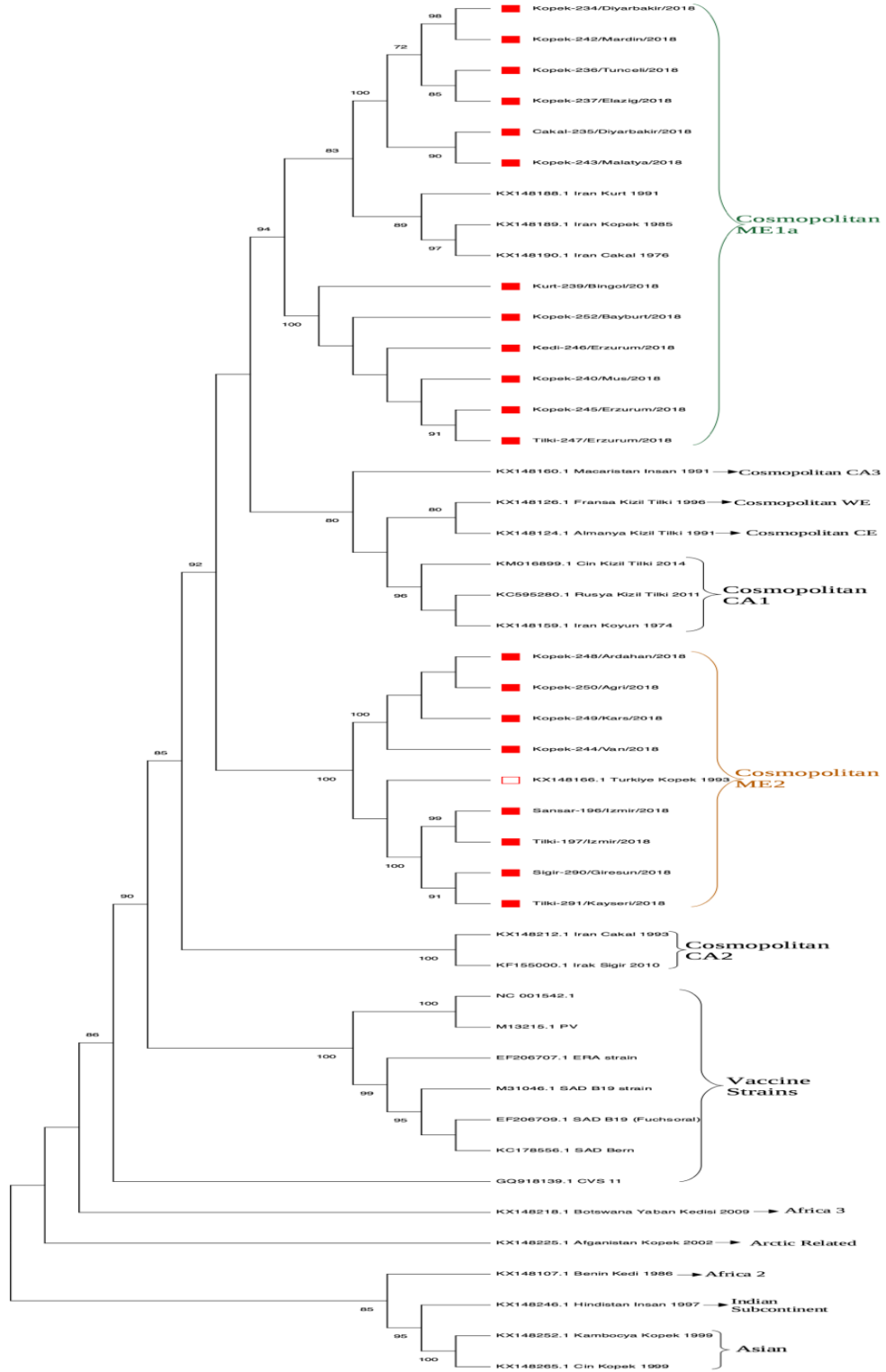
G-L intergenik bölge için bu çalışmada kullanılan 2016 yılına ait RABV ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait RABV'ların G-L intergenik bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz. % 70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

