



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KUDUZ VİRUSU FARKLI SAHA SUŞLARININ HÜCRE KÜLTÜRÜ ADAPTASYONU VE NÖTRALİZASYON ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yeşim TATAN ATICI

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU**

**ANKARA
2022**

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii

1.GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Amaç ve Kapsam	4
1.3. Etiyoloji	6
1.4. Sınıflandırma	13
1.5. Epidemiyoloji	18
1.6. Bulaşma	26
1.7. Virus Replikasyon Mekanizması ve Patogenez	27
1.7.1.Virusun dokulara inokulasyonu	27
1.7.2. Periferden sentral sinir sistemine virus göçü	28
1.7.3. Virus replikasyon siklusu	29
1.7.4. Merkezi sinir sistemi istilası	31
1.7.5. Merkezi sinir sisteminden sentrifugal salınım	31
1.8. Klinik Bulgular	32
1.9. Tanı	34
1.9.1. Antijen Tespiti	34
1.9.1.1. Direkt Floresan Antikor Testi (DFAT)	34
1.9.1.2. Direkt Hızlı İmmünohistokimya Testi (dRIT)	35
1.9.1.3. ELISA	36
1.9.2. Virus İzolasyonu	36
1.9.2.1. Fare inokulasyon testi (MIT)	37
1.9.2.2. Doku kültürü enfeksiyon testi (RTCIT)	37
1.9.3. Nükleik asit tespiti	38
1.9.3.1. Reverz Transkriptaz Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)	38
1.9.4. Serolojik testler	38
1.9.5. Elektron mikroskopi	39
1.9.6. Fixed Kuduz Virusü Suşları	40
1.9.6.1. Laboratuvar Suşları	40
1.9.6.2. Aşı Suşları	40
1.10. Korunma	41
1.10.1. Paranteral aşılar	41

1.10.1.1. Modifiye-canlı Enjektabl aşılar	41
1.10.1.2. İnaktif (Monovalan/polivalan) Enjektabl Aşılar	42
1.10.1.3. Rekombinant Vektör (Monovalan veya polivalan) Enjektabl Aşılar	42
1.10.2. Oral aşılama	42
1.10.2.1. Modifiye Canlı Aşı	43
1.10.2.2. Rekombinant Canlı Aşı	43
2.GEREÇ VE YÖNTEM	46
2.1. Gereç	
2.1.1. Virolojik ve Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Örnekler	46
2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	49
2.1.3. Kitler	50
2.1.4. Cihazlar	50
2.2. Yöntem	52
2.2.1. Floresan Antikor Testi (FAT)	52
2.2.2. Hücre Kültürlerine Virus İnokulasyonu	52
2.2.3. Monoklonal Antikorlar ile Virus Üreme Tespiti	53
2.2.4. Virus Titrasyonu	53
2.2.5. Floresan Antikor Virus Nötralizasyon (FAVN) Testi	54
2.2.6. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	55
2.2.7. Viral RNA'dan Reverz Transkriptaz Enzimi (RT) Yardımıyla Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	56
2.2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	57
2.2.9. PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforezi	59
2.2.10. Amplikonların Purifikasyonu	60
2.2.11. Dizin Analizi	61
2.2.12. Moleküler <i>in silico</i> analiz, Karakterizasyon ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması	62
3.BULGULAR	63
3.1. Floresan Antikor Testi Sonuçları	63
3.2. Hücre Kültürüne Virus İnokulasyonu ve Monoklonal Antikor Boyama Sonuçları	64
3.3. Virus Titrasyon Sonuçları	67
3.4. Floresan Antikor Virus Nötralizasyon Testi Sonuçları	68
3.5. Virolojik Kontrol Sonuçları	71
3.5.1. Viral Nükleik Asit İzolasyon Sonuçları	71
3.5.2. RT-PCR Sonuçları	72
3.5.3. Dizin Analizi ve Filogenetik Analiz Sonuçları	73
4.TARTIŞMA	89
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	107
ÖZET	110
SUMMARY	111
KAYNAKLAR	112
EKLER	140

Ek-1 Etik Kurul Raporu	140
Ek-2 Doktora Tezinin Çalışılmasına Tarım ve Orman Bakanlığı Onayı	141
Ek-3 Seroloji sonuçlarının istatistiki sonuçları	142
ÖZGEÇMİŞ	144



ÖNSÖZ

Kuduz, insan ve hayvan sağlığını etkileyen zoonoz tabiatlı, önemli ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biridir. Dünya çapında her yıl binlerce kişinin kuduz enfeksiyonundan öldüğü bilinmektedir. Ülkemizde de kuduz enfeksiyonu endemik olarak seyretmektedir. Enfeksiyon bulaşı kuduz hayvan tarafından ısırılma/çizik ya da enfekte salya ile direk mukoza teması sonucu gerçekleşir. Klinik semptomların ortaya çıkmasından sonra kuduza bağlı ölüm oranı %100'dür. Kuduz vakaları sonucu meydana gelen insan ölümlerinin hemen hemen çoğu (%99'a kadar) enfekte köpeklerin ısırmasıyla bulaşan klasik kuduz virusundan kaynaklanmaktadır.

İnsanlarda kuduzun önlenmesi için en etkili ve ekonomik yöntem; enfeksiyon zincirinde önemli yere sahip olan karnivorlara yönelik toplu kuduz aşılama kampanyalarıdır. Ülkemizde kuduz aşılması için yurtdışından ithal edilen paranteral ve oral aşılar ile karnivorların aşılama yapılmaktadır. Yerli kuduz aşısı üretiminin ülkemizin dışa bağımlılığını azaltıcı ve ekonomik açıdan fayda sağlayacağı gerçeğinden hareketle, ileride kullanılacak olası aşı adayı suşların belirlenmesine temel basamak olan saha viruslarının hücre kültürüne adaptasyon çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir. Bu bağlamda Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilim Dalı bünyesinde yürütülen bu doktora tezi planlanmış olup, TAGEM tarafından (TAGEM/HSGYAD/A/20/A5/P06/1858) desteklenmiş ve 01.01.2020- 2022 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren yalnızca tez çalışmamda değil her konuda yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Prof.Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU, Doç. Dr. Ayşe Zeynep

AKKUTAY YOLDAR hocalarıma doktora eğitimim boyunca yardım ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Bahattin Taylan KOÇ'a ve Eda ERDEM ŞAHİKESEN'e ve Viroloji Anabilim Dalının tüm araştırma görevlisi ile lisansüstü öğrencisi arkadaşlarıma ve idari personeline, Doktora eğitimim boyunca birlikte mesai yaptığım VKMAE Kuduz Teşhis Laboratuvarı personeline; tezimin maddi olanaklarını destekleyen TAGEM ve Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her aşamasında maddi manevi desteklerinden dolayı annem Zehra TATAN'a, ablam Yasemin Zeynep DENİZ'e ve her anımda yokluğunu hissettiğim şuan yanımda olamayan babam YAVUZ TATAN'a, doktora eğitimim boyunca sabrı ve ilgisi için eşim Enes Gazi ATICI'ya ve bana annelik duygusunu hissettiren bebeğime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

CVS	Challenge Virus Strain
SAD	Street Alabama Dufferin
PV	Pasteur Virus
dFAT	Direkt Floresan Antikor tekniği
VKMAE	Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
DKID	Doku Kültürü Enfeksiyöz Doz
PBS	Fosfat Buffer Saline
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
mg	Miligram
CO ₂	Karbondioksit
ATCC	American Type Culture Collection
FBS	Fötal Bovine Serum
MEM	Minimum Essential Medium
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FAVN	Floresan Antikor Virus Nötralizasyon
FAT	Floresan Antikor Tekniği
RABV	Rabies Virus
EDTA	Ethyline Diamine Tetra Acetic acid
TBE	Tris Borate
cDNA	Komplementer Deoksiribo-Nükleik Asit

dNTP	Deoksiribo-Nükleik-Asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PCR	Polimerase Chain Reaction
Na	Murine Neuroblastoma
BHK	Baby Hamster Kidney
Aa	Amino asit
UV	Ultra Viole
MIT	Mouse Inokulasyon Testi
RTCIT	Doku Kültürü Enfeksiyon Testi
dRIT	Direk Hızlı İmmunohistokimya Testi
DFAT	Direk Floresan Antikor Testi
RFFIT	Hızlı Odak İnhibisyon Testi
MÖ	Milattan Önce
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WOAH/OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Mononegavirales Taksonomik Düzeni	7
Şekil 1.2. Mononegavirales sınıfının filogenisi	8
Şekil 1.3. Rabies Virus Genomu	9
Şekil 1.4. Rabies virus genom yapısı	10
Şekil 1.5. Kuduz Virusu Glikoprotein geni diyagramı	11
Şekil 1.6. Lyssavirus filogenetik ilişkileri	18
Şekil 1.7. Tüm dünyada yarasa Lyssavirus izolatlarının coğrafik olarak dağılımı	20
Şekil 1.8. Memeli kuduz rezervuarlarının ve vektörlerinin küresel dağılımı	21
Şekil 1.9. Kuduz için Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Veritabanı	26
Şekil 1.10. Kuduz virusu yaşam döngüsü	30
Şekil 2.1. Kullanılan primerlerin genler üzerindeki yerleri	58
Şekil 3.1. Kuduz virus pozitif beyin örneklerinde floresan yeşil renkte Negri cisimcikleri görüntüsü	64
Şekil 3.2. Saha viruslarına ait N gen amplikonlarına ait jel görüntüsü	73
Şekil 3.3. Saha viruslarına ait G gen amplikonlarına ait jel görüntüsü	73
Şekil 3.4. RABV örneklerinin N gen yönünden amino asit benzerlik ve farklılık tablosu	78
Şekil 3.5. RABV örneklerinin tam G gen yönünden amino asit benzerlik ve farklılık tablosu	79
Şekil 3.6. N gen yönünden RABV filogenetik analizi.	80
Şekil 3.7. G gen yönünden RABV filogenetik analizi.	81
Şekil 3.8. RABV dizin analizi sonucu N gen antijenik bölge I ve III' de meydana gelen amino asit değişimleri	82
Şekil 3.9. RABV dizin analizi sonucu G gen ektodomain bölgesinde meydana	83

gelen amino asit değişimleri

Şekil 3.10. Saha örnekleri ve Kuduz Refernz viruslara ait N gen bölgesi
dizin analizlerinin a.a karşılaştırması 84

Şekil 3.11. Saha örnekleri ve Kuduz Refernz viruslara ait G gen bölgesi
dizin analizlerinin a.a karşılaştırması 86

Şekil 3.12. Seri pasajları yapılan saha ve referans virusların N gen filogenetik
analizi 87

Şekil 3.13. Hücre kültürü adaptasyonu sonrası Saha izolatı ve Kuduz
Referenz viruslara ait kısmi N gen bölgesi dizin analizlerinin a.a karşılaştırması 88



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Günümüzde lyssavirusların çeşitliliği ve taksonomisi	15
Çizelge 1.2. Lyssavirus cinsinin 7 genotipini temsil eden 24 genomun kodlama potansiyeli, genom boyutu (nükleotitlerde) ve G+C içeriği	17
Çizelge 2.1. 18 adet Kuduz pozitif saha örneğine ait bilgiler	47
Çizelge 2.2. Kuduz antikor varlığı bilinen serum örneklerine ait bilgiler	48
Çizelge 2.3. Reverse Transcriptaz Polimeraz Chain Reaksiyonu (RT-PCR) için mix hazırlanması	56
Çizelge 2.4. RT-PCR uygulama protokolü	57
Çizelge 2.5. RABV tanısı ve moleküler karakterizasyonu için kullanılan primer dizinleri	58
Çizelge 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) karışım bileşenleri	58
Çizelge 2.7. İlgili primerlere ait PCR döngü protokolleri	59
Çizelge 2.8. DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı ve Isı Döngüsü	61
Çizelge 3.1. Monoklonal antikor boyama sonucu hücre kültüründe üreme gösteren Kuduz saha virusları	66
Çizelge 3.2. Monoklonal antikor boyama sonucu hücre kültüründe üreme gösteren referenz kuduz virusları	67
Çizelge 3.3. Saha virusları hücre kültürü pasajları sonunda yapılan titrasyon sonuçları (DKID ₅₀ /ml)	67
Çizelge 3.4. Referenz Kuduz virusu ile hücre kültürü 3.pasaj sonunda yapılan titrasyon sonuçları (DKID ₅₀ /ml)	68
Çizelge 3.5. Kuduz antikor varlığı bilinen serum örneklerinin CVS, PV ve Saha suşu ile ayrı ayrı gerçekleştirilen FAVN testi sonucu	69
Çizelge 3.6. Farklı Kuduz aşıları ile aşılanmış serum örneklerinin Referenz viruslar ve Saha izolatu ile FAVN testi değerlendirmelerinde antikor titre dağılımları	71

Çizelge 3.7. Saha virusları viral nükleik asit miktarı (ng/uL)	72
Çizelge 3.8. RABV yönünden dizin analizi yapılan örneklerle ait bilgiler	74
Çizelge 3.9. Hücre kültürü adaptasyonu ile saha izolatları ve referenz suşların mutasyonları	88



1.GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Geçmiş insanlık tarihi kadar eskilere dayanan (M.Ö. 3500), Lyssavirus'ların neden olduğu Kuduz, sıcak kanlı memeli hayvanlar ve insanlar başta olmak üzere oldukça geniş bir konakçı spektrumuna sahip, merkezi sinir sistemini etkileyerek ölümcül ensefalite yol açan zoonoz viral bir enfeksiyondur. Fransız bakteriyolog Louis Pasteur'ün 1885'te enfekte sinir dokudan geliştirdiği liyofilize aşı ile başlayan Kuduz enfeksiyonu ile mücadele programları günümüzde de yürütülmesine rağmen, hastalık halen insan ve hayvan sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya çapında her yıl binlerce kişinin ölümüne neden olan Kuduz enfeksiyonunun %99'dan fazlası enfekte köpek temaslı bulaş hikayesi olan "Klasik Kuduz Virusu'ndan" (RABV) kaynaklanmaktadır (Alaifan ve Altamimi, 2019; Kassiri ve ark., 2018; Kuduz saha rehberi 2019; Obonyo ve ark., 2016 ve Sami ve Ennaji, 2020). Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE-WOAH) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) listesinde yer alan bu enfeksiyöz ajan, "Tek Sağlık" konsepti anlayışını harekete geçirerek Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Kuduz Kontrolü için Küresel İttifak (GARC) kuruluşlarının da dahil olduğu işbirliği programının oluşumuna da aracılık etmiştir. Bu bağlamda; 2030 yılına kadar "köpek aracılı Kuduz enfeksiyonu ile sıfır insan ölümü" sloganı ile "United Against Kudues'' olarak bilinen, küresel anlamda bir ortaklık gerçekleştirilmiştir. Kuruluşun hedefleri doğrultusunda; köpek popülasyonlarının yönetimi ile enfeksiyon bulaşını önlemek, köpeklerin aşılması ile sürü bağışıklığını sağlamak, maruziyet sonrası profilaksi ve bakım hizmetleri sağlamak gibi çok yönlü stratejiler planlanmıştır (<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/new-global-strategic-plan-to-eliminate-dog-mediated-rabies-by-2030>; WHO, 2018c).

Bu enfeksiyonla mücadele kapsamında alınması gereken kontrol önlemlerinin belirlenmesi için, yüksek yayılım potansiyeline sahip sirkülasyondaki Kuduz saha virus varyantlarının genotiplendirilmesi büyük önem taşımaktadır (Denduangboripant ve ark., 2005 ve Smith ve ark., 1991). Ülkemizde Kuduz hastalığının sürveyansı ve moleküler karakterizasyonu ulusal referans merkez olan Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü sorumluluğundadır (Aylan ve ark., 1998).

Kuduz karşı etkin bir tedavi yöntemi bulunmadığından hedef hayvan türünün aşılması, etken yayılımının engellenmesi bakımından mücadele programlarının temel basamağını oluşturmaktadır (Garg, 2014). Ülkemizde Kuduz eradikasyonuna yönelik mücadele programında, 3 aylıktan büyük evcil karnivorlara ithal inaktif Kuduz aşısı, yaban hayattaki karnivorlara ise oral yolla havadan yapılan aşılama programında canlı aşı uygulaması (bait) yapılmaktadır.

Tüm dünyada Kuduz enfeksiyonuna karşı immün koruma sağlamak amacıyla kullanılan tüm Kuduz aşıları, filogrup 1 içerisinde bulunan Klasik Kuduz virusundan (RABV) (Genotip 1) köken almaktadır (OIE, 2013). Ancak farklı filogruplarda yer alan Lyssaviruslarının farklı coğrafyalarda enfeksiyonun yayılımından sorumlu olabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca filogruplar arasındaki kros nötralizasyonun düşük ve/veya hiç olmayabileceği ihtimalleri de gözardı edilmemelidir. Bu nedenle etkin ve etkili korunmayı sağlayabilmek için o coğrafyaya ait saha viruslarının genetik ve antijenik farklılıklarının ortaya konulması önem arz etmektedir.

Bu sebeple, ülkemizde sirküle olan yerel saha izolatlarından kazanılacak inaktif Kuduz aşısının evcil hayvanlarda kullanımı ile söz konusu enfeksiyona karşı oluşacak immün yanıtta daha etkili olacağı düşünülmektedir. Bu doktora tez konusu kapsamında; ülkemizde sirküle olan 5 farklı coğrafi bölgeden (Akdeniz, Marmara, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu), 5 farklı hayvan türüne (Sığır n:8, Tilki n:4, Köpek n:3, Eşek n:2, Porsuk n:1) ait 18 adet Kuduz pozitif saha örneğinin moleküler karakterizasyonları N ve G gen bölgelerinin tüm genom analizi ile

değerlendirilmiş olup, tüm saha örnekleri 3 farklı hücre kültürü (BHK-BSR (Clone13), VERO (E6) ve Murine Neuroblastoma (Na 42/13)) kullanılarak seri pasajlara alınmıştır. Çalışma sonucunda izolat kazanımı (n=3) gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, farklı ticari aşılarla aşılanmış kedi ve köpeklerden Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü bünyesinde araştırılmak üzere gönderilen 72 adet kan serumu örneği tez çalışması için ayrılmış olup, gerek kuduz referans virusları gerekse bu çalışmada kazanılan saha izolatları ile teste alınarak antikor miktarları araştırılmıştır. Elde edilen saha izolatına karşı tespit edilen antikor yanıtın, referans viruslarla yapılan nötralizasyon test sonuçlarıyla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Böylelikle ileride söz konusu saha izolatlarının referans suş adayı olabilme kapasiteleri sorgulanmıştır. Aynı zamanda, saha suşlarının hücre kültürlerine adaptasyonu ile elde edilen izolatların, ileride olası aşı çalışmalarında kullanılabilmesine imkan sağlanmıştır.

1.2. Amaç ve Kapsam

Ülkemizde varlığı uzun yıllardan beri bilinen Kuduz virusuna ait ilk filogenetik bilgi, Avrupa genelinde yapılan bir araştırmada Türkiye’den iki örneğin kısmi genom analizlerinin yapılmasıyla edinilmiştir (Bourhy ve ark., 1999). Ayrıca Türkiye’de varlığını sürdüren Kuduz virusunun Orta Doğu ve Doğu Avrupa viral popülasyonları arasında aracı bir pozisyonda yer aldığı verisi de bir başka literatür bilgisinde sunulmuştur (Johnson ve ark., 2010c). Sekans analizleri ile Kuduz virusunun ülkemizde üç dallı yayılım gösterdiği sonucuna varılarak suşların coğrafik orijinleri ile ilişkili olarak Doğu, Batı ve Kafkas olarak adlandırılmıştır (Johnson ve ark., 2003). Batı dalı; ülkemizin batısındaki illerde (İstanbul, İzmir, Manisa ve Bursa gibi) bulunan suşlardan oluşmaktayken (Johnson ve ark., 2003), zaman içerisinde hastalığın önceden görülmediği güney ve doğu illerine doğru yayılım gösterdiği belirlenmiştir (Johnson ve ark., 2006). Doğu dalı; Türkiye’nin doğu illerinde (güneyde Gaziantep ve kuzeyde Ardahan dahil) bulunan suşları barındırmakta olup (Johnson ve ark., 2003), bu grupta yer alan örneklerin Orta Doğu bölgesinde bulunan ülkelerden elde edilenlerle yakınlık gösterdiği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2003 ve Johnson ve ark., 2013). Doğu ve Batı dalında yer alan Kuduz viruslarının ana rezervuarı evcil köpekler olmakla birlikte, her iki dala ait örnekler tilkilerden de izole edilmiştir (Johnson ve ark., 2010c ve Johnson ve ark., 2013). Doğu grubu içerisinde yer alan Ardahan ilinden bazı örnekler, sınır komşusu Gürcistan örnekleri ile yakın ilişkili bulunarak Kafkas dalı olarak adlandırılmıştır (Johnson ve ark., 2013; Johnson ve ark., 2003). Ülkemizde Kuduz virusu saha suşlarının coğrafi kökenlerine (Doğu/Batı/Kafkas) göre adlandırıldığı çalışmalar bildirilmiş olup (Johnson ve ark., 2003), güncel nomenklatür Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi’ne (ICTV) göre filogenetik olarak yapılmaktadır. Ülkemizdeki Kuduz virusu saha suşlarının mevcut durumuna ait son makale 2022 yılında yayınlanmış olup, bu doktora tez çalışmasında kullanılan örnekleri kapsamaktadır. Buna göre elde edilen tüm saha suşlarının Cosmopolitan dalında yer aldığı tespit edilmiştir (Tatan Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022).

Bu tez çalışmasının amaç ve kapsamı aşağıda özetlenmiştir:

1. Türkiye orijinli Kuduz saha suşlarından farklı hücre hatları kullanarak izolat kazanılması,
2. Ülkemizde 2013 ve 2020 yılları arasında sirküle olan Kuduz virusu saha örneklerinin Nükleoprotein (N) ve Glikoprotein (G) gen bölgelerinin tüm genom analizlerinin yapılması,
3. Evcil ve vahşi hayvan orijinli kuduz virusu saha suşlarının filogenetik analizler sayesinde moleküler karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi,
4. Hücre hatlarına adaptasyonları gerçekleştirilen Kuduz saha izolatlarının, aşılanmış hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde kuduz virusu spesifik antikor varlığını tespit edebilme yeteneklerinin sorgulanması ve referenz virusların nötralizasyon aktiviteleri ile karşılaştırılması,
5. Elde edilen izolatların ileride olası referenz suş olarak kullanılabilmesi potansiyellerinin araştırılması,
6. Farklı hücre kültürlerine adapte edilebilen izolatların tüm N ve G gen bölgelerindeki nükleotid değişimlerinin aminoasit düzeyinde farklılaşmaya neden olup olmadıklarının tespit edilmesi ve değerlendirilmesi
7. Bu kapsamda Ülkemiz orijinli saha izolatlarının yerli Kuduz aşısı üretimine katkı sağlayabilmesi adına yeni araştırma projelerine hammadde (aşı suşu) olarak hizmet etmesi hedeflenmiştir.