Ek-4. 2017 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)



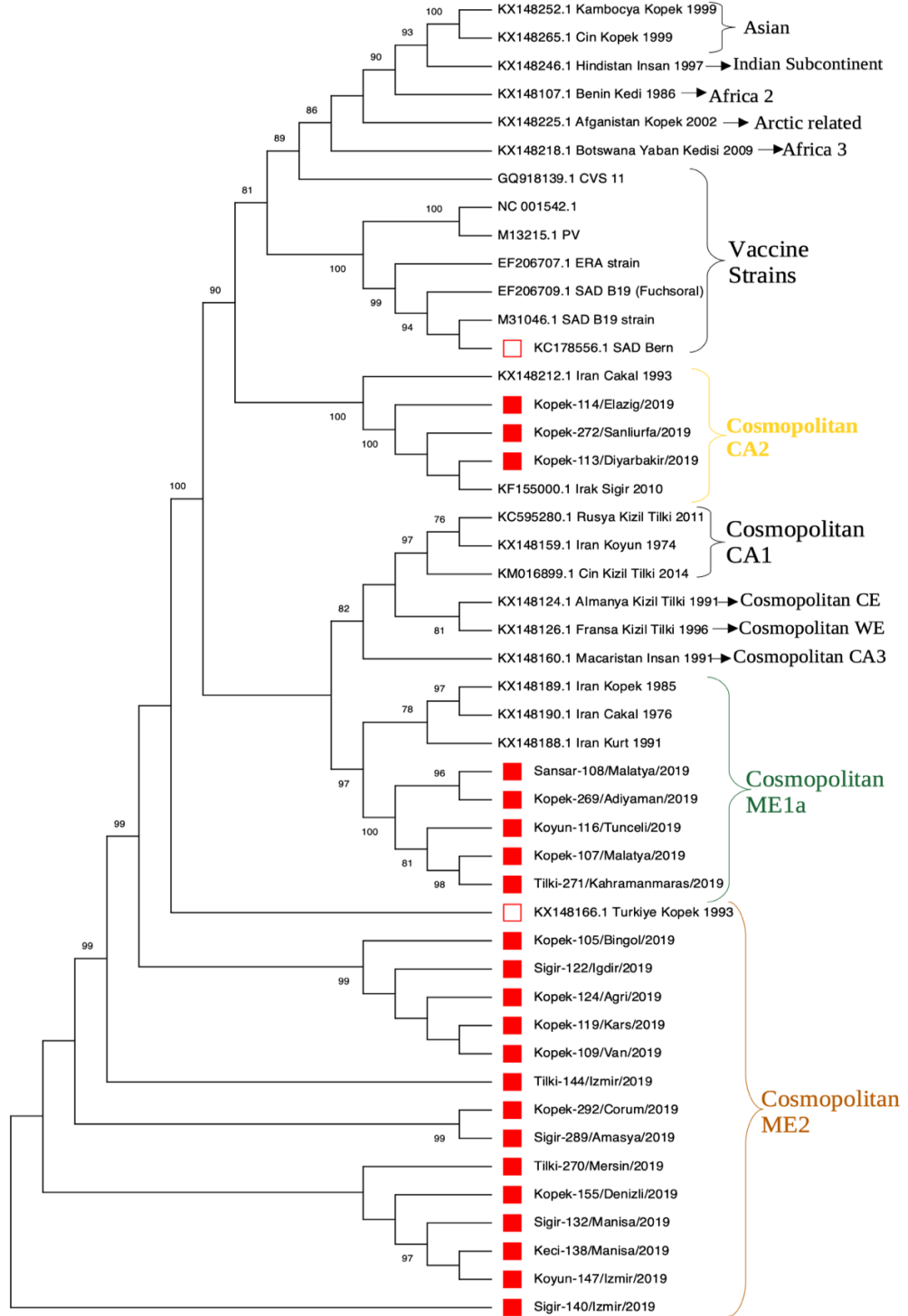
G-L intergenik bölge için bu çalışmada kullanılan 2017 yılına ait RABV ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait RABV'ların G-L intergenik bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz. % 70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

Ek-5. 2018 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)



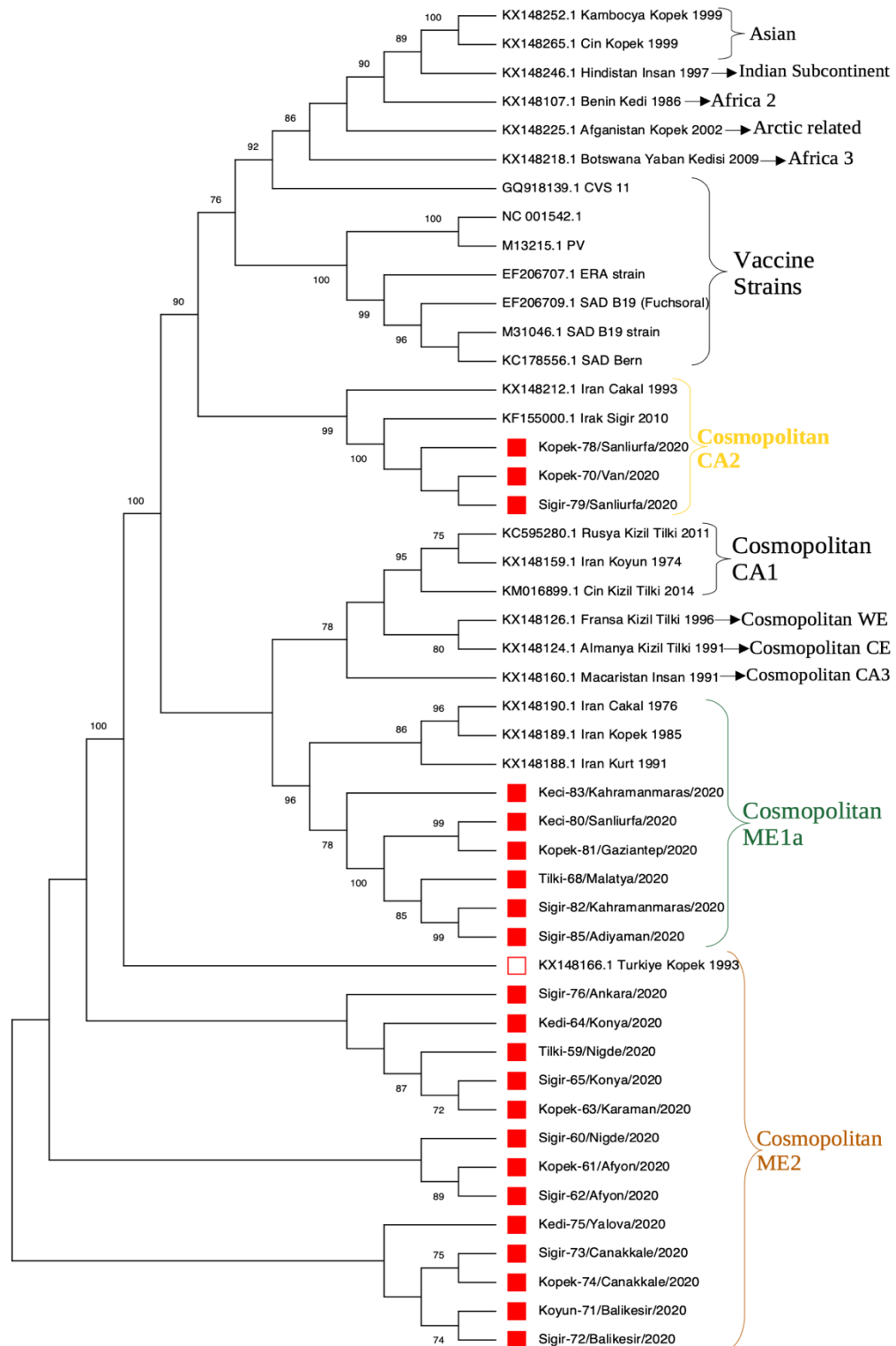
G-L intergenik bölge için bu çalışmada kullanılan 2018 yılına ait RABV ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait RABV'ların G-L intergenik bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz. % 70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