1.3. Etiyoloji

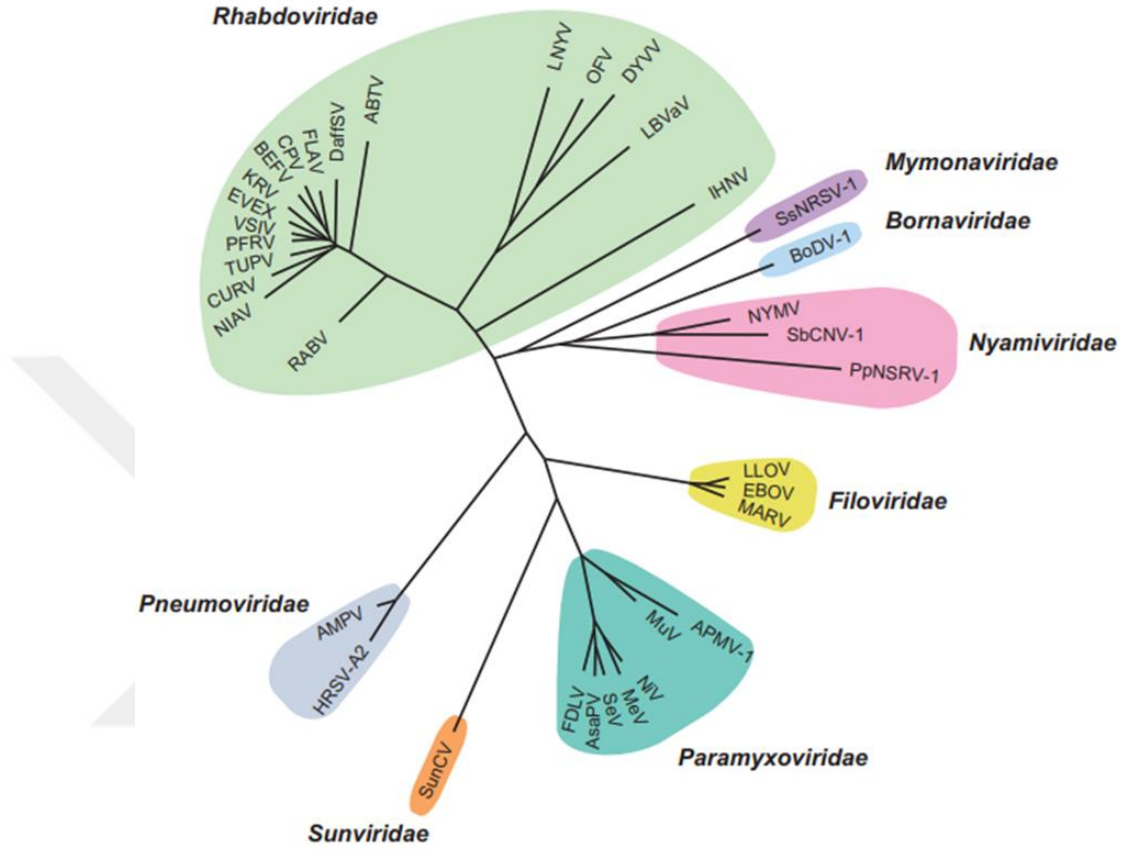
Kuduz virusu taksonomik düzene göre; *Mononegavirales* takımı, *Rhabdoviridae* ailesi içerisinde *Alpharhabdovirinae* alt ailesinde yer alan *Lyssavirus* genusunda bulunur (de Melo ve ark., 2020; Dietzgen ve ark., 2012 ve Müller ve ark., 2015) (Şekil 1.1). Tüm *Mononegavirales* takımı virusları tek parçalı genoma sahip olup (*Orchid fleck virus* istisna duruma sahiptir (Kondo ve ark., 2006)), uzunlukları ~ 9 kb ile ~19 kb arasında değişmektedir (Conzelmann, 1998; Lamb, 2013; Pringle, 1997 ve Whelan ve ark., 2004). Bu ortak tek parçalı genom yapısı; etkili enfeksiyon oluşturmak için gereken miktarda viral protein sentezinde görev alır. Bu takımda bulunan sekiz viral aile ve yüzden fazla virusun tamamı, konakçı hücreden köken alan zarf ile çevrili olup, korunaklı transkripsiyon mekanizması sayesinde virusa ait temel gen düzeninin korunmasını sağlar (Amarasinghe ve ark., 2017; Assenberg ve ark., 2010 ve Kuhn ve ark., 2013).

– Family: <i>Rhabdoviridae</i>	Order: <i>Mononegavirales</i>	18
– Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	Family: <i>Rhabdoviridae</i>	18
+ Genus: <i>Almendravirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Alphanemrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Alphapaprhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Alpharicrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Amplivivirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Arurhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Barhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Caligrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Cetarhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Curiovirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Ephemerovirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Hapavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Ledantavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Lostrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Lyssavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	Click for details 18
+ Genus: <i>Merhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Mousrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Ohlsrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Perhabdovirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Replylivirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Sawgrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Scophrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Sigmavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Siniperhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Sprivivirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Sripuvirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Sunrhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Tibrovirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Tupavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Vesiculovirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18
+ Genus: <i>Zarhavirus</i>	Subfamily: <i>Alpharhabdovirinae</i>	18

Şekil 1.1. Mononegavirales Taksonomik Düzeni
(<https://ictv.global/taxonomy> Erişim Tarihi: 18 Ağustos 2022).

Rhabdoviridae ailesi içinde omurgalılar, omurgasızlar ve bitkilerde çoğalan 18 tür virus bulunmaktadır. *Lyssavirus* (Kuduz virusu ve Kuduz benzeri viruslar), *Vesiculovirus* (vesicular stomatitis virusları ve benzeri viruslar), *Ephemerovirus* (bovine ephemeral fever virusu ve benzeri viruslar) ve *Tibrovirus* gensunda bulunan etkenler memelileri enfekte ederken, *Tupovirus* kuşlar için patojendir (Calisher ve Ellison, 2012 ve Da Poian ve ark., 2005). *Novirhabdovirus* (aquatic vertebrallıların infeksiyöz hematopoetik nekrozisi virusları ve benzeri viruslar), *Perhabdovirus* ve *Sprivivirus* balıkları, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Dichorhavirus* ve *Varicosavirus* bitkileri enfekte etmektedir (Calisher ve Ellison, 2012 ve Falzarano ve ark., 2006). *Almendravirus*, *Sigmavirus*, *Ledantavirus*, *Peropuvirus* ve *Hapavirus* ise

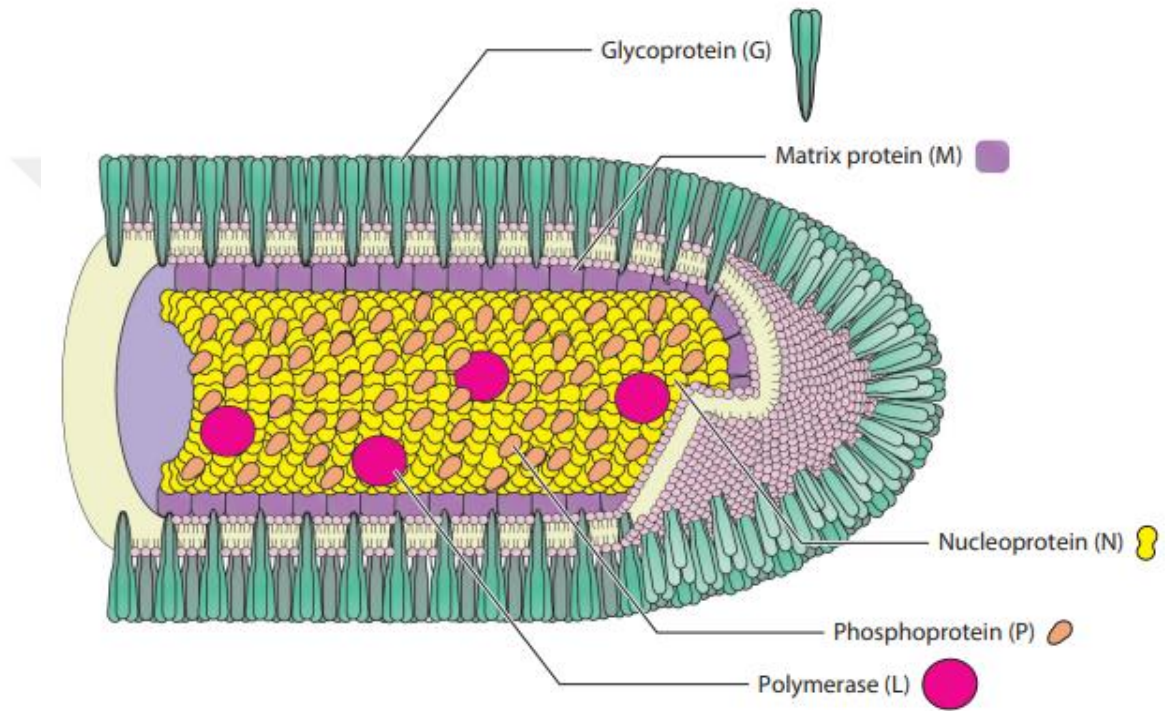
eklembacaklı popülasyonu için patojen olan virus türleridir (Blasdell ve ark., 2015; Contamine, 2008; Contreras ve ark., 2017 ve Wang ve ark., 2017) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Mononegavirales sınıfının filogenisi (Ortega ve ark., 2018).

Rhabdoviruslar yaklaşık 70 nm çapında ve 170 nm uzunluğunda zarflı RNA viruslardır. Helikal simetriye sahip nükleokapsit glikoprotein peplomerli lipid zar ile çevrelenerek viriona mermi/koni şeklini vermektedir (Şekil 1.3). Kuduz virusu 4,6 x 10⁶ kDa moleküler ağırlıkta, negatif polariteli, tek sarmallı (ssRNA), 11-12 kb uzunluğunda ve segmentsiz tek parçalı genoma sahiptir (Doymaz, 2000; White ve Fenner, 1994 ve Zakowski ve Wagner, 1980). Virus konakçı dışında canlı kalabilen yapıya sahip değildir. Lipid solventlere (sabun solüsyonları, eter, kloroform, aseton), % 45-70' lik etanole, iyodin preparatlarına ve kuaterner amonyum bileşiklerine karşı

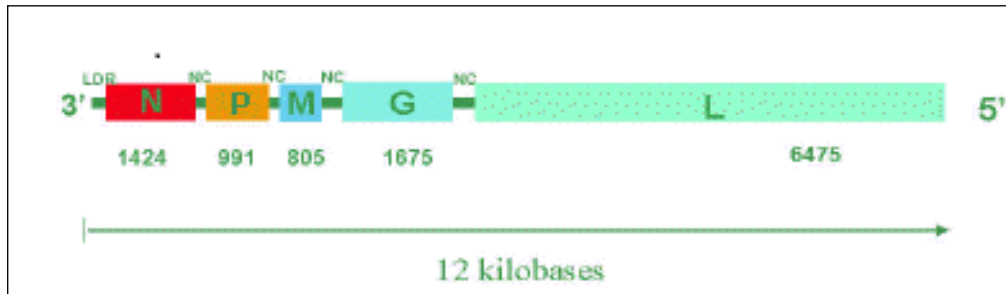
hassas olup, güneş ışığı, ısı ve UV ile kolayca inaktive edilebilmektedir (Leung ve ark., 2007; Meslin ve ark., 1996 ve Murphy ve ark., 1999;). Rhabdovirus virionları oldukça iyi korunmuş 5 majör protein ihtiva etmektedir ve Lyssavirus cinsinde sırasıyla 3'-N-P-M-G-L-5'proteinleri şeklindedir (White ve Fenner, 1994 ve Yousef ve ark., 2012).



Şekil 1.3. Rabies Virus Genomu (Davis ve ark., 2015).

Lyssavirus genom organizasyonunda viral RNA ile N, P ve L proteinleri Ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturur. Konak hücre sitoplazmasında genomik transkripsiyon ve replikasyondan sorumlu olan bu kompleks viral membran proteinleri G ve M ile çevrilidir. Glikoproteini kodlayan G geni viral zarf yüzeyi üzerinde konumlanır ve virus nötralize edici antikorları etkili bir şekilde uyarabilir (Albertini ve ark., 2006; Albertini ve ark., 2011b; Drings ve ark., 1999; Fooks ve ark., 2014; Jackson, 2002 ve Zhu ve Guo, 2016). Glikoprotein (G), virusun konak hücreye

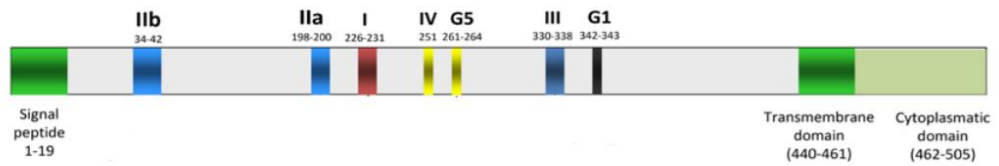
girişine aracılık eden hedef hücre (miyositler, nöronlar ve tükürük bezi asinüsleri) reseptörlerine bağlanmasından sorumlu olmanın yanı sıra RABV'nin patojenite ve nörovirulansında da önemli rol oynamaktadır (Etessami ve ark., 2000; Nagaraja ve ark., 2018; Wunner, 2002 ve Yousef ve ark., 2012). Nöral hücre adezyon molekülü (NCAM) (Thoulouze ve ark., 1998), p75 nörotrofin reseptörü (P75NTR) (Tuffereau ve ark., 1998 ve Tuffereau ve ark., 2001) ve Asetilkolin reseptörleri (nAchR) (Lentz ve ark., 1982) gibi birkaç reseptörün Kuduz virusunun hücreye bağlanma ve girişinde rol oynadığı görülür (Assenberg ve ark., 2010). Son yıllarda merkezi sinir sisteminde bol miktarda bulunan Metabotropik glutamat reseptör alt tipi 2'nin (mGluR2), glikoprotein ile etkileşime girerek virusun hücreye girişine aracılık eden yeni bir reseptör olduğu tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2018). G proteini aynı zamanda hayvanlarda kuduz enfeksiyonuna karşı tam koruma sağlanması için gerekli olan hücresel ve humoral immun yanıt ile doğuştan gelen immun yanıtın uyarımı için önemli bir belirleyicidir (Davis ve ark., 2015 ve Zhang ve ark., 2013). Bu yapısal proteinin moleküler yapısında meydana gelen herhangi değişiklik Kuduz virusunun immunolojik karakteri, antijenitesi ya da patojenitesinde bir değişikliğe neden olabilmektedir.



Şekil 1.4. Rabies virus genom yapısı (<http://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>).

524 amino asite sahip olan trimerik yapıdaki G proteini sinyal peptid (19 aa), ektodomain (1-439 aa), transmembran domain (440-461 aa) ve sitoplazmik uç (462-505 aa) olmak üzere dört alandan oluşmaktadır (Badrane ve Tordo, 2001; Fernando ve ark., 2016; Jaiswal ve ark., 2018; Kuzmina ve ark., 2013a; Kuzmina ve ark., 2013b ve Wunner ve ark., 1988). Ektodomain ve sitoplazmik alan virusun patojenitesi ve bağışık

yanıttan kaçınmadan sorumlu bölgelerdir (Coulon ve ark., 1998; Huang ve ark., 2017; Prehaud ve ark., 2010 ve Virojanapirom ve ark., 2012). Ektodomain, reseptör tanıma ve membran füzyonunda sorumlu bölgeler ile nötralize edeci antijenik altı alana sahiptir; antijenik bölge I (226-231 amino asit arasında hem linear hem konfirmasyonel epitoplara barındırır) (Marissen ve ark., 2005), antijenik bölge II (34 ila 42 amino asit – (IIb) ve 198 ila 200 amino asit – (IIa) arasında konfirmasyonel epitoplara sahiptir), antijenik bölge III (330 ila 338 amino asit arasında), antijenik bölge IV (251. amino asit), G1 olarak da adlandırılan küçük bölge “a” (342-343 amino asit) ve G5 antijenik bölgesi (261-264 amino asitleri arasında lineer bir epitoptur ve antijenik bölge VI’ ü de içinde barındırır) olarak adlandırılmaktadır. Antijenik bölge III virülans ile ilişkili bölge olarak tanımlanmaktadır. Bu bölgede meydana gelen amino asit değişimleri viral patojenitede farklılıklar ve nötralizan antikorlara karşı direnç oluşumunda etkilidir (Badrane ve ark., 2001a; Benjathummarak ve ark., 2016; Kuzmina ve ark., 2013b; Lafon ve ark., 1983; Seif ve ark., 1985 ve Wang ve ark., 2019b). Ektodomain bölgedeki amino asit farklılıklarından dolayı Lyssavirus genusundaki tüm kuduz virusu suşları antijenik olarak benzerlik göstermezler. Bu sebeple farklı filogruplarda yer alan kuduz virusuna ait anti serumlar ile cros nötralizasyon göstermezler (Warrell ve Warrell 2004; Singh ve ark., 2017).



Şekil 1.5. Kuduz Virusu Glikoprotein geni diyagramı (Kuzmina ve ark. 2013b’den alınmıştır).

Matriks proteini (M) viral zarfın altında bulunur ve zar ile nükleokapsid arasında köprü görevi görmektedir. Nükleokapsidi yoğunlaştırarak mermi şeklindeki Lyssavirus virionu görünümünü verir. Aynı zamanda çift katmanlı lipid tabaka ve glikoprotein ile de ilişkilide olan M proteinin (Albertini ve ark., 2011b; Dancho ve ark., 2009; Manie ve ark., 2000; Mebatsion ve ark., 1999 ve Solon ve ark., 2005) virus

oluşumu ve tomurcuklanmada önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Assenberg ve ark., 2010 ve Wunner, 1991).

Nükleoprotein (N), Lyssavirus proteinleri içinde en fazla korunaklı yapıya sahip olan ve 450 amino asitten oluşan fosforile bir proteindir. Lyssavirus genusundaki farklı kuduz virus suşları N proteinleri bakımından yüksek derecede homoloji göstermektedir. Yapısında pek çok antijenik ve immunodominant alan içeren N gen bölgesi; Lyssavirusların grup spesifitesinin belirlenmesi, virusun transkripsiyon ve replikasyon basamaklarında önemli bir role sahiptir (Hazar ve ark., 2000; Nandi ve Kumar, 2011; Wunner, 1991 ve Yang ve ark., 1998). Nükleoprotein, viral etken ile enfeksiyon sırasında doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin baskılanmasında hayati bir role sahiptir ve kuduz virusunun beyin ve merkezi sinir sisteminde yayılmasına izin verir (Masatani ve ark., 2010; Masatani ve ark., 2011 ve Masatani ve ark., 2013). Kuduz virusuna spesifik temel işlemlerin sürdürülebilmesi için N gen bölgesinin yüksek korunaklı bölge olması esastır ancak kısa segmentlerdeki amino asit farklılıkları genotipler arasında genetik çeşitliliğe sebep olmaktadır (Kuzmin ve ark., 2005 ve Wunner, 2007). N genine ait nükleotid sekans bilgileri kuduz virusunun dünyada coğrafik dağılımının belirlenmesi, genetik tiplendirme ve evrimsel çalışmalar için moleküler marker olarak kullanılmaktadır (Bourhy ve ark., 1993 ve David ve ark., 2000).

N proteini üzerindeki antijenik bölge I ve IV ile antijenik bölge II ve III'ün sırasıyla lineer ve konformasyona bağlı epitoplardan oluşmaktadır (Goto ve ark., 2000 ve Minamota ve ark., 1994). Antijenik bölge I (374~383 amino asit) ve III (313~337 amino asit), RNA genom enkapsidasyonu ve viral replikasyon için gerekli olan aktif bir sitoplazmik ribonükleaz kompleksinin oluşumunda rol oynamaktadır (Yang ve ark., 1998 ve Yang ve ark., 2011). N geninde antijenik bölge IV 359-366 ve 375-383 amino asit pozisyonları arasında iki bağımsız epitop olarak belirlenmiş ve T hücresi epitopu olarak da tanımlanmaktadır (Goto ve ark., 1995; Goto ve ark., 2000; Minamoto ve ark., 1994 ve Mochizuki ve ark., 2011).

Fosfoprotein (P), polimeraz L için katalitik olmayan bir kofaktör olmanın yanı sıra konak interferon aracılı antiviral savunmanın bozulmasında görev almaktadır (Rieder ve Conzelmann, 2011). 299 amino asitten oluşan P proteini yapısal olarak üç bölgeden oluşmaktadır; N-terminali (P_{NTD}), proteinin merkezi (P_{CED}) ve C-terminali (P_{CTD}) (Gerard ve ark., 2009; Ivanov ve ark., 2010 ve Jacob ve ark., 2001).

L geni, transkripsiyon ve replikasyon için gerekli çoklu enzimatik aktiviteleri gerçekleştirilmesinden sorumludur (Abraham ve ark., 1975; Barr ve ark., 1997; Barr ve Wertz 2001; Grdzlishvili ve ark., 2005; Hercyk ve ark., 1988; Li ve ark., 2006 ve Moyer ve Banerjee, 1975). RNA bağımlı RNA polimeraz olarak işlev gören ve Lyssavirus genom yapısında en büyük alana sahip L proteini; şablon bazlı RNA sentezinin katalizlenmesi, mRNA kaplama, 5' ucunun metilasyonu ve 3' ucunun poliadenilasyonu aktivitelerinden sorumludur (Grdzlishvilli ve ark., 2005; Ivanov ve ark., 2011; Li ve ark., 2006 ve Ogino ve ark., 2005). Yaklaşık 220-250 kDa olan L proteini Lyssaviruslar arasında oldukça iyi korunmuş yapıda ve çoklu L işlevlerinin her birinden ayrı ayrı sorumlu olan 6 bölgeye sahiptir (I-VI). 544-564 amino asitleri arasındaki II. bölge RNA bağlama bölgesi olarak işlev görürken 727-732 amino asitleri arasındaki III. Bölge RNA polimerazın aktif bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Conzelmann, 1995; Mochizuki ve ark., 2011; Poch ve ark., 1990 ve Schnell ve Svenda ve ark., 1997). Glisin açısından zengin bir alana sahip olan VI. bölge 1.705-1.709 amino asitleri arasında bulunmakta ve poliadenilasyon veya protein kinaz aktiviteleri ile ilişkilidir (Mochizuki ve ark., 2011 ve Poch ve ark., 1990).