Ek-6. 2019 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)



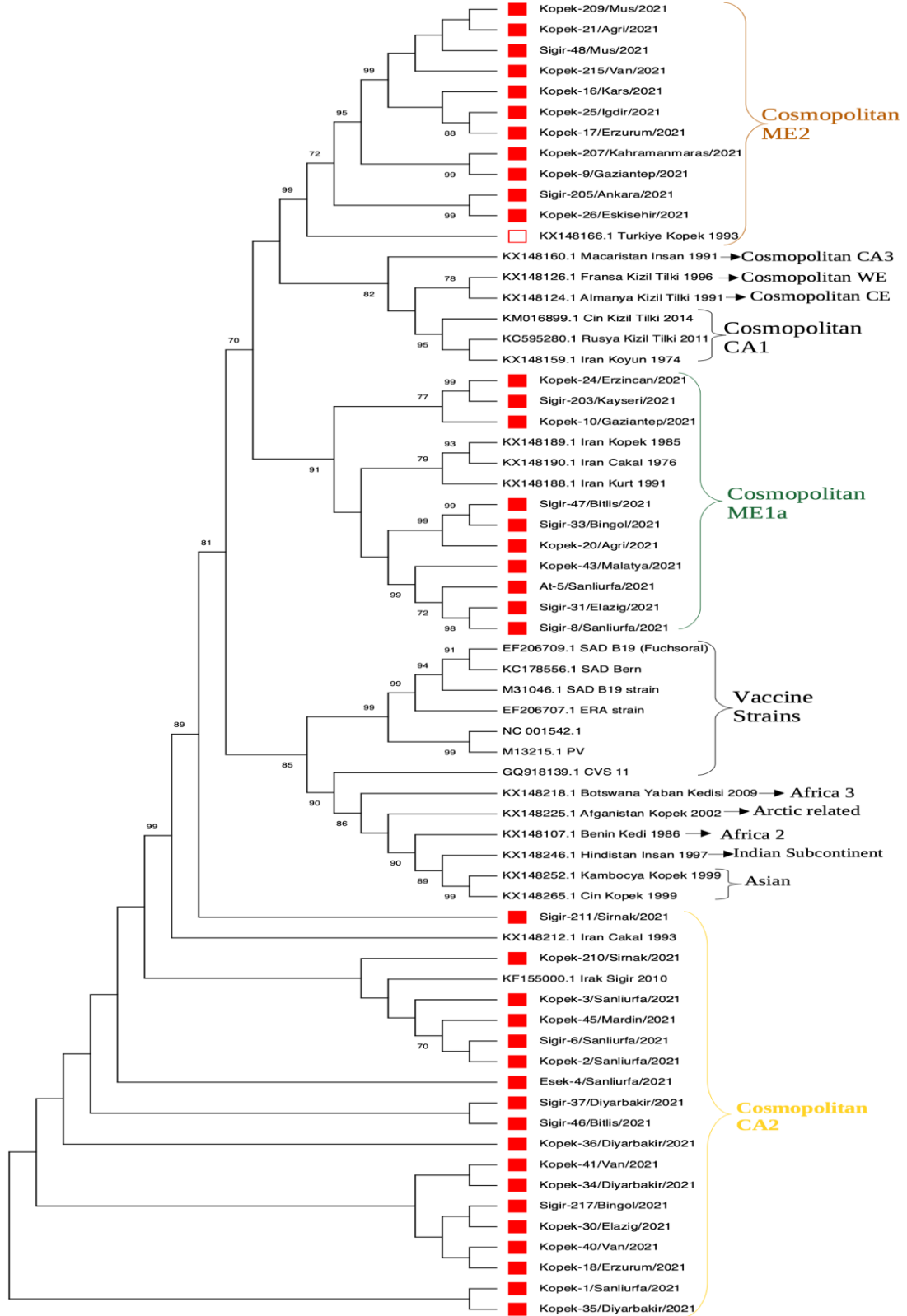
G-L intergenik bölge için bu çalışmada kullanılan 2019 yılına ait RABV ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait RABV'ların G-L intergenik bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz. % 70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi

Ek-7. 2020 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)



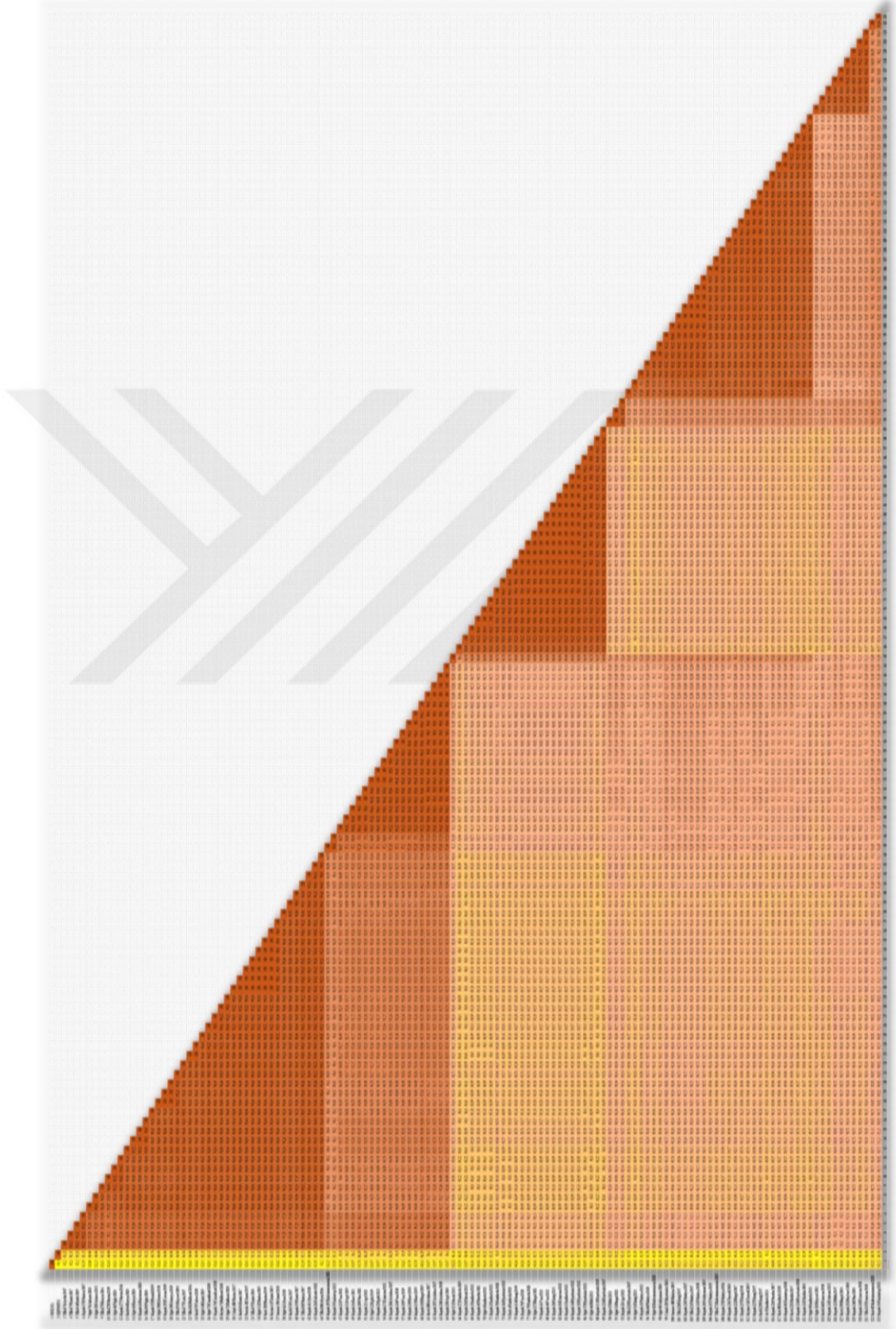
G-L intergenik bölge için bu çalışmada kullanılan 2020 yılına ait RABV ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait RABV'ların G-L intergenik bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz. % 70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler  ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise  ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi.