1.4. Sınıflandırma

Avrupa ve Afrika'da 1956 yılında Kuduz-ilişkili ilk virus izolasyonu ardından yapılan çalışmalar neticesinde; ölümcül enfeksiyon sebebi olarak tek bir viral etkenin sorumlu olmadığı ve RABV'un Kuduz hastalığına sebep olan Lyssaviruslardan yalnızca biri olduğu anlaşılmıştır (Badrane ve ark., 2001 ve Calisher ve Ellison, 2012).

Günümüzde ise Lyssaviruslar, anti nükleokapsid monoklonal antikorların panelleri ile reaksiyonda olan antijenik örnekler, genetik mesafeler ve immünolojik özellikler gibi sınır kriterlerine göre Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından farklı virus türlerine ayrılmışlardır (<http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/classification>). Lyssavirus sınıflandırması moleküler tekniklerle yapılmakta olup, “genotip” terimi kullanılmaktadır (Bourhy ve ark., 1993 ve Kissi ve ark., 1995). Nükleoprotein gen dizinindeki amino asit benzerliklerine göre Lyssaviruslar 7 genotipe ayrılmaktadır (Bourhy ve ark., 1993 ve Gould ve ark., 1998). Genotip 1 olarak adlandırılan Kuduz virusu, dünya genelinde çoğunluğu karnivorlar olmak üzere çeşitli evcil ve vahşi memeliler ile Amerikan yarasalarında bulunmaktadır (Badrane ve ark., 2001a). Genotip 2, Lagos Bat Virusu; Genotip 3, Mokola Virus; Genotip 4, Duvenhage Virus; Genotip 5, European Bat Lyssavirus tip 1; Genotip 6, European Bat Lyssavirus tip 2; Genotip 7, Australian Bat Lyssavirus olarak raporlanmıştır (Bourhy ve ark., 1993 ve Gould ve ark., 1998). Günümüzde, Lyssavirus taksonomisine dahil olan farklı coğrafik bölge ve rezervuarlardan izole edilmiş 17 tür Kuduz ve Kuduz benzeri virus olarak tanımlanmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Günümüzde lyssavirusların çeşitliliği ve taksonomisi (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

Türler (ICTV)	Kısaltma	Potansiyel vektör(ler) / rezervuar(lar)	Dağılımı
Rabies virus	RABV	Karnivorlar (Dünya genelinde); Yarasalar (Amerika)	Dünya genelinde (bazı adalar hariç)
Lagos bat virus	LBV	Meyve yiyen yarasalar (Megachiroptera)	Afrika
Mokola virus	MOKV	Böcek yiyen sıvri fare (Soricidae)	Sahraaltı Afrika
Duvenhage virus	DUVV	Böcek yiyen yarasalar	Güney Afrika
Avrupa yarasa lyssavirus 1	EBLV-1	Böcek yiyen yarasalar (Eptesicus serotinus)	Avrupa
Avrupa yarasa lyssavirus 2	EBLV-2	Böcek yiyen yarasalar (Myotis daubentonii, M. dasycneme)	Avrupa
Avustralya yarasa lyssavirus	ABLV	Meyve / böcek yiyen yarasalar (Megachiroptera/Microchiroptera)	Avustralya
Aravan virus	ARAV	Böcek yiyen yarasalar (Myotis blythi)	Orta Asya
Khujand virus	KHUV	Böcek yiyen yarasalar (Myotis mystacinus)	Orta Asya
Irkut virus	IRKV	Böcek yiyen yarasalar (Murina leucogaster)	Doğu Sibirya
Batı Kafkas yarasa virus	WCBV	Böcek yiyen yarasalar (Miniopterus schreibersi)	Kafkas Bölgesi
Shimoni yarasa virus	SHIBV	Hipposideros commersoni	Doğu Afrika
Bokeloh yarasa lyssavirus	BBLV	Böcek yiyen yarasalar Myotis nattereri	Avrupa
Ikoma virus	IKOV	Afrika Misk Kedisi (Civettictis civetta'den izole edilmiş)	Afrika
Tayvan yarasa Lyssavirus	TWBLV	Pipistrellus abramus	Asya (Tayvan)
Gannoruva yarasa Lyssavirus	GBLV	Meyve yiyen yarasalar (Pteropus giganteus)	Asya
Lleida yarasa Lyssavirus [#]	LLBV	Böcek yiyen yarasalar (Miniopterus schreibersi)	Avrupa (İspanya)

Finlandiya’da tespit edilen Kotalahti yarasa Lyssavirus (KBLV) (Calvelage ve ark., 2021) Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından sınıflandırılmamış Lyssavirus olarak tanımlanmaktadır (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus).

Matlo yarasa Lyssavirus (Güney Afrika) (Coertse ve ark., 2020), Frog Lyssa-Like Virus (FLLV), Anole Lyssa-Like Virus (ALLV) (Horie ve ark., 2020) ve Lyssavirus Ozernoe (Rusya) (Leonova ve ark., 2013) ise son dönemlerde farklı bölgelerden ilk kez teşhis edilen ve henüz taksonomiye dahil olmayan Lyssavirus türleridir.

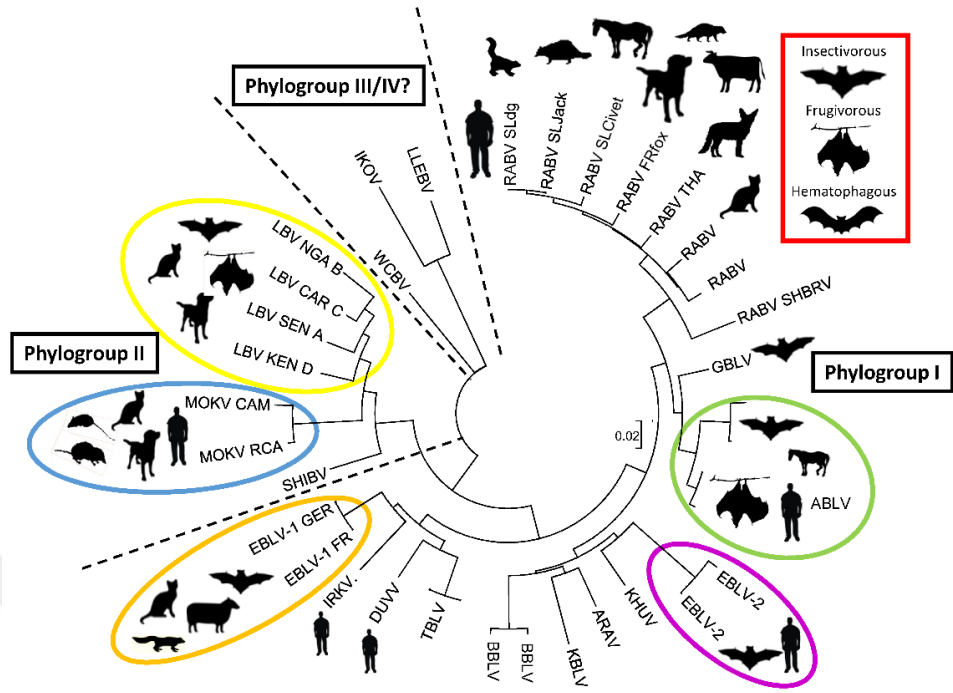
Lyssavirusların tam genom analizlerinin yapıldığı bir çalışmada, genomik uzunluklarının 11918 nt.(GT7) ile 12016 nt.(GT2) arasında çeşitlilik göstermekle birlikte, genotiplerin tümünün yapısal olarak aynı genomik organizasyona sahip olduğu belirtilmiştir (Çizelge 1.2). Sözkonusu çeşitliliğe P proteini nükleotid uzunluğunun değişkenliğinin neden olduğu bildirilmiştir (Delmas ve ark., 2008; Kuzmin ve ark., 2005; Marston ve ark., 2007 ve Wu ve ark., 2007). Lyssavirus genusundaki virusların, virionun içerdiği beş gen bölgesi bakımından benzerlik oranı sırasıyla N>L>M>G>P (%95,2; 94,2; 92,3; 85,8; 81,5) şeklinde amino asit benzerliği olarak sıralanmaktadır (Delmas ve ark., 2008).

Çizelge 1.2. Lyssavirus cinsinin 7 genotipini temsil eden 24 genomun kodlama potansiyeli, genom boyutu (nükleotitlerde) ve G+C içeriği (Delmas ve ark., 2008).

Genotype	1	2	3	4	5	6	7	All genotypes
3'UTR	70	70	70	70	70	70	70	70
N protein	1353	1353	1353	1356	1356	1356	1353	1353-1356
N-P	90-94	101	100-102	90	90-96	101	93-94	90-102
P protein	894	918	912	897	894	894	894	894-918
P-M	87-90	75	80-83	83	83	88	87	75-90
M protein	609	609	609	609	609	609	609	609
M-G	211-215	204	203-204	191	211	205-210	207-209	191-215
G protein	1575	1569	1569	1602	1575	1575	1578-1581	1569-1602
G-L	515-525	578-588	546-562	562-563	560	511-512	508-509	508-588
L protein	6384-6429	6384	6381-6384	6384	6384	6384	6384-6387	6381-6429
5'UTR	86-131	145	112-114	131	130-131	131	131	86-145
Genome	11923-11928	12006-12016	11940-11957	11975-11976	11966-11971	11924-11930	11918	11918-12016
G+C%	44,9-45,4	40,9-43,5	44,1-44,9	44,1-44,2	44,6-45,0	44,8	43,4-44,2	40,9-45,4

Upper and lower size ranges are indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0002057.t002

Lyssavirus türleri genetik, immünojenik ve patojenik özelliklerine göre iki filo gruba ayrılır (Badrane ve ark., 2001). Filogrup 1, Rabies lyssavirus, Duvenhage lyssavirus, Avrupa yarasa lyssaviruses tip 1 ve 2, Bokeloh yarasa lyssavirus, Avustralya yarasa lyssavirus, Aravan lyssavirus, Khujand lyssavirus ve Irkut lyssavirüsü kapsamaktadır (<http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/classification>). Filogrup 1 içinde bulunan tüm Lyssavirus üyelerinin ana rezervuarı yarasalardır; yalnızca klasik kuduz virusu (genotip 1) karnivorlara adapte olmuştur ve rezervuar konakçı olarak bu türde yer alan hayvanlar vasıtasıyla yayılım gösterir (Rupprecht ve ark., 2017). Filogrup 2 üyeleri arasında Lagos yarasa lyssavirus, Mokola lyssavirus ve Shimoni yarasa lyssavirus yer almaktadır. Batı Kafkasya yarasa lyssavirus, Ikoma lyssavirus ve Lleida yarasa lyssavirus ise bu iki filogruptan ayrı olarak bağımsız filogruplar oluşturmaktadır (<http://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/classification>). Filogenetik olarak ilişkili görünseler de, genetik sapmanın miktarı, çapraz nötralizasyonun olmaması ve bu virüslere ait sınırlı izolasyonların raporlanması bu bağımsız filogrupların tam olarak resmi adlandırılmasını önlemektedir (Calisher ve Ellison, 2012; Horton ve ark., 2014; Kuzmin ve ark., 2005 ve Shipley ve ark., 2019) (Şekil 1.6). Aynı filogrup içerisinde yer alan Lyssaviruslarda önemli serolojik nötralizasyon vardır, ancak filogruplar arasında çapraz nötralizasyon çok sınırlı ölçüde veya yoktur (Dietzgen ve ark., 2012; Evans ve ark., 2012 ve Fooks ve ark., 2014).



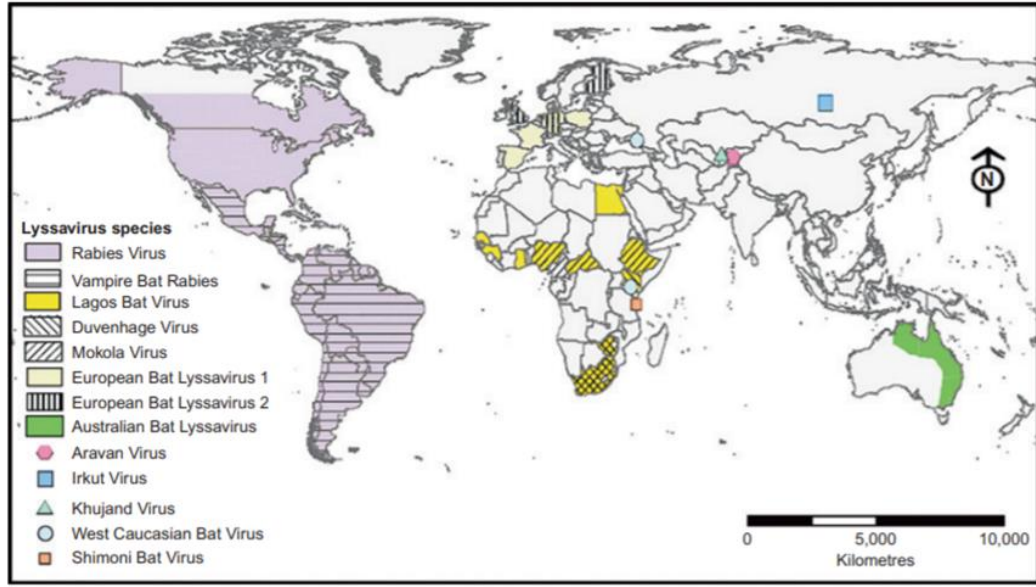
Şekil 1.6. Lyssavirus filogenetik ilişkileri (Shipley ve ark., 2019).

1.5. Epidemiyoloji

Uzun yıllardan beri etkin aşısı ve spesifik immünglobülini olmasına rağmen kuduz halen tüm dünyada yaygın olarak görülen en ölümcül zoonotik hastalıktır. Hastalık, katı karantina tedbirleri ve sıkı eradikasyon önlemlerinin bulunduğu bazı ülkelerde ya da etkenin yayılmasına engel teşkil eden dağlar, nehirler gibi doğal bariyerlerin bulunduğu nadir bölgelerde görülmemektedir (Barecha ve ark., 2017). Çoğunluğu ada konumunda olan İngiltere, Japonya ve Avustralya gibi ülkeler “kuduzdan arı” olarak sınıflandırılmıştır (De-Serres ve ark., 2008).

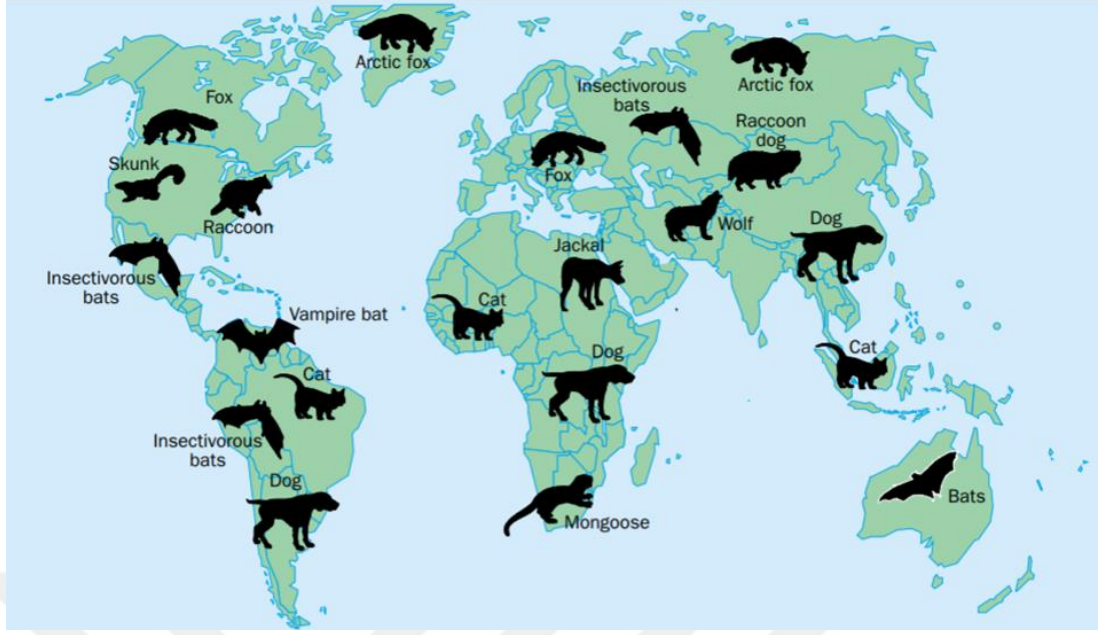
Tüm memeliler kuduz virusuna duyarlı olsa da, hastalık oluşumu için ana rezervuar olarak sadece birkaç hayvan türü önem arz etmektedir (Lackay ve ark., 2008; Pal ve ark., 2013 ve Sudarshan ve ark., 2007). Bir bölgede enfeksiyonun yayılmasında ana vektör kabul edilen hayvan türlerine bağlı olarak üç kuduz modeli tanımlanmıştır

(Barecha ve ark., 2017). Birincisi ana rezervuar olarak köpeklerin en baskın olduğu kentsel kuduz döngüsüdür. Aşısız ve başboş köpeklerin fazlaca bulunduğu Afrika, Asya, Orta ve Güney Amerika bölgelerinde bu döngü ile enfeksiyon yayılımı görülmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa’da köpek döngüsü elimine edilmesine rağmen nadiren de olsa vahşi yaşam ile aşısız köpeklerin etkileşimi kuduz vakalarının görülmesine sebebiyet vermektedir (<https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>-21.10.2021). İkinci yayılım türü, yaban hayatı (sylvatic cycle) kuduz döngüsüdür. Kurt, çakal, tilki, kokarca, firavun faresi gibi hayvanların vektör olarak önemli bir rol oynadığı bu döngü Avrupa ve Kuzey Amerika’da yaygın olarak görülmektedir. Genellikle vahşi karnivorlar ve sokak köpeklerinin sık teması nedeniyle zaman içerisinde bu döngünün yerini kentsel kuduz döngüsüne bıraktığı gözlemlenirken bazı ülkelerde kentsel kuduz döngüsü ile birlikte karışık seyir göstermektedir (Quinn ve ark., 2002, <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>-21.10.2021). Üçüncü döngü ise yarasaya kaynaklı yayılımdır. Bu grup evcil ve yabani hayvanlar olmak üzere birçok hayvan türünü etkilemekle birlikte özellikle Latin Amerika’da önem arz etmektedir (Kuzmin ve ark., 2011). Yarasalar, birincil konağı henüz belirlenmemiş olan MOKV ve IKOV dışındaki tüm Lyssavirus türleri için rezervuar olarak tanınmış olup dünya çapında yayılım sergilemektedir (Ma ve ark., 2018). Kuduz virusunun moleküler karakterizasyonu, belirli bir bölgede sirküle olan virus varyantının belirlenmesinin yanı sıra köpek ve/veya yaban hayatı ve/veya yarasaya aracılı kuduz varlığı açısından da hastalığın epidemiyolojisi hakkında önemli bilgiler sağlar (Sinclair ve ark., 2015 ve WHO, 2018c).



Şekil 1.7. Tüm dünyada yarasa Lyssavirus izolatlarının coğrafik olarak dağılımı (Banyard ve ark., 2011). (Ülkeler yarasalarda farklı Lyssavirus türlerinin görülmesine göre taralı alanlarla belirlenmiştir. Yalnızca tek izolatların tespit edildiği alanlar sembolle gösterilmiştir).

Filogrup 1 içerisinde yer alan Klasik Kuduz virusu (RABV), Avrupa yarasa virusu 1 (EBLV-1) ve 2 (EBLV-2), Bokeloh yarasa virusu (BBLV), İrkut (IRKV), Aravan (ARAV) ve Khujand (KHUV) virusu ile Filogrup 3’ de yer alan Batı Kafkas yarasa virusu (WCBV) Avrasya'daki yarasalardan izole edilmiştir (Freuling ve ark., 2011 ve Marston ve ark., 2017a). Avustralya'da tanımlanan tek Lyssavirus, yarasa popülasyonlarında dolaşan ve filogrup 1 sınıfında yer alan Avustralya yarasa lyssavirus'udur (ABLV) (Hayman ve ark., 2016). Afrika'da ise Filogrup 1’den Duvenhage virus, Filogrup 2’den Lagos yarasa (LBV), Mokola (MOKV) ve Shimoni yarasa virusu (SHIBV) (Kuzmin ve ark., 2009) ve Filogrup 3’den Ikoma virus (IKOV) (Marston ve ark., 2012a) olmak üzere üç filogrupdan da Lyssavirus türleri bulunmaktadır (Nel ve ark., 2007).



Şekil 1.8. Memeli kuduz rezervuarlarının ve vektörlerinin küresel dağılımı (<https://caninerabiesblueprint.org/4-2-1-Assessing-the-science?lang=en>).

Kuduz virusu için karnivor grubuna dahil olan farklı hayvan türleri rezervuar olarak hizmet eder; Kuzey Amerika’da rakunlar (*Procyon lotor*), çizgili kokarcalar (*Mephitis mephitis*), çakallar (*Canis latrans*), gri tilkiler (*Urocyon cinereoargenteu*) ve kırmızı tilkiler (*Vulpes vulpes*), Avrasya’da rakun köpekleri (*Nyctereutes procyonoides*) ve kırmızı tilkiler (*Vulpes vulpes*), Kuzey kutup bölgesinde kutup tilkileri (*Alopex lagopus*), Karayipler ve Güney Afrika bölgesinde ise firavun faresi (*Herpestidae family*) karasal vahşi yaşam rezervuarlarıdır (Banyard ve ark., 2011 ve Banyard ve ark., 2013). Birçok Avrupa ülkesinde ana rezervuar kızıl tilkilerin yanısıra en yaygın olarak enfekte olan yaban hayatı türleri porsuklar (*Meles meles*) ve sansarlardır (*Martes foina*, *Martes martes*) (Čač ve ark., 2003 ve Slavica ve ark., 2010). Asya ve Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde hem insanlar hem de hayvanlar için köpekler ana rezervuardır (Lackay ve ark., 2008; Pal ve ark., 2013 ve Sudarshan ve ark., 2007). Afrika, Asya ve Orta Doğu’daki ülkelerin çoğunluğunda, aşısız sokak köpek ve kedileri ile yayılım gösteren hastalık hala yıkımlara yol açmaktadır (Fooks ve ark., 2014).

Asya kıtasında yer alan Japonya, Maldivler, Kore Cumhuriyeti ve Singapur kuduzdan ari olan ülke durumunda iken, Hindistan ise tüm dünyada kuduza bağlı insan ölümlerinin en yüksek görüldüğü ülke durumundadır (Wallace ve Blanton, 2020). Enzoitik RABV bulaşı Asyanın bozkır bölgelerinde kızıl tilkiler (*Vulpes vulpes*), Uzak Doğu Rusya ve Kuzey Çin'de rakun köpekleri (*Nyctereutes procyonoides*), Güney Çin ve Tayvan'da yaban gelinciği porsukları (*Melogale moschata*) arasında belgelenmiştir (Wang ve ark., 2014). Asya kıtasında (Rusya) ilk kez tanımlanan ölümcül insan Lyssavirus enfeksiyonu olan Ozernoe suşu yarasa ısırığı sonucu gerçekleşmiştir (Leonova ve ark., 2013).

Çoğu Avrupa ülkesinde 1970'lerin sonlarına doğru oral aşılama ile kuduz virusu etkin bir şekilde kontrol altına alınmaya başlanmış, 1990'larda ise belirli ülkelerde etkeni tamamen ortadan kaldırma başarısı elde edilmiştir. Avrupa Birliği destekli oral aşılama projesi sonucunda Orta Avrupa yaban hayat (silvatic) kuduzundan ari hale getirilmiştir (Lojki'c ve ark., 2021 ve Müller ve ark., 2014). Köpek aracılı kuduz ise Kuzey Amerika, Batı Avrupa, Avustralya, Japonya ve Kanada'dan tamamen elimine edilmiş durumdadır ve köpeklerden insanlara bulaş vakaları görülmemektedir (Johnson ve ark., 2010b; Melo ve ark., 2020 ve WHO, 2018b).

Orta Doğu'daki ülkelerin birçoğu, enzootik köpek kuduzu kategorisine sahiptir. Bu bölgede kentsel ve sylvatic kuduz döngüleri birlikte karakterize edilmektedir (Horton ve ark., 2015). Bölgedeki en temel sorunlardan biri, kuduz virusu ile enfekte ve inkubasyon dönemindeki hayvanların kontrolsüz sınır ötesi hareketleriyle yer değiştirmesidir. Hayvan kuduz vakalarının çoğu bu bölgede köpeklerde, tilkilerde, altın çakallarda (*Canis aureus*) ve kurtlarda (*Canis lupus lupus*) yaygın olarak görülmektedir (Bannazadeh ve ark., 2018). Bu bölgede yer alan ülkelerde her yıl 220'den fazla insanın kuduz enfeksiyonuna bağlı öldüğü tahmin edilmektedir. Ancak vakaların çok azı teşhis edilebilmekte veya uluslararası sağlık kuruluşlarına bildirilip kayıt altına alınmaktadır (Bengoumi ve ark., 2018). Bu güne kadar klasik kuduz virusu dışında bölgede sirküle olan farklı bir Lyssavirus türü tespit edilmemiştir. Özellikle

yarasalarla ilgili araştırmaların eksikliği bölgede var olan viral çeşitlilik hakkında kısıtlı bilgi sahibi olmaya sebebiyet vermektedir (Wunner, 2007).

Arap lkelerinde enfeksiyonun yayılımında rol oynayan ana rezervuar köpeklerin yanısıra develerde, tilkilerde, sığırılarda, koyunlarda ve keçilerde de kuduz vakaları görülmektedir. Köpek ısırıklarından dolayı insanlar da ölümcül hastalığa karşı risk altındadır. Umman'da yapılan filogenetik analizler sonucu en fazla kuduz vakası tilkilerde rapor edilmiş ve etken yayılımında ana rezervuar olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Alaifan ve Altamimi, 2019 ve Body ve ark., 2014). Bölgesel siyasi huzursuzluktan dolayı Filistin ve Suriye'den enfeksiyonun varlığına dair çok az erişilebilir bilgi mevcuttur. Irak ve Suriye'de, uygun veterinerlik tesislerinin bulunmamasının yanı sıra sıhhi ve belediye altyapısının ve sorumluluklarının azalması nedeniyle aşılanmamış köpeklerin sayısı artmaktadır. Bu durum dolayısıyla hastalığın görülme olasılığında artış olabileceğinden şüphe edilmektedir (Bannazadeh ve ark., 2018). Kuduz Yemen'de endemiktir ve insan kuduz vakalarının çoğunluğundan evcil köpeklerin sorumlu olduğu görülmektedir (Taylor ve Knopf, 2015). Mısırdada ise ana vektör olarak köpekler kabul edilirken kediler, ruminantlar, atlar, eşekler, kemirgenler ve fıravun fareleride kuduzun yayılmasında önemli türler olarak görülmektedir (Matter ve ark., 2004). İran'da hem vahşı hayatta hem de evcil hayvanlarda endemik olarak seyir gösteren kuduz hastalığının ana kaynağı sokak köpekleri ve kurtlardır (Aikimbayev ve ark., 2014; Aylan ve ark., 2011 ve Picot ve ark., 2017). Arap Yarımadası'ndaki Katar ve Birleşik Arap Emirlikleri ve ada konumundaki Bahreyn ve Kıbrıs Ortadoğu'da kuduz enfeksiyonunun görülmediği nadir ülkelerdendir (Al Abaidani ve ark., 2015; King ve ark., 2004; Memish ve ark., 2015 ve Yousaf ve ark., 2012). İsrail'de kızıl tilkiler (*Vulpes vulpes*) ve altın akallar (*Canis aureus*) bölgedeki slyvatik kuduz yayılımdan sorumlu türlerdir (Yakobson ve ark., 2006). Sınır komşusu İsrail ile bölgedeki kuduza karşı mücadele maksadıyla uçaklarla dağıtılan yemlerle ağızdan aşılama yoluyla mücadele eden Ürdün'de ise ana kaynak köpek ve akallardır (Yakobson ve ark., 2017).

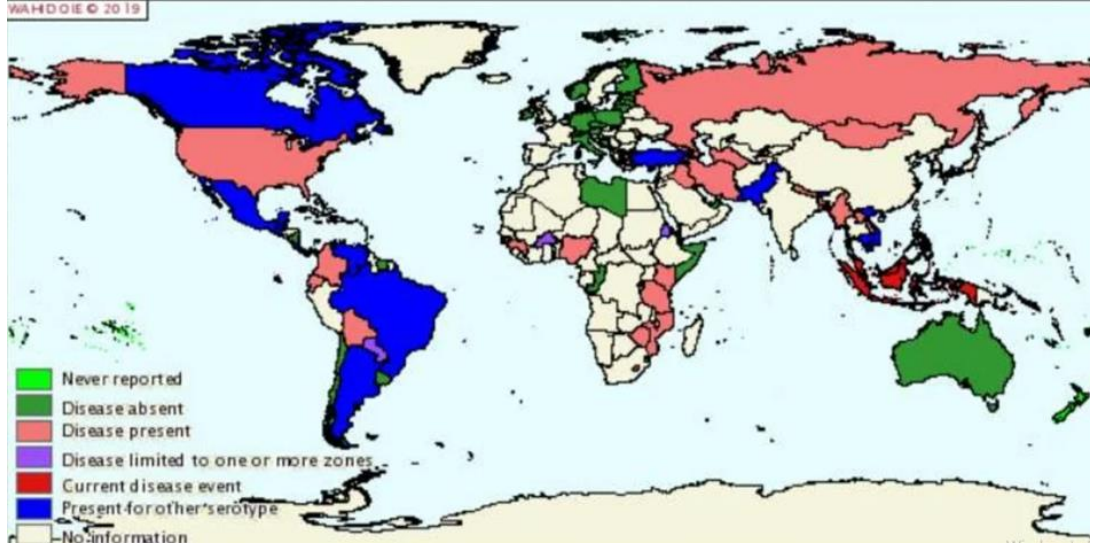
Türkiye, coğrafik konumu itibarı ile Avrupa ve Asya kıtaları arasında bir köprü vazifesinde olması sebebiyle farklı evcil ve vahşi hayvan türlerine sahip bir ülkedir (King ve ark., 2004). Türkiye'de kuduz virusunun bulaşmasında ana vektör köpekler iken, ikinci vektör olarak ise tilkiler aracı rol oynamaktadır. İnsan kuduz vakaları genellikle bu hayvanların ısırıklarından kaynaklanmaktadır (Picot ve ark., 2017). Filogenetik çalışmalarda bu iki konakçıya ait izolatlar arasındaki yakın ilişki türler arası yayılımın yeni bir olgu olduğunu düşündürmektedir. Kesin olmamakla birlikte iki tür arasındaki enfeksiyon bulaş yönünün köpekten tilkiye doğru olduğu varsayılmaktadır (Johnson ve ark., 2003). Konak değiştirme olarak adlandırılan durum benzer şekilde İsrail'de tilki aracılı kuduzdan köpek aracılı kuduza geçiş şeklinde görülmekte olup, köpekler ve insan popülasyonu arasındaki yakın temas nedeniyle halk sağlığı için büyük bir endişe kaynağı oluşturmaktadır (David ve ark., 2009). Konakçı tipinin kombinasyonu, ülkenin topografisi ve sınırlar boyunca hayvan hareketleri Türkiye'deki kuduzun mevcut epidemiyolojisini şekillendirmektedir (Johnson ve ark., 2003 ve Johnson ve ark., 2013). Türkiye'de 1956 yılında yarasalar kuduz varlığı yönünden incelenmiş ve bir yarasada (*Rhinolophus ferrumequinum*) pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışma ile ülkemizde ilk pozitif kuduz yarası vakası rapor edilmiştir (Johnson ve ark., 2010c ve Tunçman, 1958). Daha sonraki yıllarda Türkiye'nin yakın komşuları olan Doğu Avrupa ülkeleri ve Rusya'nın Güneyinden vaka bildirimleri devam etmiş ancak ülkemizde yeni bir yarası vakasına dair bildirim yapılmamıştır (Amengual ve ark., 1977; Botvinkin ve ark., 2003 ve Johnson ve ark., 2010c).

Azerbaycan'da kuduz yayılımı köpeklerde kuduz vakalarının görülmesinin ardından çakallar, tilkiler ve kurtlar aracılığıyla vahşi yaşamda enfeksiyonun gelişimi ile ikinci bir salgın evresini takip etmiştir (Zeynalova ve ark., 2015). Kurtlar, sosyal yapıları ve demografileri nedeniyle doğal bir kuduz rezervuar olarak kabul edilmezler (Hanlon, 2013), ancak insanlara enfeksiyonun bulaştırılmasında önemli bir kuduz vektörüdür. 19. yy sonlarına doğru kurt ısırıkları Rusya'daki insan kuduz vakalarının yarısından fazlasının nedeni olarak gösterilmiştir (Botvinkin ve ark., 2004). Köpek ve kurt popülasyonları arasındaki etkileşim sonucu günümüzde Suriye'de bir kurtta

köpeklerle ilişkili kuduz suşunun varlığı bildirilmektedir (Horton ve ark., 2015 ve Kopaliani ve ark., 2014).

Lyssavirusların yarasalardan köken aldığı ve sınırlı memeli konakçılara sahip olduğu düşünülürken Frog Lyssa-Like Virus (FLLV) ve Anole Lyssa-Like Virus (ALLV) sekans dizilerinin Lyssavirus konakçısı olarak amfibiler ve sürüngenlerden eldesi bugüne kadar enfeksiyona maruz kalmış türler ile kıyaslandığında şaşırtıcı bir gelişme olarak nitelendirilmiştir (Oberhuber ve ark., 2021). Soğukkanlı hayvanlarda (Poikilotermik) Lyssavirus görülmesi kuduz virusu evrim teorilerinde mevcut görüşten farklı varsayımların olabileceğini akla getirmektedir. Benzer şekilde Lyssavirus genusu üyelerinin çok daha yaygın olabileceği ve düşünülenden çok daha eski zamanlarda varlığını sürdürmüş olabileceği düşünülmektedir (Oberhuber ve ark., 2021).

OIE'de listelenmiş hastalıklar arasında yer alan kuduz enfeksiyonu bir bölgede görüldüğünde OIE Üyesi ülke hastalığın meydana geldiği hayvanlara ilişkin bilgileri bildirme yükümlülüğüne sahiptir (OIE, 1924). Üye Ülkeler tarafından sunulan bilgiler ışığında Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Sistemi (OIE-WAHIS) tarafından kuduz vakalarının epidemiyolojik durumunun uluslararası raporlaması yapılır ve çevrimiçi olarak halka açık erişime sahiptir (<https://wahis.oie.int/#/home>).



Şekil 1.9. Kuduz için Dünya Hayvan Sağlığı Bilgi Veritabanı (World Animal Health Information Database-WAHIS-interface) version 1 (Jan-Jun 2019)
(<https://www.slideshare.net/ShubhamSaini176/rabies-a-fatal-zoonotic-threat>).

1.6. Bulaşma

Enfekte hayvandan insanlara Kuduz virusu ısırık, çizik, hasarlı cilt yüzeyinin yalanması ve enfeksiyöz materyalin mukozal yüzeyler ile teması sonucu bulaşmaktadır (Fooks ve ark., 2014).

Organ ve doku transplantasyonu ile birkaç hastaya nakil sonrası kuduz enfeksiyonunun bulaştığı tespit edilmiştir. Kuduz enfeksiyonuna maruz kalan kişilerde hastalığın son evrelerinde virus birçok dokuda bulunduğu için nörolojik semptom ve bulgularla ölen insanlardan organ nakli yapılmadan önce detaylı araştırma yapılmalıdır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde kornea nakli kuduz enfeksiyonunun bulaşı için önem arz etmektedir (Maier ve ark., 2010; Melo ve ark., 2020 ve Srinivasan ve ark., 2005).

Isırık veya tükürük yoluyla insandan insana bulaşma ve enfekte hayvanların çiğ et veya sütlerinin tüketilmesi ile etkenin insanlara bulaşı teorik olarak mümkün olsada bu tür yayılımın doğrulandığı herhangi bir vaka gözlemlenmemiştir (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>). Enfekte hayvana ait çiğ süt tüketimi bağışıklık sistemi baskılanmış, ağızda, boğazda veya yemek borusunda açık yaralara, erozyonlara veya ülserasyonlara neden olan durumlara sahip olan kişilerde hastalık bakımından yüksek risk oluşturmaktadır (<https://www.cdc.gov/rabies/resources/news/2005-12-23.html>). Bu bağlamda, kuduz bir hayvanın etini veya sütünü tüketilmesi kesinlikle önerilmemektedir (<https://www.who.int/docs/default-source/ntds/rabies/rabies-general-public-faqs.pdf>).

Yarasaların özellikle yüz bölgesi olmak başta olmak üzere intradermal (ID) ısırıklar ile kuduz virusunu bulaştırdığı görülmektedir. Aerosol iletim yolu da kuduz enfeksiyonunun bulaş yolları arasında bulunmasına rağmen hastalığın doğal bulaşma seyri içinde bu yolun etkili olmadığı görülmektedir (Johnson ve ark., 2010a).

1.7. Virus Replikasyon Mekanizması ve Patogenezi

1.7.1. Virusun dokulara inokulasyonu

Kuduz virusunun bulaşmasında enfekte tükürüğün viral yükü ve ısırık şiddeti önemli rol oynamaktadır. Özellikle derin yaralanmalar, kas hücrelerinde virusun affinite gösterdiği nikotinik asetilkolin reseptörlerinin yoğun bulunması sebebiyle risk oluşturmaktadır. Konjunktival, oral ve genital mukozada virulent tükürük ile maruziyet kuduz virusu ile enfekte olmaya sebep olmaktadır. Kuduz virusunun aksonlarda 3mm/sa hızında göç ettiği tahmin edilmektedir (Dietzschold ve ark., 2008 ve Finke ve Conzelmann, 2005). Ancak sinapslar arası yayılımı kolaylaştıran mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir (Dietzschold ve ark., 2008).

Yarasalardan elde edilen RABV izolatları, epidermise yüzeysel olarak enjekte edildiğinde daha öldürücüdür, çünkü yarası virusunun nöronal olmayan hücrelerde ve köpek RABV'lerinden daha düşük sıcaklıklarda daha hızlı çoğaldığı bilinmektedir (Singh ve ark., 2017).

1.7.2.Periferden sentral sinir sistemine virus göçü

İnkubasyon süresi bulaşan virus miktarına, virusun suşuna, inokulasyon bölgesinin MSS'ne yakınlığına, konakçının önceden var olan bağışıklığı ve yaralanmanın türüne bağlı olarak 2 haftadan birkaç aya kadar değişebildiği gibi nadir durumlarda yıllarca sürebilmektedir. Uzun inkubasyon süresi, kas hücreleri veya diğer hücre türlerinin nöromusküler kavşağında virusun konumuna göre açıklanabilir. Baş ve boyun bölgesi yaralanmalarında çok daha kısa sürede kuduzla ilgili klinik semptomlar görülmektedir (Asaye ve Getachew, 2014 ve (<https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf-21.10.2021>)). Hem deri hem de iskelet kasları farklı sinir tipleri (somatik veya visseral, motor veya duyuşal) ile zengin olduğu için birçok nöronal terminallere sahiptir (Drake ve ark., 2015; Roosterman ve ark., 2006).

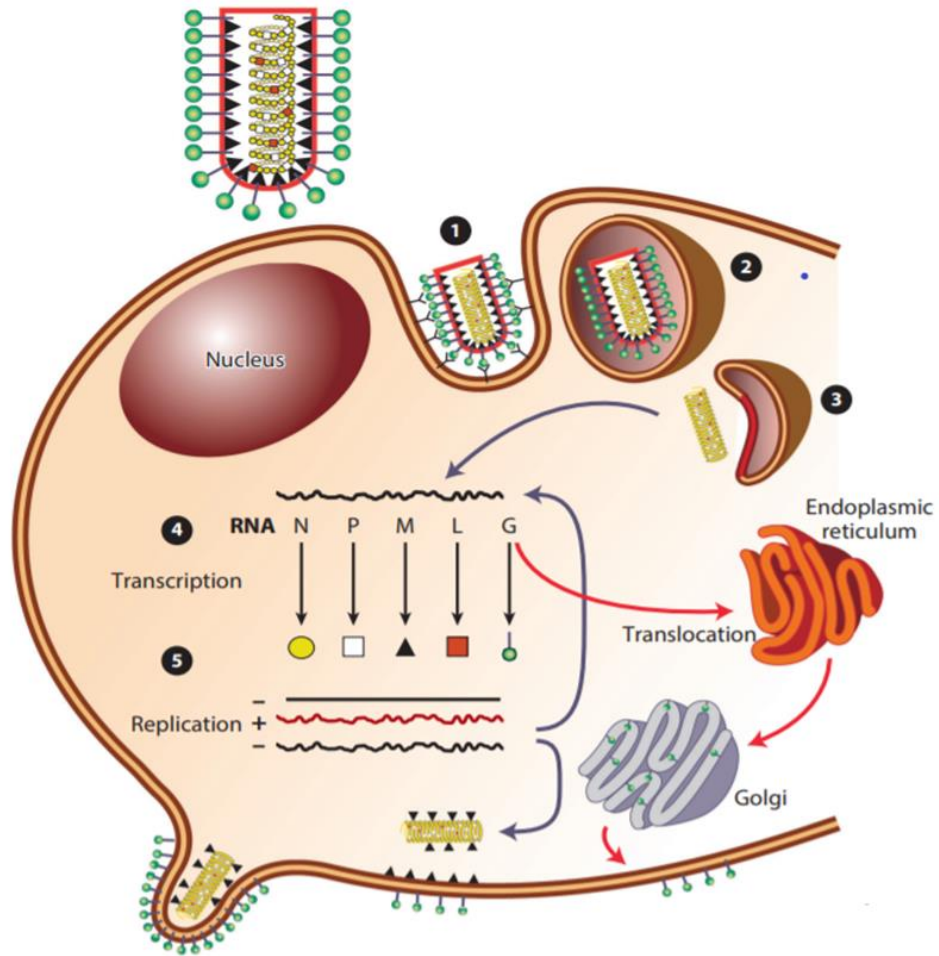
Lyssaviruslar iskelet kası liflerindeki gibi inokulasyon bölgesinde çoğalabilir ve nöromusküler kavşak yoluyla nöronlara penetre olabilmektedir (Charlton ve ark., 1997 ve Lyles ve ark., 2013). Kuduz virusu ısırık bölgesindeki periferik sinir nöronuna girdikten sonra yayılmaya başlar. Periferik nöronlar Lyssavirus enfeksiyonuna duyarlı olmayan Schwann hücreleri ile kaplı durumda olmasına rağmen bazı nöron türlerinin uç kısımlarında bu hücrenin eksikliği kuduz virusunun sinir hücresine girişine imkan sağladığı düşünülmektedir (Begeman ve ark., 2017; Cauna ve ark., 1980; Charlton ve ark., 1996 ve Murphy ve ark., 1973). RABV'nin konak nöron membran reseptörleri ile nasıl etkileştiği ve semptomların ortaya çıkış mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Wang ve ark., 2018). Ancak RABV'nin konakçı hücresi içine

girişinde anahtar model olarak hareket eden reseptörler mevcuttur: Nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR), merkezi sinir sistemi ve periferik sinir ağı içindeki nöronlar arası iletişimden sorumludur; nöral hücre adhezyon molekülü (NCAM), postsinaptik membrandaki nöromüsküler kavşaklarda derinlerde ve sinir uçlarında mevcuttur ve nörotrofin reseptör (p75NTR), hücre ölüm, sinaptik iletim ve aksonal uzamada rol oynamaktadır (Dechant ve Barde, 2002 ve Lafon, 2005). Virionlar kuduz spesifik reseptörlere bağlandıktan sonra Kuduz virusu G proteini hücre reseptörlerle etkileşime girerek virionun endositozisini tetikler (Etessami ve ark., 2000 ve Le Blanc ve ark., 2005). Endozomal vezikül, dyenin motorları kullanarak mikrotübül ağına bağlı retrograd aksonal akışla (akson terminalinden hücre gövdesine) taşınır (Albertini ve ark., 2011a ve Albertini ve ark., 2011b).