Ek-8. 2021 Yılı G-L İntergenik Bölgesine Ait Filogenetik Analiz (519 bp)



G-L intergenik bölge için bu çalışmada kullanılan 2021 yılına ait RABV ile GenBank'tan elde edilen diğer çalışmalara ait RABV'ların G-L intergenik bölgeleri kullanılarak yapılan filogenetik analiz. % 70 ve üzeri değerler gösterilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örnekler ■ ile, GenBanktan elde edilen diğer çalışmalara ait Türkiye örnekleri ise □ ile işaretlendi. Bu filogenetik analiz Maximum Likelihood metodu, T92+G modeli ve 1000 bootstrap tekrarı ile gerçekleştirildi.

Ek-9. Bu çalışmada elde edilen kuduz viruslarının G-L intergenik bölgelerinin benzerlik oranları



Ek-10. Filogenetik Analizlerde Kullanılan Diğer Çalışmalara Ait Kuduz Viruslarına İlişkin Bilgiler

Accession No	Ait Olduğu Yer	Tür	Yıl	Referans
KX148252.1	Kamboçya	Köpek	1999	Troupin vd., 2016
KX148265.1	Çin	Köpek	1999	Troupin vd., 2016
KX148246.1	Hindistan	İnsan	1997	Troupin vd., 2016
KX148218.1	Botswana	Yaban Kedisi	2009	Troupin vd., 2016
KX148107.1	Benin	Kedi	1986	Troupin vd., 2016
KX148227.1	Afganistan	Köpek	2004	Troupin vd., 2016
KX148101.1	Mısır	İnsan	1979	Troupin vd., 2016
GQ918139.1		Aşı suşu		Xue vd., 2013
DQ099524.1		Aşı suşu		
AB085828.1		Aşı suşu		Inoue vd., 2003
M13215.1		Aşı suşu		Tordo vd., 1986
NC_001542.1		Aşı suşu		Tordo vd., 1986
EF206709.1		Aşı suşu		Geue vd., 2008
M31046.1		Aşı suşu		Conzelmann vd., 1990
EF206707.1		Aşı suşu		Geue vd., 2008
KC178556.1		Aşı suşu		Cliquet vd., 2013
KX148162.1	Türkiye	Köpek	1993	Troupin vd., 2016
KX148166.1	Türkiye	Köpek	1993	Troupin vd., 2016
KX148212.1	İran	Çakal	1993	Troupin vd., 2016
KF155000.1	Irak	Sığır	2010	Marston vd., 2013
KX148160.1	Macaristan	İnsan	1991	Troupin vd., 2016
KX148125.1	Belçika	Kızıl tilki	1994	Troupin vd., 2016
KX148126.1	Fransa	Kızıl tilki	1996	Troupin vd., 2016
KX148113.1	Almanya	Kızıl tilki	1991	Troupin vd., 2016
KX148159.1	İran	Koyun	1974	Troupin vd., 2016
KC595280.1	Rusya	Kızıl Tilki	2011	Poleshchuk vd., 2013
KX148188.1	İran	Kurt	1991	Troupin vd., 2016
KX148189.1	İran	Köpek	1985	Troupin vd., 2016
KX148190.1	İran	Çakal	1976	Troupin vd., 2016
MZ391110.1	Hatay	Sigir	2014	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
JQ944706.1	Rusya	Kopek	2008	
KY860610.1	Ardahan	Kopek	2001	
MT079951.1	Gürcistan	Sığır	2016	Marston vd., 2013
AY352497.1	Gürcistan	İnsan		Kuzmin vd., 2004