1.7.3. Virus replikasyon siklusu

Virus parçacıkları nöronun hücre gövdesine ulaşmasıyla virion bileşenlerinin (transkripsiyon, replikasyon ve protein sentez) üretimini içeren aşama meydana gelir (Schnell ve ark., 2009). Endozomun düşük pH'sı, viral zarf ve endozomal membran arasındaki füzyon prosesini G proteini aracılığıyla katalizler ve nükleokapsid sitoplazmaya taşınarak (Finke ve Conzelmann, 2005; Gaudin, 2000 ve Le Blanc ve ark., 2005) N proteini tarafından kapsitlenen (-) ssRNA genomu serbest bırakılır (Albertini ve ark., 2011a ve Albertini ve ark., 2011b). Tüm transkripsiyon ve replikasyon olayları sitoplazma içinde gerçekleşir (Negri, 1903) ve intrasitoplazmik inklüzyonların (Negri cisimciği) oluşumuna neden olur (Heinrich ve ark., 2010 ve Lahaye ve ark., 2009). Replikasyon siklusunun ilk aşaması viral genomun transkripsiyonudur. L-P kompleksi nükleotidin 3' ucuna girer ve kısa bir RNA molekülünün üretimiyle transkripsiyon başlar (Albertini ve ark., 2008). Transkripsiyon durduktan sonra polimeraz mRNA'nın nükleoprotein transkripsiyonu ile yeniden başlar. Daha sonra mRNA'lar M, N, P, L ve G için üretilir ve beş viral proteinin translasyonu ile devam eder. RNA polimeraz aktivitesi, negatif iplikli RNA

genomu yapmak için bir şablon olan pozitif iplikli replikatif RNA (anti-genom) üretmek için transkripsiyondan replikasyona geçer. Sentezlenen viral RNA daha sonra NP kompleksi ve L ile birlikte ribonükleoprotein (RNP) oluşturmak üzere paketlenir. M proteini, RNP'yi yoğunlaştırmak ve onu G proteininin bulunduğu hücre zarında lokalize etmek için RNP kompleksi ile ilişki halindedir (Wunner, 2020).



Şekil 1.10. Kuduz virusu yaşam döngüsü (Davis ve ark., 2015)'den alınmıştır.

1. Virusun konakçı hücre reseptörlerine bağlanması, 2. Endositoz yoluyla virusun hücreye girişi, 3. Virion zarının endozomal zar ile pH aracılı füzyonundan sonra virol genomun serbest bırakılması , 4. Transkripsiyon, ve 5. Genom replikasyonu. Son aşamada virion bileşenlerinin üretilmesi ardından viral komponentlerin bir araya getirilmesi ve kuduz virusu virionlarının tomurcuklanması ve salınması

RABV'nin ayrıca tüm memeli hücrelerinde yüksek oranda korunan ve özellikle nöronlarda önemli olabilecek doğuştan gelen bağışıklıktan kaçması gerekir. Bu nedenlerle, RABV, konak hücre savunmasında yer alan hücreler arası ve hücre içi sinyal yollarını doğrudan bozar. Bunlardan en iyi bilineni, doğuştan gelen bir bağışıklık kaçırma mekanizması olan RABV-P tarafından IFN sinyalleme sisteminin bozulmasıdır (Davis ve ark., 2015).

1.7.4. Merkezi sinir sistemi istilası

Genel olarak, beynin kaba muayenesi meningeal damarlarda hafif bir tıkanıklık gösterir; mikroskopik inceleme genellikle hafif perivasküler kaflanma, sınırlı doku nekrozu, asidofilik intrasitoplazmik nöronal inklüzyonlar ve nadiren nöronofajiyi gösterir (Asaye ve Getachew, 2014). Hücresel düzeyde yapılan incelemeler sonucunda virusten etkilenen hücreler normal boyutta ve ölüm gerçekleştiği durumda bile sitopatik değişikliklerin ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür (Jackson, 2002 ve Juntrakul ve ark., 2005).

1.7.5. Merkezi sinir sisteminden sentrifugal salınım

Beynin enfeksiyonundan sonra, virus periferik sinir sistemi ve birkaç periferik organa sentrifugal olarak yayılım gösterir (Asaye ve Getachew, 2014). Enfeksiyonun erken dönemlerinde gözlenen virusun tek yönlü (retrograd) yayılımının tersine, Merkezi sinir sisteminden tükürük bezlerine ulaşmak için RABV'nin otonomik duyu gangliyonları yoluyla anterograd bir şekilde hareket etmesi gerekir (Ugolini, 2011). Enfeksiyon döngüsünün son aşamasında, tükürük bezlerine göç eden kuduz

virüsü burada lokal replikasyon sonrasında etkeni başka konakçılara bulaştırmak için tükürükle saçılma başlar (Asaye ve Getachew, 2014).

1.8. Klinik Bulgular

Kuduz, ensefalit ve paralitik klinik formun görüldüğü sinir sisteminin akut viral enfeksiyonudur. Kuduz virusunun biyolojisi üzerine pek çok araştırma yapılmış ancak enfeksiyonun ölümcül hastalık oluşturma mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Semptom gösteren kuduz hastalarının postmortem muayeneleri sonucunda, beyinlerinde hafif histolojik lezyonların geliştiği ve önemli bir nöron kaybı olmadan ölümün gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Jackson ve ark., 2008).

Viral etken ile mağruziyetten sonra görülen ilk klinik semptom ısırılan bölgede nöropatik ağrıdır. Bu semptomla, dorsal kök ganglionlarında virus replikasyonu ve hücresel bağışıklığın neden olduğu inflamasyon sebep olmaktadır (Mitrahakdi ve ark., 2005) .

Hastalığın seyri sırasında ortaya çıkan nöronal disfonksiyon, belirli nöronal ağların veya yolların bozulmasının veya ortadan kaldırılmasının bir sonucu olabilir. RABV hücresel patogenezinin ve sinaptik bağlantısının daha iyi anlaşılması kuduz enfeksiyonu prognozunun daha iyi anlaşılmasına bakımından fayda sağlayacaktır (Davis ve ark., 2015).

Kuduz enfeksiyonundan muzdarip tüm canlılar türler arası küçük farklılıklarla birlikte genellikle merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarına özgü tipik belirtiler gösterir. Enfeksiyon sonucu meydana gelen klinik bulgular prodromal, saldırgan ve felç olarak adlandırılan üç fazdan oluşmaktadır (Slate ve ark., 2009).

Kuduz klinik semptomlarının gözlemlendiği enfeksiyonun geç evresinde tükürük bezleri, deri, kıl folikülleri ve kas lifleri gibi çeşitli uç organlara etken iletimi sonucu kuduz virusu uç organlardan geri kazanılabilir (Jackson, 2002 ve Ugolini, 2011).

1. Prodramal (Sukünet) faz:

Birkaç saatten 36 saate kadar devam eden bu süreçte hayvanlarda bazen dışarıdan farkedilemeyecek biçimde küçük davranış değişiklikleri oluşabilir; evden uzaklaşma, halusinasyonlar, seste değişiklikler, hareket eden cisimlere sıçrama, klostrofobi, ısırik bölgesinde hipersestezi ve genellikle semptomlar ilerledikçe kaybolan ateş görülmektedir. Hayvanlar daha sonra ya öfkeli (saldırgan) kuduz aşamasına geçebilir ya da ölüm gözlemlenebilir (Kuduz saha rehberi 2019 ve Ogunkoya, 2007).

2. Saldırgan (Hareketli) faz:

Şiddetli bir saldırganlık ve hipereksitabiliteye eğilimin olduğu bir dönemdir. Etkilenen hayvanlar cansız nesneleri ve diğer hayvanları ısırma meyllidirler. Öfkeli form kedilerde köpeklerden daha sık gözlemlenmektedir. Tilkilerin ise hastalığın bu formunu nadiren sergilediği gözlemlenmiştir (Knobel ve ark., 2005 ve Kuduz saha rehberi 2019).

3. Felç (Paralitik) faz:

Yutak ve çiğneme kaslarının felç olması sonucu hayvan yutamaz ve bolca salya salgılamaya başlar. Ağız kısmında köpürmüş tükürük görünümü yaygındır. Yüz felci görülebilir veya alt çene düşebilir. Ataksi, koordinasyon bozukluğu ve artan spinal parezi veya felç bu formun tipik özelliğidir. Ölüm genellikle 2 ila 6 gün

arasında solunum yetmezliği sonucu gerçekleşir
(<https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabies.pdf>-21.10.2021).

1.9. Tanı

Klinik gözlem ve muayene sonucu, Kuduz enfeksiyonuna özgü davranış değişiklikleri veya yutma güçlüğü gibi oldukça karakteristik hastalık belirtileri olsa bile etken doğrulaması ile kesin tanı gereklidir (<https://rbe.fli.de/site-page/diagnosis-rabies>). Kesin teşhis yalnızca ölüm sonrası yapılan testlerle doğrulanabilir (Wadhwa ve ark., 2017). Kuduz tanı yöntemlerinde kullanılan laboratuvar metotları için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ/WHO) ve Uluslararası Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından uluslararası bir standardizasyon sağlanmıştır (<https://rbe.fli.de/site-page/diagnosis-rabies>; Calisher ve Ellison, 2012). Şüpheli insan numunelerinde intravital tanı, tükürükte, innerve deri biyopsi örneklerinde veya saç köklerinde virus veya viral RNA'nın saptanmasına dayanır. Ancak virusun tükürükte aralıklı olarak saçılması ve uygulanan yöntemlerin tanısal sensitivitesinin değişken olması nedeniyle sadece pozitif sonuçların doğruluğu kabul edilmektedir (<https://rbe.fli.de/site-page/diagnosis-rabies>).

1.9.1. Antijen Tespiti

1.9.1.1. Direk Floresan Antikor Testi (DFAT)

Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü kuduz hastalığı teşhis metotları içinde Direkt Floresan Antikor Testini (DFAT) ‘‘altın standart’’ test olarak tanımlamaktadır (Dean ve Atanasiu, 1996; <https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/diagnosis-rabies>). Kuduz enfeksiyonu sinir dokuda tahribata neden olduğundan kuduz antijenini test etmek için ideal doku beyin numunesidir

(https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/direct_fluorescent_antibody.html). %96 ve %99 arasında doğru sonuç veren DFAT, Negri cisimcikleri gibi nöronlarda intrasitoplazmik inklüzyonların floresan izotiyosiyanat işaretli antikor (FITC) ile işaretlenerek gösterilmesi temeline dayanan oldukça hassas ve spesifik bir testtir. Taze numunelerde 2 saatten daha kısa sürede güvenilir sonuçlar verir (OIE, 2018). Kuduz antijeninin dokuda tespiti için hızlı ve hassas bir yöntem olmasına rağmen testin doğruluğu beyin dokusunun kalitesine, yüksek kaliteli anti-kuduz teşhis konjugatlarının mevcudiyetine, floresan mikroskobuna erişilebilirliğe ve en önemlisi deneyimli bir teşhis uzmanı gibi parametrelere bağlıdır (Lembo ve ark., 2006). Beyin dokusunun yanı sıra, ense saçlı deri biyopsisi, kornea ve tükürük bezi örneklerinde de teste spesifik elma yeşili floresan parlama ile viral antijenlerin varlığı tespit edilebilmektedir (WHO, 2018).

DFAT testinden elde edilen sonuçların yetersiz olduğu durumlarda veya insan maruziyetinin olduğu tüm vakalarda, aynı numune üzerinde ilave testlerin yapılması veya diğer numuneler üzerinde DFAT testinin tekrarlanması önerilmektedir (OIE, 2018). Alternatif test olarak Real-time PCR, DRIT, hemi-nested PCR ya da hücre kültüründe izolasyon kuduz virusunun teşhisi için kullanılan metotlardır (Hoffman ve ark., 2010; Lembo ve ark., 2006 ve Rupprecht ve ark., 2018). Numunelerde otolizinin başladığı veya şüphelenildiği durumlarda da ilave testlerin yapılması özellikle önem arz etmektedir (OIE, 2018).

1.9.1.2.Direk Hızlı İmmünohistokimya Testi (dRIT)

Direk hızlı immunohistokimya testi, spesifite ve sensitivite bakımından Direkt Floresan Antikor Testine benzer özelliklere sahip olduğundan kuduz enfeksiyonunun rutin tanısında alternatif metot olarak kullanılabilir (Lembo ve ark., 2006). dRIT metotunda lyssavirus antijenleri streptavidin-biotin peroksidaz boyaması ile tespit edilebilmektedir (Coetzer ve ark., 2014; Madhusudana ve ark., 2012 ve Rupprecht ve

ark., 2014). Enfekte hayvanların beyin dokusunda gül kırmızısı renginde intrasitoplazmik inklüzyonların tespiti ile antijen tespiti yapılabilmektedir (WHO, 2018). DFAT testi ile kıyaslandığında floresan mikroskobuna erişimi olmayan laboratuvarlarda testin değerlendirilebilir olması bu testin avantajıdır (OIE, 2018; <https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/diagnosis-rabies>). Son on yılda Afrika, Asya ve tüm Amerika’da kuduz enfeksiyonunun tanısında yaygın olarak kullanılan bir metottur (WHO, 2018).

1.9.1.3. ELISA

Bir enzimle konjuge edilmiş antikor kullanılarak dokuda kuduz antijenini saptamayan immünosorbent tahlilinde ışık mikroskobu ile saptanabilen kalorimetrik substrat kullanılmaktadır (OIE, 2018; Nakane ve ark., 1966). İnsan temasının olduğu durumlarda diğer test metotları ile birlikte kullanımı önerilmektedir (OIE, 2018).

1.9.2.Virus İzolasyonu

Hücre kültürleri (RTCIT- Rabies Tissue Culture Infection Test) veya laboratuvar hayvanları (MIT-Mouse Inoculation Test) kullanılarak canlı kuduz virusunun tespiti yöntemi, DFA ve dRIT gibi antijen saptama testleri ya da PCR testlerini doğrulamak maksadıyla kullanılmaktadır. İki metot kıyaslaması yapıldığında MIT kadar hassas olan hücre kültürü testlerinde (Robardet ve ark., 2011 ve Rudd ve Trimarchi, 1989) deney hayvanı kullanılmaması ve daha ekonomik olması bu metotun avantajları arasındadır (OIE, 2018). İlk başlarda hücre kültüründe kuduz virusunu izole etmek için BHK-21, civciv embriyo ve neuroblastoma hücresi gibi farklı hücre dizileri kullanılmış ancak neuroblastoma hücre kültürünün RABV saha izolatlarına karşı daha duyarlı olduğu anlaşılarak kuduz virusu izolasyonu için rutin kullanımına başlanmıştır

(Larghi ve ark., 1975; Portnoi ve ark., 1982; Rudd ve ark., 1980; Rudd ve Trimarchi 1989; Smith ve ark., 1977; Smith ve ark., 1978 ve Umoh ve ark., 1983).

1.9.2.1. Fare inokulasyon testi (MIT)

İntraserebral olarak farelere patojen şüpheli inokulum verildikten sonra 28 gün boyunca hayvanlar günlük olarak gözlemlenir ve ölen fareler DFA veya dRIT testi kullanılarak kuduz yönünden incelemeye alınır. Yeni doğmuş ya da 3-4 haftalık fareler kullanılarak gerçekleştirilen testte pozitif olgularda farelerin kuduz spesifik semptomlar göstermesiyle ölüm gerçekleşir. Tek seferde bir fare beyninden büyük miktarda virusun izole edilmesi, daha ucuz ve daha hızlı sonuç vermesine karşın canlı hayvan deneyleri mümkün olduğunca tercih edilmemelidir (OIE, 2018).

1.9.2.2.Doku kültürü enfeksiyon testi (RTCIT)

Doku kültürü enfeksiyon testi, doku süspansiyonlarında ya da sıvı biyolojik materyallerde enfeksiyöz kuduz virusu (RABV) ya da diğer lysavirusların hücre kültürü teknikleri kullanılarak invitro olarak tespit edilmesini sağlar. İnsanlarda ve hayvanlarda kuduz enfeksiyonuna bağlı ölüm sonrası teşhis için beyin örnekleri yaygın olarak kullanılmaktadır ve DFAT için doğrulayıcı metot olarak kabul edilmektedir (WHO, 2018).

Test prosedürü kısaca; inokulasyon sonrası hücrelerdeki viral enfeksiyon spesifik inküzyonların oluşumuna neden olur ve genellikle enfeksiyondan 18-24 saat sonra hücre fiksasyonu ardından spesifik anti-rabies antikor floresan konjugat ile boyama yapılarak saptanması şeklindedir (Larghi ve ark., 1975; Smith ve ark., 1977; Smith ve ark., 1978; Sureau, 1986 ve Rudd ve ark., 1980). Hücre sitoplazmasında

parlak yeşil floresan inklüzyonlar floresan mikroskop yardımı ile tespit edilir (WHO, 2018).

1.9.3. Nükleik asit tespiti

1.9.3.1. Reverz Transkriptaz Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

Ribonükleik asit kökenli lyssaviruslerin tespiti için PCR testleri hassas metotlardır. Viral nükleoproteini kodlayan N geninin fazla miktarda kopyalanması metotuna dayanmaktadır (OIE, 2018). Kuduz RNA'sı, ters transkriptaz (RT) kullanılarak bir DNA molekülüne kopyalanır ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak amplifiye edilir (https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/amplification_methods.html). Geleneksel (jel bazlı) panlyssavirus hemi-nested RT-PCR (hnRT-PCR) testi ve Real Time panlyssavirus RT-PCR testi şüpheli numunelerdeki Lyssavirus RNA'sının tespiti için kullanılmaktadır. hnRT-PCR metotunun temel avantajı PCR sonucu elde edilen amplikonların genetik analiz çalışmalarında kullanılabilmesidir. Ancak değerlendirme kısmında elektroforez gibi ilave ekipman gerekliliği vardır. Real Time PCR ise geleneksel metota göre daha hassas ve daha kısa zamanda analiz imkanı sağlamaktadır (OIE, 2018).

1.9.4.Serolojik testler

Kuduz enfeksiyonu durumunda, kan serumunda virusa özgü antikorlar klinik belirtilerin başlangıcından sonra geç dönemde ortaya çıktığı için insanlarda ve hayvanlarda kuduz teşhis metodu olarak serolojik yöntemler kullanıma uygun değildir. Esas olarak serolojik testler kuduz aşılara karşı oluşan bağışıklık tepkisini

değerlendirmek maksadıyla kullanılmaktadır. Virus nötralize edici antikor titreleri, Floresan Antikor Nötralizasyon Testi (FAVN) ve Hızlı Floresan Odak İnhibisyon Testi (RFFIT) metotları kullanılarak değerlendirmeye alınır. Uluslararası ticaret ya da seyahat maksadıyla yurt dışına çıkacak evcil hayvanların kan serumları (<https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/diagnosis-rabies>) ve oral aşılama kampanyalarından sonra immunizasyon takibi için nötralizasyon testleri uygulanmaktadır (OIE, 2018). Serumda kuduz antikor varlığının değerlendirilmesi açısından nötralizasyon testlerine bir alternatif olarak ELISA testi kullanılabilir (Esterhuysen ve ark., 1995). ELISA testi ile özellikle glikoprotein ve nükleoprotein olmak üzere kuduz virusu antijenlerine spesifik bağlanabilen antikorlar tespit edilebilmektedir (<https://www.who-rabies-bulletin.org/site-page/diagnosis-rabies>). Daha kısa sürede sonuç verme ve canlı RABV veya hücre kültürü gerektirmeden uygulanabilme kolaylıklarına sahip ELISA testi, RFFIT ve FAVN testlerinin aksine nötralizasyon antikor ölçülemez, ancak serum numunesindeki spesifik olarak kuduz antijenlerine bağlanabilen antikor konsantrasyonunu tahmin edilebilir. Bu konsantrasyon, viruse karşı doğrudan bir koruma önlemi sağlamaz çünkü kaydedilen titre, viruse bağlanan ancak viruse karşı savunmaya katkıda bulunmayabilen antikorları da içermektedir (Esterhuysen ve ark., 1995).

1.9.5. Elektron mikroskopi

Elektron mikroskobu kullanılarak virusların yapısal bileşenleri ve inklüzyonları detaylı olarak gözlemlenebilir. Mikroskopik bakıda Kuduz virusu Rabdovirus ailesinde yer alması dolayısı ile mermi şeklinde parçacıklar şeklinde görülmektedir (https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/amplification_methods.html).

1.9.6. Fixed Kuduz Virusu Suşları

1.9.6.1. Laboratuvar Suşları

Laboratuvar suşları olarak orijinal Pateur virus suşunun türevleri olan CVS (Challenge/Control Virus Strain) ve PMPV (Pitman-More Pasteur Virus) yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve ark., 1993). CVS suşunun iki kararlı varyantı olan CVS-B2c ve CVS-N2c farelerde patojenite ve nöronlara etki bakımından farklılık göstermektedir (Morimoto ve ark., 1999). Laboratuvar suşları teşhis metodu olarak virus nötralizasyon ve fokus inhibisyon testlerinde kullanılmakta olup aynı zamanda kuduz enfeksiyonuna karşı mücadelede kullanılan aşılarda potens testlerinde kullanılmaktadır.

1.9.6.2. Aşı Suşları

Louis Pateur tarafından 1985 yılında yapılan ilk kuduz aşısından bu yana kuduz enfeksiyonu ile mücadele için yapılan aşı çalışmalarında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Dietzschold ve ark., 2003). Geçmişten günümüze kadar Kuduz aşısı üretiminde kullanılan zayıflatılmış aşı suşları: Pasteur Virus (PV), Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA), Street-Alabama-Dufferin (SAD), 3aG, Fuenzalida S-51 ve S-91, Ni-Ce, SRV9, PM, Nishigahara, RC-HL, Kelev, Flury, “Shelkovo-51”, “O-73 Uz-VGNKI”, “RV-71”, “Krasnopresnenskii-85” ve RV-97 suşudur (Borisov ve ark., 2002; Fodor ve ark., 1994; Gruzdev ve Nedosekov, 2001; Ito ve ark., 2001 ve Steck ve ark., 1982).

1.10. Korunma

Köpek popülasyonunun %70'i aşılandığında bir bölgede kuduzun başarıyla kontrol altına alınabileceğini ve kuduz bulaşını önleyerek insan ölümlerinin engellenebileceği tahmin edilmektedir (<https://www.cdc.gov/rabies/location/world/index.html>). Yabani hayvanlarda kuduzun kontrol altına alınması için enfekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara bulaş zincirinin kırılması önem arz etmektedir. Kuduz riskli bölgelere aşıli yemler dağıtılarak vahşi vektörlerden kuduzun elimine edilmesinde etkili bir yöntemdir. Evcil hayvanların kuduz aşılmasıyla amaç, bireysel olarak hayvanları koruyarak kayıpları en aza indirmektir (Yang ve ark., 2013).

Son yıllarda hayvanlarda kuduzun önlenmesi veya kontrol altına alınması amacıyla dünya çapında güvenli ve etkili olan modifiye canlı aşı, inaktive kuduz aşısı ve oral modifiye canlı aşı gibi çeşitli kuduz aşıları geliştirilmiş ve immunizasyon sağlamak maksadıyla kullanılmıştır (Yang ve ark., 2013). Kuduz enfeksiyonunun kontrolü için kullanılan aşilar uygulama yollarına göre sınıflandırılabilir (WHO, 2013).

1.10.1. Parantral aşilar

1.10.1.1. Modifiye-canlı Enjektabl aşilar

Embriyolu tavuk veya ördek yumurtaları üzerinde ardışık pasajlarla embriyolu yumurtalara adapte edilmiş modifiye kuduz suşlarından (örn. Flury suşu) üretilmiştir (Briggs, 2011). SAD ya da ERA gibi hücre kültürüne adapte suşlardan da üretilebilirler. Bu aşilar kuduza neden olabildikleri için “güvenli” olarak kabul edilmediğinden evcil hayvanlarda kullanılmamaktadır (WHO, 2013).

1.10.1.2. İnaktif (monovalan veya kombine) Enjektabl Aşılar

İnaktif (ölü) aşılar güvenli ve ucuz olduğu için evcil hayvanlarda kullanımı çok yaygındır (OIE, 2013). Primer hücre ya da devamlı hücre hatlarında üretilebilen inaktif aşılar tek başına (monovalan) veya diğer hayvan hastalıkları için diğer viral antijenlerle kombinasyon halinde (kombine) kullanılabilirler (Briggs, 2011 ve WHO, 2013). Challenge Virus Standart (CVS), Flury LEP, Flury HEP, Evelyn Rokitniki Abelseth (ERA), Vnukovo-32, Street Alabama Dufferin (SAD), Pasteur Virus (PV) ve Pitmann Moore (PM), gibi birçok kuduz virusu suşu inaktif hayvan kuduz aşıları üretimi için kullanılmaktadır (Reculard, 1996).

1.10.1.3. Rekombinant Vektör (monovalan/kombine) Enjektabl Aşılar

Kediler için kuduz glikoproteini eksprese eden bir Canarypox virus aşısı mevcuttur. Piyasada mevcut olan aşılar feline panlökopeni, feline calicivirus ve feline herpes virus ile kombine haldedir (WHO, 2013).

1.10.2.Oral aşılama

Oral aşılama kampanyalarında yem içerisindeki aşı içeriği, yemlerin dağıtım stratejisi, etkili ve güvenli bir aşısının kullanılması gibi faktörler aşı kampanyanın etkinliği üzerinde önemli role sahiptir (te Kamp ve ark., 2020). Gastro-intestinal sistemde kuduz virusu hızlı bir şekilde inaktive edileceği için aşı virusunun oral kavite içinde alınması virusa karşı bağışıklık tepkisinin gelişmesinde önem arz etmektedir (Baer ve ark., 1975). Özellikle Tonsilla palatina bölgesinin aşı suşunun tropizmi ve replikasyonu için en önemli bölge olduğu düşünülmektedir. Hayvan türleri arasında farenksin lenforetiküler dokusundaki morfolojik yapı bu bölgede virus alımı ve çoğalmasında türler arasında farklılıklara neden olarak aşıya karşı duyarlılık ya da direnç oluşuna sebep olmaktadır (Vos ve ark., 2017). Farklı konakçı türlerinde oral aşılama sonrası koruyucu immun yanıtı oluşturmak için gereken aşı titreleri farklılık

gösterdiğinden (Vos ve ark., 2017) oral aşıli baitler hedef olan hayvan türüne göre tasarlanmalıdır (Rosatte ve ark., 1992; WHO, 2012 ve WHO, 2018c). Tilki ve rakun köpekleri dışındaki rezervuar türlerde oral aşıli baitler ile kuduzla karşı koruyucu bir bağışıklık yanıtı oluşturmada halen zorluklar yaşanmaktadır (Vos ve ark., 2017). Kuzey Amerika'da kızıl tilkilerde (*Vulpes vulpes*), boz tilkilerde (*Urocyon cinereoargenteus*) ve çakallarda (*Canis latrans*) (MacInnes ve ark., 2001; Sidwa ve ark., 2005 ve Velasco-Villa ve ark., 2017) ve Avrupa'da kırmızı tilkiler ve rakun köpeklerde (*Nyctereutes procyonoides*) oral aşılama başarılı olurken (Freuling ve ark., 2013 ve Müller ve ark., 2015) rakunlar (*Procyon lotor*) ve çizgili kokarcılar (*Mephitis mephitis*) gibi bazı hedef türlerde oral bağışıklamanın verimsiz veya değişken etkinlikte olduğu gözlemlenmiştir (Maki ve ark., 2017 ve Slate ve ark., 2009). Yaban hayatının oral aşılama ya maksadıyla attenüe kuduz virusu ya da rekombinant formda yüksek titreli modifiye edilmiş canlı virus aşılı kullanılmaktadır (Kieny ve ark., 1984).

1.10.2.1.Modifiye Canlı Aşı

Modifiye edilmiş canlı aşı suşlarının tümü 1935 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Alabama eyaletinde kuduz bir köpekten izole edilen SAD (Street Alabama Dufferin) suşundan türetilmiştir (Fenje, 1960).

1.10.2.2. Rekombinant Canlı Aşı

Rekombinant vaccinia kuduz glikoprotein virus (V-RG), ERA suşunun glikoprotein geninin vaccinia suşuna (Kopenhag suşu) dahil edilmesiyle geliştirilmiştir (Cliquet, 2008 ve Wiktor ve ark., 1984). Poxvirus gen ekspresyonu ile elde edilen V-RG'nin güvenlik ve etkinlik çalışmaları maksadıyla kuduz rezervuarı olarak rakunlar ve kızıl tilkiler ile aşılama çalışmaları yürütülmüştür (Blancou ve ark., 1986; Rupprecht ve ark., 1986 ve Sami ve ark., 2020).

Vahşi yaşamda kuduzları kontrol etmek için adenovirus vektörlü kuduz virusu (ERA) glikoprotein rekombinant aşısı (ONRAB®) geliştirilmiştir (Shen ve ark., 2012 ve Sobey ve ark., 2019). Kanada'da kızıl tilki (*Vulpes vulpes*), rakun (*Procyon lotor*) ve çizgili kokarca (*Mephitis mephitis*) gibi yaban hayatı türlerinde oral aşılama maksadıyla kullanılmıştır (Fry ve ark., 2013).

OIE son yıllarda kuduz enfeksiyonunun kontrol stratejisinde köpeklerin paranteral aşılamasının yanısıra oral aşılama kampanyalarına da dahil edilmesini desteklemektedir. Enfeksiyonun yayılmasında önemli rol oynayan serbest dolaşan ve yakalanamayan köpeklerin oral aşılama ile aşılama köpek aracılı bulaş zincirinin elimine edilmesinde önem arz etmektedir (OIE, 2018). Ancak parenteral aşılama ile köpeklerde >% 95 oranında oluşan güçlü bağışık yanıt oral aşılama ile aynı oranda garanti edilememektedir. Bu sebeple sahipli ya da yakalanabilir köpekler için birincil bağışıklama yöntemi olarak paranteral aşılama önerilmektedir (WHO, 2018c).

Kuduz enfeksiyonunun yeniden ortaya çıkışının önlenmesi ancak bölgesel bir yaklaşımla sürekli oral aşılama programları uygulaması ile önlenilmektedir. Bu sebeple 2021–2022 yıllarında Arnavutluk, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Hırvatistan, Yunanistan, Macaristan, Karadağ, Polonya, Romanya, Sırbistan ve Slovakya için kuduz eradikasyon programları planlanmaktadır (Lojkić ve ark., 2021). Ülkemizde de kuduzla mücadele amacıyla yaban hayat için oral aşılama kampanyaları, evcil hayvanlar için ise paranteral aşılama çalışmaları devam etmektedir.

Vampir yarasalarda kuduz kontrol yöntemi olarak, yakalanan yarasaların sırt kısımlarına uygulanan antikoagülan macun kullanımı ile yarasa popülasyonunun azaltılmasıdır. Serbest bırakılan yarasalar karşılıklı tımar yoluyla zehiri koloniye yayar. Ancak bu yöntem sınırlı alanlarda kısa süreli çözüm önerisi sunmaktadır (Johnson ve ark., 2014).

Kuduzla mücadele, bir bütün olarak düşünölmelidir. Şüpheli hayvanla temas-sonrası profilaksi uygulanması, risk altındaki kişileri temas-öncesi profilaksiyle bağışıklama, rezervuar hayvanlarda enfeksiyonun kontrolü amacıyla aşılama (özellikle evcil köpekler) ve başıboş köpek popölasyonlarının kontrolü ve toplumsal farkındalık kuduzla mücadelede en önemli rol oynamaktadır (<http://www.who.int/topics/rabies/en>).

Bu bilgiler ışığında planlanan bu tez çalışmasında;

- ✓ Türkiye orijinli saha örneklerinin dahil olduğu farklı Kuduz virusu suşlarının hücre kültürüne adaptasyonun sağlanması
- ✓ 2013-2020 yılları arasında evcil ve vahşi hayvan orjinli Kuduz virusu saha suşlarının Nökleoprotein (N) ve Glikoprotein (G) gen bölgelerinin tam genom analizlerinin yapılması
- ✓ Hücre kültürüne adaptasyonu sağlanan Kuduz saha izolatlarının aşılantmış hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde Kuduz spesifik antikor varlığını tespit edebilme özelliklerinin sorgulanması
- ✓ Kullanılan farklı hücre kültürlerine virus adaptasyonu sonrası N bölgelerindeki baz değışimlerinin moleküler tekniklerle kontrolü
- ✓ Ülkemiz orjinli saha izolatlarının yerli Kuduz aşısı üretimine katkı sağlayabilmesi için yeni projelere hammadde olarak hizmet etmesi hedeflenmiştir.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1. Virolojik ve Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Örnekler

Doktora tez çalışması, Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Etik Kurulu (Karar **No:2018/09**) (Ek-1) izni ve TAGEM (06.09.2019 tarihli AYK kararı, Destek no: HSGYAD/A/20/A5/P6/1856) proje desteği ile yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, saha izolatu kazanımı amacıyla 18 adet Kuduz virus pozitif beyin örneği ve serolojik çalışmalar amacıyla 72 adet evcil aşıllı kedi ve köpeklerden elde edilen serum örnekleri kullanıldı (Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 76899830-604.01.01[020]-E.3741514 sayılı izni).

Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden 2013-2020 yılları arasında Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'ne gönderilen ve -80 °C'de muhafaza edilen beyin örnekleri kullanıldı. Örneklerin alındığı iller ve hayvanlara ait bilgiler Çizelge 2.1'de verildi.

Serolojik değerlendirme amacıyla Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsüne gönderilen toplam 72 adet (köpek=43, kedi= 29) kan serum örneği kullanıldı. Kan serumları -20 °C' de muhafaza edildi. Örneklerle ait bilgiler Çizelge 2.2'de verildi.

EVKMAE Kuduz Teşhis Laboratuvarı bünyesinde bulunan referans Kuduz virusları PV (Pasteur Virus) ve CVS-11 (Challenge Standart Virus) hücre kültürü adaptasyon çalışması için kullanıldı.

Çizelge 2.1. 18 adet Kuduz pozitif saha örneğine ait bilgiler.

Konakçı türü	İzolasyon Yılı	Coğrafi lokasyonu	Ait olduğu dal	Örneklendirme ismi
Sığır	2014	Hatay	Kafkas	1K
Köpek	2014	Şanlıurfa	Kafkas	2K
Eşek	2013	Şanlıurfa	Kafkas	3K
Köpek	2020	Ardahan	Kafkas	K1
Köpek	2014	Sivas	Doğu	4D
Tilki	2013	Kahramanmaraş	Doğu	5D
Tilki	2013	Kahramanmaraş	Doğu	6D
Sığır	2020	Balıkesir	Batı	D1
Sığır	2020	Çanakkale	Batı	D2
Sığır	2020	Çanakkale	Batı	D3
Sığır	2020	Balıkesir	Batı	D4
Tilki	2013	Balıkesir	Batı	7B
Porsuk	2013	Çanakkale	Batı	8B
Tilki	2014	Aksaray	Batı	9B
Eşek	2020	Mardin	Doğu	B1
Sığır	2020	Hakkari	Doğu	B2
Sığır	2020	Elazığ	Doğu	B3
Sığır	2020	Diyarbakır	Doğu	B4

Çizelge 2.2. Kuduz antikor varlığı bilinen serum örneklerine ait bilgiler.

	Örnek Kodu	Hayvan Türü	Uygulanan Aşı Adı		Örnek Kodu	Hayvan Türü	Uygulanan Aşı Adı
1	413	Köpek	A aşısı	37	66431	Köpek	A aşısı
2	452	Köpek	B aşısı	38	66455	Köpek	E aşısı
3	453	Köpek	B aşısı	39	554	Kedi	E aşısı
4	454	Köpek	B aşısı	40	603	Köpek	D aşısı
5	465	Köpek	C aşısı	41	604	Köpek	D aşısı
6	470	Kedi	C aşısı	42	605	Köpek	A aşısı
7	472	Köpek	E aşısı	43	606	Köpek	E aşısı
8	483	Köpek	C aşısı	44	611	Kedi	E aşısı
9	484	Köpek	D aşısı	45	65847	Kedi	D aşısı
10	489	Kedi	E aşısı	46	65873	Köpek	E aşısı
11	490	Kedi	A aşısı	47	65879	Kedi	D aşısı
12	537	Köpek	E aşısı	48	65887	Köpek	D aşısı
13	551	Kedi	E aşısı	49	65910	Kedi	A aşısı
14	584	Kedi	C aşısı	50	65911	Kedi	A aşısı
15	593	Kedi	C aşısı	51	65955	Kedi	E aşısı
16	594	Köpek	C aşısı	52	65966	Köpek	D aşısı
17	595	Köpek	C aşısı	53	65994	Köpek	A aşısı
18	596	Köpek	C aşısı	54	65995	Köpek	A aşısı
19	48338	Köpek	D aşısı	55	65996	Köpek	A aşısı
20	48869	Köpek	E aşısı	56	66013	Kedi	E aşısı
21	49925	Köpek	E aşısı	57	66014	Kedi	E aşısı
22	703	Köpek	E aşısı	58	66025	Köpek	E aşısı
23	706	Kedi	D aşısı	59	66026	Köpek	E aşısı
24	708	Kedi	E aşısı	60	66028	Köpek	C aşısı
25	717	Köpek	E aşısı	61	66046	Köpek	D aşısı
26	746	Köpek	E aşısı	62	66095	Kedi	E aşısı
27	757	Kedi	D aşısı	63	66133	Köpek	B aşısı
28	768	Köpek	E aşısı	64	66139	Köpek	A aşısı
29	769	Kedi	E aşısı	65	66178	Köpek	E aşısı
30	851	Kedi	A aşısı	66	66190	Kedi	E aşısı
31	853	Köpek	E aşısı	67	66228	Kedi	E aşısı
32	877	Köpek	A aşısı	68	66229	Kedi	E aşısı
33	894	Köpek	E aşısı	69	66913	Kedi	A aşısı

34	66231	Kedi	E aşısı	70	66923	Köpek	E aşısı
35	66337	Kedi	E aşısı	71	66926	Kedi	A aşısı
36	66349	Köpek	D aşısı	72	67149	Kedi	D aşısı

2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılmak üzere temin edilen kimyasal ve sarf malzemeleri aşağıda listelendi.

1. Phusion DNA polymerase
2. 1000 bp DNA Ladder
3. Pipet tip
4. Pipet p10
5. Pipet p100
6. Pipet p300 (Çok kanallı)
7. Steril tek kullanımlık pipet (5 ml ve 10 ml)
8. dNTP mix
9. Nitril eldiven medium
10. Agoroz jel
11. Water Molecular biology grade
12. PBS Solution
13. MEM vasat (1X)
14. DMEM vasat (1X)
15. Fetal Bovine Serum

16. Tyrpsine-EDTA Solution %0,25
17. 25 cm² hücre kültürü flaskı
18. 96 gözlü pleyt
19. Lam ve lamel
20. Kurutma kağıdı
21. Fujirebio FITC Anti Rabies İmmunoglobulin
22. Goat anti Mouse 1gG FITC
23. 10X TBE Buffer

2.1.3.Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitler aşağıda belirtilmiştir.

1. MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche)
2. PCR Clean-Up Kit
3. CDNA Synthesis Kit
4. PCR Gel Extraction Kit

2.1.4. Cihazlar

Tez çalışmasındaki araştırmalar Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı bünyesinde bulunan cihazlar kullanılmıştır.

1. Holten Biyolojik Güvenlik Kabini

2. MagNa Pure Compact (Roche, Germany)
3. Bio-Rad Thermal Cycler (PTC 0220) (Bio-Rad, Meksika)
4. Sartorius Hassas Terazı
5. Mikrodalga Fırın
6. Consort Elektroforez Sistemi (EV233)
7. Etüv (CO₂li) (ECO-170-230, Excella)
8. Hettich Soğutmalı Santrifüj (Universal 320R 1406)
9. NanoDrop Spektro-fotometre (ND-1000)
10. Olympus Floresan Mikroskop
11. Kodak Gel Logic 2200 Imaging System
12. Daigger Vortex (G-560E)
13. Applied Biosystems (Abi prism 3500 genetic analyzer)
14. UV Transilluminator
15. +4 °C Buzdolabı
16. -20 °C Derin dondurucu
17. -80 °C Derin dondurucu

2.2. Yöntem

2.2.1. Floresan Antikor Testi (FAT)

Kuduz teşhisinde altın standart olan metot için 18 adet beyin numunesinin her biri bistirü ile küçük parçalara ayrıl. Kurutma kağıdına konan beyin doku parçasıyla lam üzerine bası uygulandı. Hazırlanan preparatlar -20°C' de asetonda 30 dakika fikzasyona bırakıldı. Preparat üzerine FITC Anti-Rabies Monoklonal Globulin (FUJİREBİO® Diagnostic, Inc., USA) damlatılıp 30 dakika 37°C etüvde inkube edildi. Süre sonunda 1X PBS (pH 7,4) ile 10 dakika yıkamanın ardından distile su ile yıkama yapılan preparatlar kurutuldu. İmmersiyon yağı damlatılan preparatların üzeri lamel ile kapatılarak floresan mikroskop altında floresan yeşil renkte kuduz spesifik antijenik yapılar (Negri cisimcikleri) gözlemlendi. FAT testi ile araştırmada kullanılan pozitif beyin örneklerinin doğrulaması yapıldı.

2.2.2. Hücre Kültürlerine Virus İnokulasyonu

Üç dala ait toplamda 18 adet kuduz pozitif beyin örneği Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco, USA) içinde % 20' lik süspansiyon olarak hazırlanıp vortekslendi. Süspansiyon 3 000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant enjektör ve 0,2 µm filtre ile süzüldü. Her bir örneğe ait süpernatant BHK-BSR (Clone13), VERO (CCL-81) ve Murine Neuroblastoma (Na 42/13) hücre hatlarına inokule edildi. Kuduz referans virus suşları CVS (Challenge virus standart) ve PV (Pasteur virus) de aynı hücre hatlarına inokulasyon yapıldı. Bu amaçla, saha örnekleri için enfeksiyon çokluğu (MOI) 1 olacak şekilde adsorbsiyonlu virus ekim metodu kullanılmış olup; %90 monolayer kaplı 25 cm² doku kültürü şişelerinde gerçekleştirildi. Virusun üremesi için 37°C'de 72 saat inkubasyonun ardından doku kültürü şişeleri -80°C'de dondurulup 37°C'de çözündürme yapılarak 5000 rpm de 15 dk (+4 °C'de) santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar steril tüplere porsiyonlanarak

-80 °C’de donduruldu. Saha virus suşlarının hücre kültürüne adaptasyon ve izolasyonu maksadıyla yapılan 3 kör pasajın ardından floresan boyama ile üreme kontrolü yapıldı. Toplamda her örnek için en az 10 kör pasaj inokulasyona alındı. Kuduz referans virus suşları (PV ve CVS-11) ise 0,5 MOI olacak şekilde 0,25 ml’de sulandırma yapılarak 72 saat inkubasyon periyodu ile 3 kör pasaj olacak şekilde BHK-BSR (Clone13), VERO (E6) ve Murine Neuroblastoma (Na 42/13) hücre hatlarına inokulasyonları gerçekleştirildi.

2.2.3. Monoklonal Antikorlar ile Virus Üreme Tespiti

Üreme kontrolü maksadıyla saha viruslarının hücre kültürüne 3. ve 6. Pasajlarından sonra floresan işaretli monoklonal antikorlar ile boyamaları yapıldı. Hücre kültürlerine adapte olup üreme gösteren viruslar; N gen için FITC Anti-Rabies Monoklonal Globulin (FUJIREBİO® Diagnostic, Inc., USA) ile boyanarak floresan parlamalar mikroskop altında gözlemlendi. Referanz viruslar için ise 1. ve 3. Pasaj sonunda infektivite kontrolü için aynı şekilde floresan boyamaları gerçekleştirildi.

2.2.4. Virus Titrasyonu

Floresan işaretli monoklonal antikor ile üremede pozitiflik tespit edilen saha örnekleri 6. pasajda, referenz kuduz virusu suşları ise 3.pasajda titrasyon testine alındı. Virus izolatlarının standardizasyonu amacıyla Frey ve Liess’in (1971) bildirdiği metota göre virusların 10 katlı dilusyonları hazırlandı ve 96 gözlü pleytlerde titrasyon testi yapıldı. Direkt Floresan Antikor Tekniği (dFAT) ile boyama yapılarak, Sperman-Kärber metodu ile $DKID_{50}/ml$ ’de olacak şekilde hesaplaması yapıldı. Virus titrasyonu ile üç farklı hücre hattına (Murine Neuroblastoma, BHK BSR Clone 13 ve VERO) inokulasyonu yapılan kuduz viruslarının enfeksiyözite güçleri belirlendi.

Spearman-Kärber metodu hesaplaması;

$$\text{Log}_{10} \text{DKID}_{50} / \text{ml} = - [X_0 - d / 2 + d (r / n)]$$

X_0 : İnokulasyon yapılan tüm konakçılarda pozitiflik tespit edilen en düşük sulandırma değerinin Log_{10} 'u.

d : Sulandırma faktörünün Log_{10} 'u.

n : Her sulandırma için kullanılan konakçı sistem sayısı.

r : X_0 ve daha düşük sulandırmalarda tespit edilen pozitiflerin toplamı.

2.2.5. Floresan Antikor Virus Nötralizasyon (FAVN) Testi

Virus titrasyon testi ile titresini belirlenen hücre kültürüne adapte saha virusu ile daha önce kuduz aşısı ile aşılanmış ve kuduz antikor varlığı bilinen hayvanlara ait 72 adet serum örneği FAVN testine alındı. Aynı şekilde, hücre kültürü adaptasyonları gerçekleştirilen kuduz referenz PV ve CVS virusları aynı serum örnekleriyle ayrı ayrı FAVN testine alındı ve serumların antikor titreleri IU/ml olarak hesaplandı.