MT079906.1	Gürcistan	Köpek	2015	Condori vd., 2023
DQ837474.1	Şanhurfa	İnek	2000	David vd., 2007
MZ391108.1	Elazığ	Sığır	2020	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
MZ391107.1	Hakkari	Sığır	2020	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
MK760682.1	İran	Köpek	2009	Dellicour vd., 2019
MK760747.1	İran	Kurt	2014	Dellicour vd., 2019
MK760684.1	İran	Köpek	2009	Dellicour vd., 2019
MK760756.1	İran	Köpek	2014	Dellicour vd., 2019
KX148175.1	Suudi Arabistan	Tilki	1998	Troupin vd., 2016
DQ837424.1	Ürdün	İnek	1998	David vd., 2007
KY860611.1	Ardahan	Köpek	2001	Marston vd., 2017
KY860606.1	Erzurum	Tilki	2001	Marston vd., 2017
JX987748.1	İran	Çakal	1996	
MK760669.1	İran	Kurt	2008	Dellicour vd., 2019
MK760751.1	İran	Köpek	2014	Dellicour vd., 2019
MZ391109.1	Diyarbakır	Sığır	2020	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
KY860604.1	Erzurum	Tilki	2000	Marston vd., 2017
KY860605.1	Erzurum	Tilki	2001	Marston vd., 2017
KX148184.1	İsrail	Sığır	1996	Troupin vd., 2016
DQ837483.1	İsrail	Tilki	1997	
KX148180.1	İsrail	Tilki	1993	Troupin vd., 2016
DQ837397.1	İsrail	Koyun	1999	
MK760718.1	İran	Köpek	2013	Dellicour vd., 2019
MK760746.1	İran	Köpek	2014	Dellicour vd., 2019
KY860612.1	Yavuzeli	Köpek	1989	
DQ837392.1	İsrail	Porsuk	2005	
DQ837480.1	İstanbul	Köpek	2000	
KX148163.1	Türkiye	Köpek	1993	Troupin vd., 2016
KX148164.1	Türkiye	Köpek	1993	Troupin vd., 2016
KX148165.1	Türkiye	Köpek	1993	Troupin vd., 2016
DQ837476.1	İstanbul	Köpek	2000	
DQ837477.1	İstanbul	Köpek	2000	
KY860609.1	İstanbul	Köpek	2001	Marston vd., 2017
DQ837479.1	İstanbul	Köpek	2000	
DQ837478.1	İstanbul	Köpek	2000	
DQ837475.1	İstanbul	Köpek	2000	
KX148167.1	Türkiye	Köpek	1993	Troupin vd., 2016

KY860593.1	İzmir	Tilki	2000	Marston vd., 2017
MZ391105.1	Balıkesir	Sığır	2000	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
KY860607.1	Bursa	Köpek	2001	Marston vd., 2017
KY860608.1	Bursa	Köpek	2001	Marston vd., 2017
MZ391104.1	Çanakkale	Sığır	2020	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
KY860596.1	Aksaray	Tilki	2014	Marston vd., 2017
KY860597.1	Aksaray	Köpek	2014	Marston vd., 2017
KY860594.1	Ankara	Tilki	2021	Marston vd., 2017
KY860600.1	Kırıkkale	Tilki	2014	Marston vd., 2017
KY860598.1	Ankara	Tilki	2014	Marston vd., 2017
KY860599.1	Ankara	Köpek	2014	Marston vd., 2017
KY860602.1	Konya	Köpek	2014	Marston vd., 2017
KY860601.1	Konya	Tilki	2014	Marston vd., 2017
KY860591.1	Kütahya	Tilki	2008	Marston vd., 2017
KY860583.1	İzmir	Köpek	1999	Marston vd., 2017
KY860585.1	İzmir	Tilki	2001	Marston vd., 2017
KY860587.1	Manisa	Tilki	2001	Marston vd., 2017
KY860589.1	İzmir	Tilki	2006	Marston vd., 2017
KY860592.1	Manisa	Tilki	2009	Marston vd., 2017
KY860590.1	İzmir	Tilki	2007	Marston vd., 2017
KY860586.1	Manisa	Tilki	2001	Marston vd., 2017
KY860595.1	Manisa	Tilki	2012	Marston vd., 2017
KY860603.1	Kırşehir	Köpek	2015	Marston vd., 2017
KY860588.1	Denizli	Tilki	2004	Marston vd., 2017
KY860584.1	İzmir	Tilki	1999	Marston vd., 2017
MZ391128.1	Şanlıurfa	Köpek	2014	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
MK760757.1	İran	Köpek	2014	Dellicour vd., 2019
KC791988.1	Irak	Köpek	2008	Kuzmina vd., 2013
KC791978.1	Irak	Köpek	2007	Kuzmina vd., 2013
KC791975.1	Irak	Köpek	2005	Kuzmina vd., 2013
MZ391125.1	Hatay	Sığır	2014	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
MN534897.1	Katar	Tilki	2018	
MN534896.1	Katar	Deve	2018	
MZ391132.1	Kahramanmaraş	Tilki	2013	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
MZ391124.1	Diyarbakır	Sığır	2020	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
KX148183.1	İsrail	Tilki	1993	Troupin vd., 2016
KX148179.1	İsrail	Çakal	1996	Troupin vd., 2016

MZ391131.1	Balıkesir	Tilki	2013	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
MZ391119.1	Çanakkale	Sığır	2020	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
MK754399.1	İran	Eşek	2014	
MK754412.1	İran	Kurt	2014	
MK760730.1	İran	Köpek	2013	
MK754405.1	İran	Koyun	2013	
MZ391120.1	Balıkesir	Sığır	2020	Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022
KX148225.1	Afganistan	Köpek	2002	Troupin vd., 2016
KX148124.1	Almanya	Kızıl tilki	1991	Troupin vd., 2016
KM016899.1	Çin	Kızıl tilki	2014	
MK760711.1	İran	Köpek	2013	Dellicour vd., 2019
KX148191.1	İsrail	Çakal	1993	Troupin vd., 2016
KX148176.1	Suudi Arabistan	Tilki	2004	Troupin vd., 2016
KX148169.1	Umman	Deve	1990	Troupin vd., 2016
KX148170.1	Umman	Tilki	1990	Troupin vd., 2016
KX148171.1	Birleşik Emirlikleri	Tilki	1991	Troupin vd., 2016
MK760719.1	İran	Çakal	2013	Dellicour vd., 2019
MK760680.1	İran	Köpek	2008	Dellicour vd., 2019
OQ603613.1	Gürcistan	Köpek	2020	Huaman vd., 2023
OQ603662.1	Gürcistan	Köpek	2020	Huaman vd., 2023
OQ603648.1	Gürcistan	Köpek	2020	Huaman vd., 2023
MK760690.1	İran	Köpek	2010	Dellicour vd., 2019