Test Protokolü; Kuduz antikor tespiti için kullanılacak serum numuneleri 56°C 'de 30 dakika inaktive edildi. 96 gözlü mikroyetkin tüm kuyucuklarına 100 μl MEM vasatı ilave edildi. Her serum örneği alt alta sıralı dört göz kuyucuğa 50 μl ilave edilerek çok kanallı pipet yardımıyla 1/3 den 1/729 dilüsyona kadar seyreltilti. Bu sulandırma işlemi test kontrolü olarak; virus titrasyon, OIE serum (referans serum), negatif ve pozitif kontrol serumlarının bulunduğu yetkin için de uygulandı. Sulandırma işleminin ardından titresini bilinen ve standardize edilmiş virustan (100DKID₅₀) her kuyucuğa 50 μl ilave edildi. Mikroyetkinler % 2,5 CO₂'li inkübatörde 60 dk 35 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası büyüme ortamında seyreltilmiş 100 μl hücre

süspansiyonundan her bir kuyucuğa 4×10^5 hücre/ml konsantrasyonda ilave edildi. Üzeri kapatılmış pleytler % 2,5 CO₂'li 35°C'lik etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda etüvden alınan pleytlerden içerik uzaklaştırılarak %80'lik aseton ile 30 dk oda ısısında fiksasyon işlemi yapıldı ve ardından aseton uzaklaştırılarak pleytler kurumaya bırakıldı. Her bir göze çalışma dilusyonu üreticinin tavsiyelerine göre hazırlanan, FITC Anti-Rabies Monoklonal Globulin (FUJIREBİO® Diagnostic, Inc., USA) ilave edilerek 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası içerik dökülerek her kuyucuk iki kez PBS ve bir kez distile su ile yıkandı ve kurutma yapıldı. Sonuçlar 10X'lik oküler büyütme ile floresan mikroskop altında değerlendirilmeye alındı. Floresan parlamaların olmadığı kuyucuklar negatif olarak değerlendirildi. Bir veya daha fazla floresan hücre parlaması pozitif değerlendirilerek sonuçlar, Sperman-Kärber yöntemine (Kärber 1931) göre hesaplandı. Serum titreleri her testte yer alan Referans Serum titresi ile karşılaştırılarak ml başına IU olarak ifade edildi. Her testin geçerliliği virus titrasyon (DKID₅₀), referans serum (D50) ve pozitif standart (D50)'dan elde edilen sonuçlar ve geriye titrasyon kontrolüne göre değerlendirildi (Cliquet ve ark., 1997 ve Smith ve ark., 1973). FAVN testi sonucunda, referenz viruslarla ve saha suşu ile elde edilen seroloji sonuçlarının SN₅₀ değerleri ile karşılaştırılarak genel serolojik değerlendirmeleri yapıldı.

Seroloji sonuçlarının istatistiksel yönden değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis, Ki-Kare metodu, standart sapma, standart hata ve yüzde hesabı kullanıldı.

2.2.6. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Türkiye'nin farklı illerinden gönderilen kuduz pozitif beyin örneklerinin ve hücre kültürü inokulasyonu ile sonrası üremesinde pozitiflik alınan izolatların ekstraksiyonu, MagNa Pure Compact (Roche, Japan) cihazı ve MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Almanya) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. RNA ekstraksiyonu sonunda elde edilen nükleik asit

miktarı NanoDrop TM spektrofotometre (ND-1000, ThermoScientific, USA) ile ölçümü yapıldı. Moleküler çalışmada kullanılıncaya kadar ekstraktlar -20 °C’ de muhafaza edildi.

2.2.7.Viral RNA’dan Reverz Transkriptaz Enzimi (RT) Yardımıyla Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Ekstraksiyon sonrasında elde edilen viral RNA’nın revers transkripsiyonu amacıyla Revert Aid TM First Standart cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı. Yapılan karışımların içerikleri ve uygulanan ısı döngüleri Çizelge 2.3 ve 2.4’ de verildi. Tüm bu işlemler için termal döngü cihazı (Bio-Rad, Meksika) kullanıldı.

Çizelge 2.3. Reverse Transcriptaz Polimeraz Chain Reaksiyonu (RT-PCR) için mix hazırlanması.

Mix 1		Mix 2	
Moleküler Düzeyde Deiyonize Su	3 µl	5X Reaksiyon Buffer	2 µl
Random Hekzomer Primer	0,5 µl	10 mM dNTP mix	1 µl
Viral RNA	3 µl	Reverse Transcriptase Enzim	0,5 µl
Toplam	6,5 µl	Toplam	3,5 µl
Toplam reaksiyon hacmi		10 µl	

Çizelge 2.4. RT-PCR uygulama protokolü.

Isı	Süre	Protokol
70 °C	5 dk.	Mix 1
25 °C	10 dk.	
37 °C	60 dk.	Mix 1+ Mix 2
72 °C	5 dk.	

2.2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

RABV enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonu amacıyla N (full 1536 bp) ve G (full 1778 bp) gen bölgeleri seçilmiş olup beyin örneklerine hedef gen bölgesini çoğaltan primerler ile RT-PCR uygulanmıştır. İlgili ürünlerin elde edilmesi amacıyla, Çizelge 2.5’ de bildirilen primerler kullanılarak Thermo Scientific Phusion DNA polymerase kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan gen bölgeleri (Şekil 2.1) için PCR karışım bileşenleri ve PCR döngüsüne ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.6 ve 2.7’de gösterildi.

Çizelge 2.5. RABV tanısı ve moleküler karakterizasyonu için kullanılan primer dizinleri.

Primerler	Ürün Büyükülüğü	Dizin (5'→3')	Referans
NF(forward)		ACGCTTAACAACAAAAYCADAGAAG	
NR(reverse)	1536 bp	GGRTTGACGAARATCTTGCTCAT	(Feng ve ark., 2019)
GF(forward)		CGCTGCATTTYATCAAAGTCAAG	
GR(reverse)	1778 bp	TGMAYGGAGTTCAAGGAGGAC	



Şekil 2.1. Kullanılan primerlerin genler üzerindeki yerleri.

Çizelge 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) karışım bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Moleküler Deiyonize Su	10µl
MgCl ₂	0,6µl
5X Phusion Buffer	4µl
Primer- forward	1µl
Primer- reverse	1 µl
Phusion DNA polymerase	0,2 µl
dNTP Mixture (10mM)	0,6 µl
DMSO	0,6 µl

Çizelge 2.7. İlgili primerlara ait PCR döngü protokolleri.

	N gen PCR Döngüsü	G gen PCR Döngüsü
Başlangıç	98°C → 30 sn	98°C → 30 sn
Denaturasyonu		
Döngü	98°C → 10 sn 52°C → 30 sn 72°C → 45 sn	98°C → 10 sn 56,7°C → 30 sn 72°C → 50 sn
Son Uzama	72°C → 10 dk	72°C → 10 dk

2.2.9. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonucunda elde edilen ampliconları görüntülemek için, GelRed® (Biotium, ABD) içeren %1,5' luk agaroz jel (Sigma, ABD) hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanmasında ve tank tamponunda TBE (Tris Borate-Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA)) solüsyonu kullanıldı. Isı yardımıyla (mikro dalga fırın) solüsyon içinde çözünen agaroz, soğutulduktan sonra üzerine 0,5 µg/ml oranında GelRed® (Biotium, ABD) konuldu ve karıştırıldı. Jel tarakları yerleştirilmiş olan jel küvetine bu karışım döküldü. 20 dakika sonra donmuş olan jel elektroforez tankına yerleştirildi.

Elde edilen PCR ürünleri yükleme boyası (6X Loading Dye, Thermo Scientific, Lithuania) ile karıştırılarak jele yüklendi. Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için 1000 bp'lik marker (Thermo Scientific, Lithuania) solüsyonundan en dıştaki kuyucuklara 1µl yüklendi. Ürünler yaklaşık 20 dakika, 16 Volt/cm elektrik akımına tabi tutuldu. Jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 1500) kullanılarak PCR sonucu oluşan ampliconlar UV ışık altında görüntülendi.

2.2.10. Amplikonların Purifikasyonu

Amplikonlar görüntüledikten sonra dizin analizi yapılabilmesi için saflaştırma işlemine tabi tutuldu. PCR sonucunda beklenen büyüklükte tek bir bant elde edilmişse “clean-up” kiti (DyeEx 2.0 spin kit, Qiagen) kullanıldı. Beklenen bant dışında farklı bantlar da var ise, ticari “gel extraction” kiti (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, USA) kullanıldı. Söz konusu kullanılan kite ait protokol aşağıda belirtilmiştir.

Jel Ekstarksiyon Protokolü

Görüntülenen spesifik bant steril bisturi yardımıyla %1’ lik agaroz jelden kesilerek darası alınan eppendorf tüplere konuldu. Ağırlıkları ölçülen bantların ağırlığının 3 katı miktarda “Buffer QG” solüsyon konuldu. 50 °C’ de 10 dk bekletilip eppendorf tüpteki jelin tamamen erimesi sağlandı. Numuneye 1 jel volumünde izopropanol eklenip karıştırıldı. Yıkama için QIAquick kolonuna 0,75 ml Buffer PE eklenip vakumlandı. QIAquick kolonu temiz 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak 17.900xg (13000 rpm) devirde 1 dk santrifüj edildi. QIAquick kolonu temiz 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine alınır membran merkezine 50 µl Buffer PE eklendi ve 17.900xg (13000 rpm) devirde 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen amplikonlar kontrol amacıyla tekrar agaroz jelde yürütüldü, uygun olanlar sekans analizine kadar -20 °C’ de saklandı.

Clean-up Protokolü

Filtreler kapakları gevşek şekilde oda ısısında 2300 rpm devirde 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süzülen kısım atıldı. Steril eppendorf tüplere alınan filtrelere

PCR ürünü ilave edilerek 2300 rpm devirde 3 dk santrifüj edildi. Elde edilen amplikonlar kontrol amacıyla tekrar agaroz jelde yürütüldü, uygun olanlar eppendorf tüp içinde sekans analizine kadar -20 °C’ de saklandı.

2.2.11. Dizin Analizi

Saflaştırılan PCR ürünlerine BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı. Boyalı nükleotidlerle işaretleme işlemi Çizelge 2.8’ de gösterilen reaksiyon karışımı ve ısı döngülerinde gerçekleştirildi. Sanger metotuna göre yapılan dizin analizi için ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystem, ABD) cihazı kullanıldı.

Çizelge 2.8. DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı ve Isı Döngüsü.

DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı			
Bileşen	Forward (µl)	Reverse (µl)	Program ve Döngü Sayısı
BigDye™ Terminator 3.1	4		96 °C→ 1 dk
Ready Reaction Mix			96 °C→ 10 sn
BigDye™ Terminator v1.1& v3.1 5X Sequencing Buffer	2		50 °C→ 5 sn
			60 °C→ 4 dk
Forward Primer (3.2 µM)	2	-	4 °C→ Hold
Reverse Primer (3.2 µM)	-	2	
Deiyonize su (RNase/DNase free)	2	2	
DNA	2	2	
Toplam	12	12	

2.2.12. Moleküler *in silico* analiz, Karakterizasyon ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Analiz sonrası dizinler National Center for Biotechnology Information (NCBI)' in veri tabanında yer alan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programına (Camacho ve ark., 2009) yüklendi. Dizin analizi konfirmasyonu sağlanarak moleküler karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi.

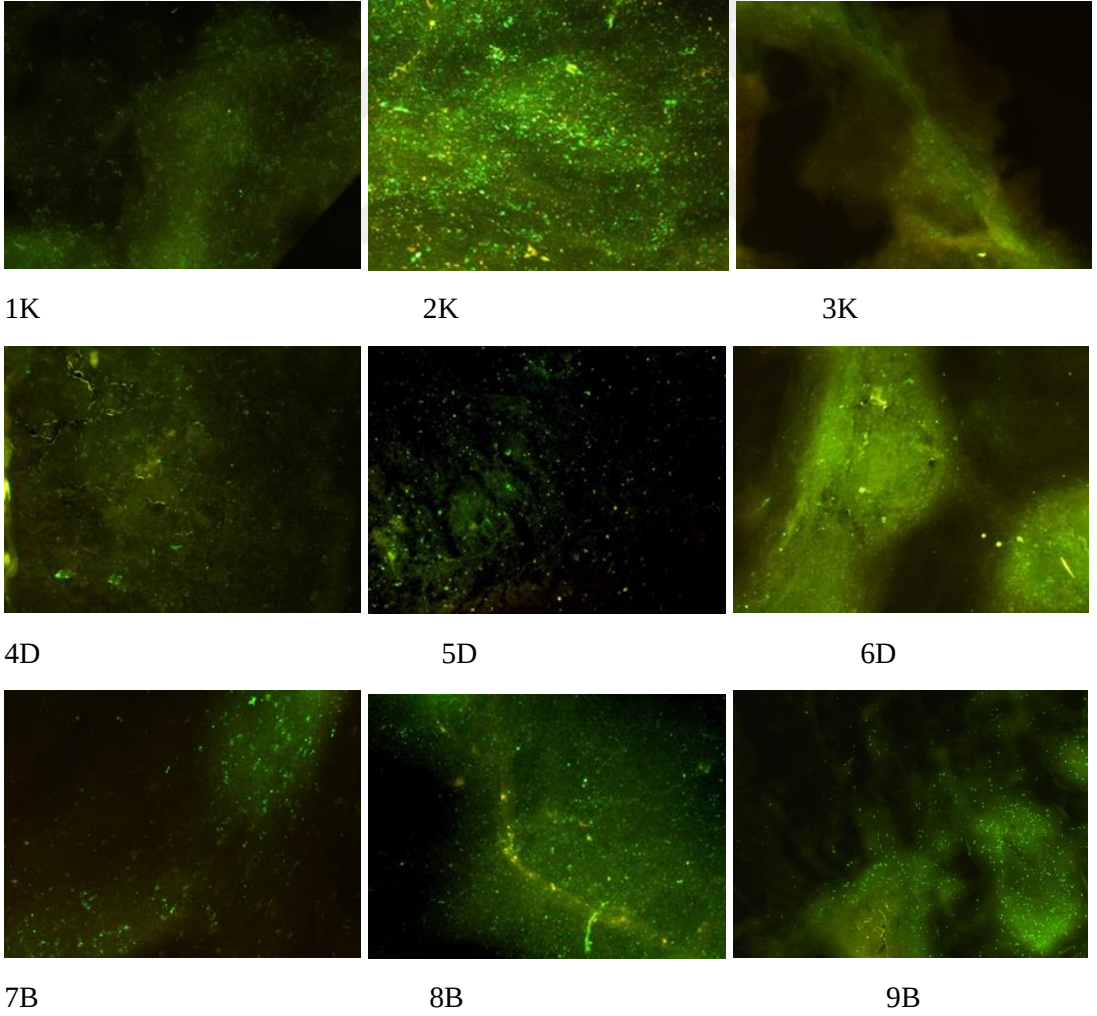
Sekans analizleri sırasında histogramları kontrol etmek amacıyla Moleküler Evolutionary Genetic Analysis version 7.0 (MEGA v.7) (Kumar ve ark., 2016) programının “Tracer” bölümü kullanıldı. Aynı gen bölgesine ait dizilerin çoklu hizalaması “Clustal W Aligment” kullanılarak yapıldı. Hizalama sonrası dizinler 5’ ve 3’ uçlarından kesilerek uzunluk eşitlemeleri yapıldı. Nükleotid bazlı değişiklikler izlenerek karşılaştırma yapıldı.

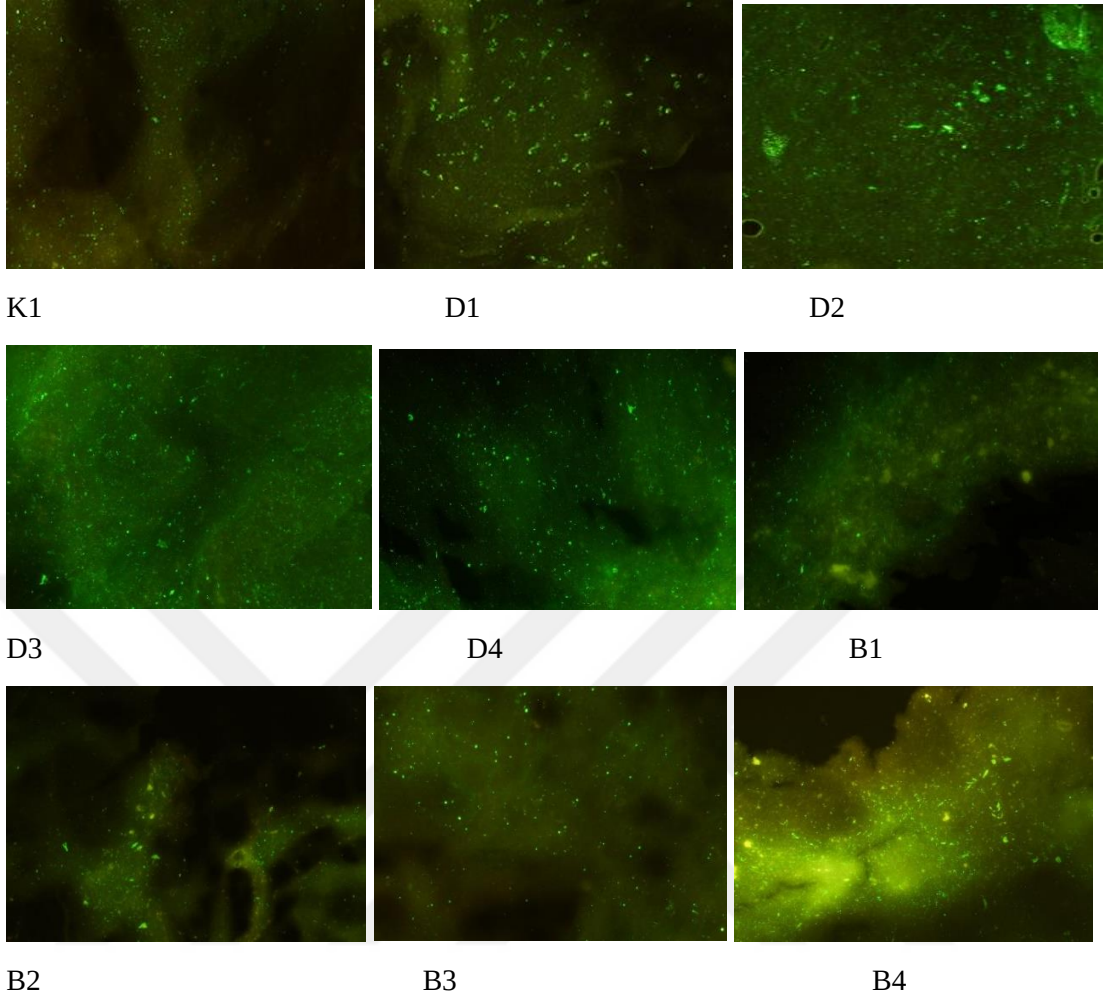
N ve G gen yönünden tam genom analizi yapılan örneklerin sekansları ile NCBI’ın altında yer alan GenBank veri tabanından referans dizinler ve diğer ülke suşları alındı (Benson ve ark., 2014). BioEdit programında Clustal W yöntemi ile hizalama işlemi yapılarak filogenetik analize geçildi. Modelleme için “Find best DNA models” işlemi yapıldı. Modelleme sonrası Maksimum Likelihood (ML) ağacı oluşturmak için programda Maximum Likelihood istatistiksel metodu, Kimura-2 parametre modeli, 1000 bootstrap tekrarı seçildi. İşlem sonunda filogenetik ağaç elde edildi ve ağaç üzerinde tiplendirme yapıldı. N ve G gen sekans verileri kullanılarak BioEdit programında RABV örneklerinin dizinlerine ait amino asit yapıları oluşturuldu (Hall, 1999).

3.BULGULAR

3.1. Floresan Antikor Testi Sonuçları

Sahadan elde edilen 18 adet beyin numunesinden hazırlanan preparatlar floresan boyama yapılarak floresan mikroskop altında floresan yeşil renkte kuduz spesifik antijenik yapılar yönünden incelendi ve Negri cisimcikleri gözlemlendi (Şekil 3.1).





Şekil 3.1. Kuduz virusu pozitif beyin örneklerinde floresan yeşil renkte negri cisimcikleri görüntüsü.

3.2. Hücre Kültürüne Virus İnokulasyonu ve Monoklonal Antikor Boyama Sonuçları

18 adet saha suşunun hücre kültürü (Vero, BHK BSR Clone 13 ve Murine Neuroblastoma) adaptasyonu için gerçekleştirilen 3 kör pasaj ardından dFAT boyaması yapıldı; üç adet saha örneğinde (1K, 2K ve 8B) Murine Neuroblastoma hücre kültüründe floresan parlama görülmesi ile virusun üreme tespiti sağlandı (Çizelge 3.1). Enfeksiyözite gücünün artırılması amacıyla 10 pasaj olacak şekilde hücre kültürü inokulasyonu yapıldı ve üreme kontrolünde pozitiflik veren

Neuroblastoma hücre hattındaki örnekler için 10. pasajda titre tayini yapıldı. Neuroblastoma hücre hattında iyi üreme gösteren bir adet saha örneği (1K) titre artışı maksadıyla 15 kere pasajlandı ve titre tayini yapıldı (Çizelge 3.3).

3 kör pasaj ardından dFAT boyamada üreme görülmeyen BHK-21 ve VERO hücre hattı için 3 kör pasaj daha yapılarak boyama ile üreme kontrol basamağı tekrarlandı. Toplamda 10 hücre kültürü pasajı yapılan ve floresan boyama sonucu ışıldama vermeyen örnekler için enfeksiyöz virus partikülü bulunmadığı veya BHK-21 ve VERO hücre kültürüne adaptasyonunun gerçekleştirilemediği sonucuna varıldı.

Referenz Kuduz viruslarının (PV ve CVS) hücre kültürü (Vero, BHK BSR Clone 13 ve Murine Neuroblastoma) adaptasyonları da aynı metotla değerlendirildi. CVS suşu 1. Pasajda üç hücre kültüründe de üremede pozitiflik gösterdi. Ancak ilerleyen pasajlarda Vero hücre kültüründe üreme tespiti yapılamadı. PV suşu floresan boyama sonucunda BHK BSR Clone 13 ve Murine Neuroblastoma hücre kültüründe üreme sonucu parlama verirken Vero hücre kültüründe floresan parlama tespit edilemedi (Çizelge 3.2). Üreme kontrolünde pozitiflik veren hücre hattındaki referenz viruslar için 3. Pasajın sonunda titrasyon testi yapıldı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.1. Monoklonal antikor boyama sonucu hücre kültüründe üreme gösteren Kuduz saha virusları.

Pozitif Saha Virusu	Murine Neuroblastoma-3.Pasaj Üreme Kontrolü	Murine Neuroblastoma-6.Pasaj Üreme Kontrolü	BHK BSR Clone 13 - 3.Pasaj Üreme Kontrolü	BHK BSR Clone 13 - 6.Pasaj Üreme Kontrolü	Vero-3.Pasaj Üreme Kontrolü	Vero-6.Pasaj Üreme Kontrolü
1K-Kafkas Dalı	+	+	—	—	—	—
2K-Kafkas Dalı	+	+	—	—	—	—
3K-Kafkas Dalı	—	—	—	—	—	—
4D-Doğu Dalı	—	—	—	—	—	—
5D-Doğu Dalı	—	—	—	—	—	—
6D-Doğu Dalı	—	—	—	—	—	—
7B-Batı Dalı	—	—	—	—	—	—
8B-Batı Dalı	+	+	—	—	—	—
9B-Batı Dalı	—	—	—	—	—	—
K1-Kafkas Dalı	—	—	—	—	—	—
D1- Batı Dalı	—	—	—	—	—	—
D2- Batı Dalı	—	—	—	—	—	—
D3- Batı Dalı	—	—	—	—	—	—
D4- Batı Dalı	—	—	—	—	—	—
B1- Doğu Dalı	—	—	—	—	—	—
B2- Doğu Dalı	—	—	—	—	—	—
B3- Doğu Dalı	—	—	—	—	—	—
B4- Doğu Dalı	—	—	—	—	—	—

Çizelge 3.2. Monoklonal antikor boyama sonucu hücre kültüründe üreme gösteren referenz kuduz virusları.

Referenz Virus	Murine Neuroblastoma-1.Pasaj Üreme Kontrolü	Murine Neuroblastoma-3.Pasaj Üreme Kontrolü	BHK BSR Clone 13 - 1.Pasaj Üreme Kontrolü	BHK BSR Clone 13 - 3.Pasaj Üreme Kontrolü	Vero-1.Pasaj Üreme Kontrolü	Vero-3.Pasaj Üreme Kontrolü
CVS	+	+	+	+	+	—
PV	+	+	+	+	—	—

3.3. Virus Titrasyon Sonuçları

Hem saha (1K, 2K, 8B) hemde referenz (PV, CVS-11) virusların 96 gözlü pleytlerde floresan boyama sonucu parlama veren gözleri Sperman-Kärber metodu hesaplanarak DKID₅₀/ml olacak şekilde titreleri belirlendi (Çizelge 3.3 ve 3.4).

Çizelge 3.3. Saha virusları hücre kültürü pasajları sonunda yapılan titrasyon sonuçları (DKID₅₀/ml).

Pozitif Saha Virus	Murine Neuroblastoma-10.Pasaj Titrasyon	BHK BSR Clone 13 -10.Pasaj Titrasyon	Vero-10.Pasaj Titrasyon	Murine Neuroblastoma-15.Pasaj Titrasyon
1K-Kafkas Dalı	10 ^{2.5}	-	-	10 ⁷
2K-Kafkas Dalı	10 ^{1.5}	-	-	-
8B-Batı Dalı	10 ^{0.5}	-	-	-

Çizelge 3.4. Referenz Kuduz virusu ile hücre kültürü 3.pasaj sonunda yapılan titrasyon sonuçları (DKID₅₀/ml).

Hücre Hattı/İnokule Edilen Virus	1.Pasaj	2.Pasaj	3.Pasaj
BHK BSR Clone 13 / PV	10 ^{5.25}	10 ⁶	10 ^{6.25}
BHK BSR Clone 13 / CVS	10 ^{5.5}	10 ^{5.75}	10 ^{6.25}
VERO / PV	–	–	–
VERO / CVS	10 ^{2.75}	10 ^{1.75}	–
Murine Neuroblastoma / PV	10 ^{5.75}	10 ^{5.75}	10 ^{5.75}
Murine Neuroblastoma / CVS	10 ⁷	10 ^{7.25}	10 ⁸

3.4.Floresan Antikor Virus Nötralizasyon Testi Sonuçları

Titrasyon testi sonucunda en yüksek titreye sahip saha virusu ve referenz virusların (PV, CVS-11) 72 adet serum örneği ile ayrı ayrı değerlendirilmeye alındığı FAVN testleri sonunda; pleytler floresan mikroskopta 10x büyütme ile kontrol edildi, sonuçlar kayıt altına alınarak Spearman-Kaerber metodu ile hesaplamaları yapıldı. Bulunan değerler Referans Seruma göre IU/ml cinsinden hesaplandı (Çizelge 3.5). Aynı şekilde hücre kültürü adaptasyonları gerçekleştirilen Kuduz referenz PV ve CVS virusları aynı serum örnekleriyle ayrı ayrı FAVN testine alındı. Referenz viruslar ve saha suşu ile elde edilen seroloji sonuçlarının SN₅₀ değerleri ile karşılaştırılarak Çizelge 3.5’te gösterildi.

Çizelge 3.5. Kuduz antikör varlığı bilinen serum örneklerinin CVS, PV ve Saha suşu ile ayrı ayrı gerçekleştirilen FAVN testi sonucu.

	Örnek Kodu	Hayvan Türü	Uygulanan Aşı Adı	CVS Suşu ile FAVN Testi Sonucu	PV Suşu ile FAVN Testi Sonucu	Saha Suşu ile FAVN Testi Sonucu
1	413	Köpek	A aşısı	23,4 IU	23,4 IU	5,9 IU
2	452	Köpek	B aşısı	23,4 IU	17,8 IU	7,8 IU
3	453	Köpek	B aşısı	23,4 IU	17,8 IU	4,5 IU
4	454	Köpek	B aşısı	13,5 IU	7,8 IU	2,6 IU
5	465	Köpek	C aşısı	7,8 IU	2,6 IU	5,9 IU
6	470	Kedi	C aşısı	10,3 IU	4,5 IU	3,4 IU
7	472	Köpek	E aşısı	40,5 IU	17,8 IU	4,5 IU
8	483	Köpek	C aşısı	$\geq 70,1$ IU	40,5 IU	30,8 IU
9	484	Köpek	D aşısı	17,8 IU	10,3 IU	4,5 IU
10	489	Kedi	E aşısı	30,8 IU	23,4 IU	5,9 IU
11	490	Kedi	A aşısı	$\geq 70,1$ IU	70,1 IU	5,9 IU
12	537	Köpek	E aşısı	$\geq 70,1$ IU	23,4 IU	17,8 IU
13	551	Kedi	E aşısı	30,8 IU	10,3 IU	7,8 IU
14	584	Kedi	C aşısı	4,5 IU	3,4 IU	1,1 IU
15	593	Kedi	C aşısı	$\geq 70,1$ IU	13,5 IU	17,8 IU
16	594	Köpek	C aşısı	23,4 IU	2,6 IU	4,5 IU
17	595	Köpek	C aşısı	13,5 IU	1,5 IU	5,9 IU
18	596	Köpek	C aşısı	30,8 IU	23,4 IU	23,4 IU
19	48338	Köpek	D aşısı	$\geq 40,5$ IU	23,4 IU	7,8 IU
20	48869	Köpek	E aşısı	7,8 IU	2,0 IU	2,0 IU
21	49925	Köpek	E aşısı	$\geq 53,3$ IU	23,4 IU	40,5 IU
22	703	Köpek	E aşısı	$\geq 53,3$ IU	23,4 IU	30,8 IU
23	706	Kedi	D aşısı	$\geq 53,3$ IU	$\geq 70,1$ IU	$\geq 40,5$ IU
24	708	Kedi	E aşısı	$\geq 53,3$ IU	40,5 IU	17,8 IU
25	717	Köpek	E aşısı	5,9 IU	0,7 IU	1,1 IU
26	746	Köpek	E aşısı	7,8 IU	5,9 IU	5,9 IU
27	757	Kedi	D aşısı	10,3 IU	4,5 IU	2,6 IU
28	768	Köpek	E aşısı	17,8 IU	7,8 IU	4,5 IU
29	769	Kedi	E aşısı	10,3 IU	7,8 IU	4,5 IU
30	851	Kedi	A aşısı	$\geq 53,3$ IU	$\geq 53,3$ IU	$\geq 40,5$ IU
31	853	Köpek	E aşısı	$\geq 53,3$ IU	17,8 IU	7,8 IU
32	877	Köpek	A aşısı	0,5 IU	0,5 IU	2,6 IU

33	894	Köpek	E aşısı	≥40,5 IU	23,4 IU	10,3 IU
34	66231	Kedi	E aşısı	≥70,1 IU	≥70,1 IU	≥40,5 IU
35	66337	Kedi	E aşısı	≥70,1 IU	30,8 IU	23,4 IU
36	66349	Köpek	D aşısı	≥53,3 IU	17,8 IU	23,4 IU
37	66431	Köpek	A aşısı	17,8 IU	10,3 IU	3,4 IU
38	66455	Köpek	E aşısı	1,5 IU	0,5 IU	0,7 IU
39	554	Kedi	E aşısı	30,8 IU	23,4 IU	4,5 IU
40	603	Köpek	D aşısı	10,3 IU	4,5 IU	2,6 IU
41	604	Köpek	D aşısı	1,1 IU	0,3 IU	0,3 IU
42	605	Köpek	A aşısı	3,4 IU	2,6 IU	5,9 IU
43	606	Köpek	E aşısı	≥70,1 IU	23,4 IU	23,4 IU
44	611	Kedi	E aşısı	≥70,1 IU	≥70,1 IU	≥40,5 IU
45	65847	Kedi	D aşısı	17,8 IU	23,4 IU	5,9 IU
46	65873	Köpek	E aşısı	13,5 IU	5,9 IU	4,5 IU
47	65879	Kedi	D aşısı	≥53,3 IU	7,8 IU	4,5 IU
48	65887	Köpek	D aşısı	10,3 IU	3,4 IU	2,0 IU
49	65910	Kedi	A aşısı	≥53,3 IU	40,5 IU	13,5 IU
50	65911	Kedi	A aşısı	≥40,5 IU	13,5 IU	23,4 IU
51	65955	Kedi	E aşısı	≥40,5 IU	23,4 IU	17,8 IU
52	65966	Köpek	D aşısı	5,9 IU	3,4 IU	4,5 IU
53	65994	Köpek	A aşısı	5,9 IU	2,6 IU	4,5 IU
54	65995	Köpek	A aşısı	13,5 IU	0,1 IU	5,9 IU
55	65996	Köpek	A aşısı	30,8 IU	5,9 IU	2,6 IU
56	66013	Kedi	E aşısı	17,8 IU	4,5 IU	2,6 IU
57	66014	Kedi	E aşısı	10,3 IU	7,8 IU	3,4 IU
58	66025	Köpek	E aşısı	1,5 IU	13,5 IU	2,0 IU
59	66026	Köpek	E aşısı	23,4 IU	0,9 IU	1,5 IU
60	66028	Köpek	C aşısı	17,8 IU	7,8 IU	3,4 IU
61	66046	Köpek	D aşısı	30,8 IU	7,8 IU	23,4 IU
62	66095	Kedi	E aşısı	1,5 IU	≥40,5 IU	1,1 IU
63	66133	Köpek	B aşısı	7,8 IU	1,14 IU	1,5 IU
64	66139	Köpek	A aşısı	10,3 IU	2,6 IU	2,6 IU
65	66178	Köpek	E aşısı	≥53,3 IU	2,6 IU	≥40,5 IU
66	66190	Kedi	E aşısı	≥53,3 IU	≥70,1 IU	≥40,5 IU
67	66228	Kedi	E aşısı	≥70,1 IU	≥70,1 IU	7,8 IU
68	66229	Kedi	E aşısı	17,8 IU	≥53,3 IU	≥53,3 IU
69	66913	Kedi	A aşısı	3,4 IU	7,8 IU	1,1 IU
70	66923	Köpek	E aşısı	17,8 IU	1,5 IU	4,5 IU
71	66926	Kedi	A aşısı	13,5 IU	23,4 IU	4,5 IU
72	67149	Kedi	D aşısı	≥40,5 IU	7,8 IU	10,3 IU

Çizelge 3.6. Farklı Kuduz aşıları ile aşılanmış serum örneklerinin Referenz viruslar ve Saha izolatu ile FAVN testi değerlendirmelerinde antikor titre dağılımları.

Aşı ismi	Adet	CVS suşu																			
		≥70,1	≥53,3	≥40,5	31	23	18	14	10	7,8	5,9	4,5	3,4	2,6	2	1,5	1,1	0,9	0,7	0,5	Titresiz
A aşısı	14	1	2	1	1	1	1	2	1		1		2							1	
B aşısı	4					2		1		1											
C aşısı	9	2			1	1	1	1	1	1		1									
D aşısı	13		3	2	1		2		3		1						1				
E aşısı	32	6	6	3	3	1	4	1	2	2	1					3					
Aşı ismi	Adet	PV suşu																			
		≥70,1	≥53,3	≥40,5	31	23	18	14	10	7,8	5,9	4,5	3,4	2,6	2	1,5	1,1	0,9	0,7	0,5	Titresiz
A aşısı	14	1	1	1		2		1	1	1	1			3						1	1
B aşısı	4						2			1							1				
C aşısı	9			1		1		1		1		1	1	2		1					
D aşısı	13	1				2	1		1	3		2	2								1
E aşısı	32	4	1	2	1	8	2	1	1	3	2	1		1	1	1		1	1	1	
Aşı ismi	Adet	Saha İzolatı (1K)																			
		≥70,1	≥53,3	≥40,5	31	23	18	14	10	7,8	5,9	4,5	3,4	2,6	2	1,5	1,1	0,9	0,7	0,5	Titresiz
A aşısı	14			1		1		1			4	2	1	3			1				
B aşısı	4									1		1		1		1					
C aşısı	9				1	1	1				2	1	2				1				
D aşısı	13			1		2			1	1	1	3		2	1						1
E aşısı	32		1	5	1	2	3		1	3	2	6	1	1	2	1	2		1		

3.5. Virolojik Kontrol Sonuçları

3.5.1. Viral Nükleik Asit İzolasyon Sonuçları

Sahadan elde edilen 18 adet kuduz pozitif beyin örneği ve hücre kültürü inokulasyonu sonrası üremede pozitiflik alınan izolatların RNA ekstraksiyonu ile elde edilen nükleik asit miktarları NanoDrop™ spektrofotometre (ND-1000, ThermoScientific, USA) ile ölçüldü. Elde edilen ürünlerdeki nükleik asit miktarları Çizelge 3.7’ da gösterildi.

Çizelge 3.7. Saha virusları viral nükleik asit miktarı (ng/uL)

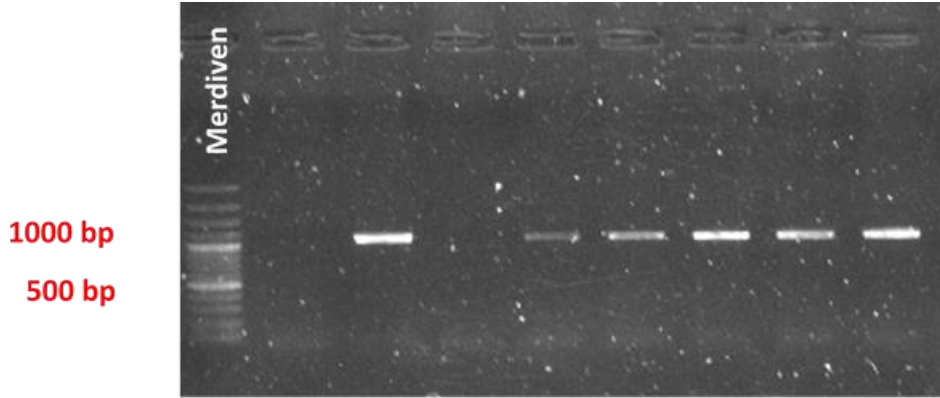
(* : hücre kültürü inokulasyonu sonrası elde edilen izolatlar).

	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı		Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı
1	1K-Kafkas	11,5	14	D4- Batı	44,7
2	2K-Kafkas	83,2	15	B1- Doğu	39,0
3	3K-Kafkas	7,4	16	B2- Doğu	149,1
4	4D-Doğu	29,3	17	B3- Doğu	62,4
5	5D-Doğu	32,6	18	B4- Doğu	42,6
6	6D-Doğu	45,2	19	*1K-Kafkas	26,2
7	7B-Batı	67,3	20	*2K-Kafkas	9,6
8	8B-Batı	28,3	21	*8B-Batı	26,4
9	9B-Batı	51,5	22	*PV-BHK	18,6
10	K1-Kafkas	70,8	23	*PV-Na	15,1
11	D1- Batı	81,3	24	*CVS-BHK	12,9
12	D2- Batı	19,6	25	*CVS-Na	21
13	D3- Batı	18,5			

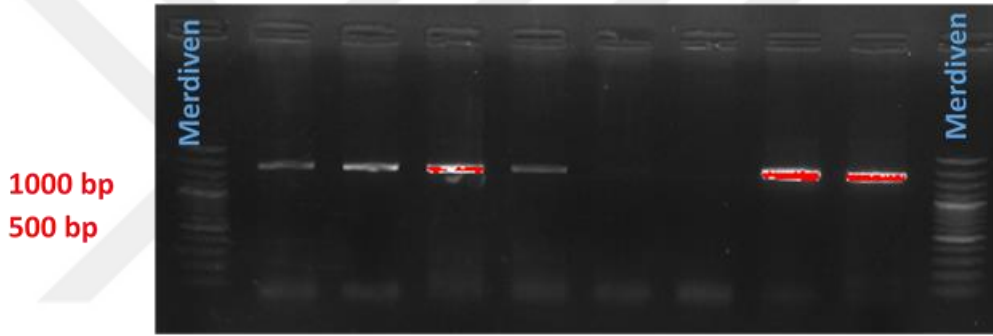
3.5.2. RT-PCR Sonuçları

RABV yönünden pozitif tespit edilen sahadaki hayvanlara ait beyin örnekleri full N ve G bölgelerine yönelik primerlerle, hücre kültürü adaptasyonu başarılı olan izolatlar (*1K-Kafkas, *2K- Kafkas, *8B-Batı) ise kısmi N gen bölgesine yönelik Rabies virus spesifik primer ile analize alınarak konvansiyonel PCR ampliconları elde edildi.

Aynı şekilde, hücre kültürü adaptasyonları gerçekleştirilen kuduz referenz suşların (PV ve CVS) seri pasajlar sonucu genetik yapısında herhangi bir değişim olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kısmi N gen bölgesi bakımından konvansiyonel PCR yapıldı ve ampliconlar agaroz jelde görüntülendi.



Şekil 3.2. Saha viruslarına ait N gen amplikonlarına ait jel görüntüsü.



Şekil 3.3. Saha viruslarına ait G gen amplikonlarına ait jel görüntüsü.

3.5.3.Dizin Analizi ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Konvansiyonel RT-PCR’da RABV yönünden pozitif olarak belirlenen örneklerden (Şekil 3.2 ve 3.3) en iyi ürün veren 18 örnek dizin analizine alındı. Toplamda N gen bölgesine ait 15 örnek ve G gen bölgesine ait 16 örneğe ait RABV dizinlerinin GenBankasına kayıtları yapılarak erişim numaraları alındı. N gen bölgesi için 3 adet (3K, 6D ve 9B), G gen bölgesi için 2 adet (3K ve 9B) örneğin moleküler karakterizasyonları yapılamamıştır. GenBankasına girilen örneklere ait bilgiler Çizelge 3.8’ de verildi.

Elde edilen dizinler GenBank’tan alınan diğer Rabiesvirus dizinleri ile karşılaştırıldı ve ülkemizde seyir gösteren RABV örneklerinin tamamının filogenetik olarak “*Cosmopolitan*” lineajında yer aldığı tespit edildi (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

Çizelge 3.8. RABV yönünden dizin analizi yapılan örneklere ait bilgiler.

No	Örnek ismi	Dizin/Kod	Şehir	Yıl	N gene Accession No	G gene Accession No	Tür
1	K1	TR-Rabies-N-Dog-2020-K1	Ardahan	2020	MZ391102	MZ391117	Köpek
2	D1	TR-Rabies-N-Cattle-2020-D1	Balıkesir	2020	MZ391106	MZ391121	Sığır
3	D2	TR-Rabies-N-Cattle-2020-D2	Çanakkale	2020	MZ391103	MZ391118	Sığır
4	D3	TR-Rabies-N-Cattle-2020-D3	Çanakkale	2020	MZ391104	MZ391119	Sığır
5	D4	TR-Rabies-N-Cattle-2020-D4	Balıkesir	2020	MZ391105	MZ391120	Sığır
6	B1	TR-Rabies-N-Donkey-2020-B1	Mardin	2020	MZ391112	MZ391127	Eşek
7	B2	TR-Rabies-N-Cattle-2020-B2	Hakkari	2020	MZ391107	MZ391122	Sığır
8	B3	TR-Rabies-N-Cattle-2020-B3	Elazığ	2020	MZ391108	MZ391123	Sığır
9	B4	TR-Rabies-N-Cattle-2020-B4	Diyarbakır	2020	MZ391109	MZ391124	Sığır

10	1K	TR-Rabies-N-2014-Cattle-1K	Hatay	2014	MZ391110	MZ391125	Sığır
11	2K	TR-Rabies-N-Dog-2014-2K	Şanlıurfa	2014	MZ391113	MZ391128	Köpek
12	4D	TR-Rabies-N-Dog-2014-4D	Sivas	2014	MZ391114	MZ391129	Köpek
13	5D	TR-Rabies-N-Fox-2013-5D	Kahramanmaraş	2013	MZ391115	MZ391130	Tilki
14	6D	TR-Rabies-Fox-2013-6D	Kahramanmaraş	2013	_	MZ391132	Tilki
15	7B	TR-Rabies-N-Fox-2013-7B	Balıkesir	2013	MZ391116	MZ391131	Tilki
16	8B	TR-Rabies-G-Marten-2013-8B	Çanakkale	2013	MZ391111	MZ391126	Sansar

Bu çalışmada elde edilen RABV örnekleri N gen bölgesi bakımından GenBanktan elde edilen verilerle karşılaştırıldığında ülkemizde *Cosmopolitan* lineajının yaygın olarak *Cosmopolitan* ME1a, *Cosmopolitan* CA2 ve *Cosmopolitan* ME2 olmak üzere 3 alt linaja ayrıldığı görüldü. Yalnızca bir örneğin (K1- MZ391102) *Cosmopolitan* CA1 alt lineajında yer aldığı tespit edildi (Şekil 3.6). Bu çalışmadaki örnekler ile daha önce Türkiye’de tespit edilen (Marston ve ark., 2017b) *Cosmopolitan* ME1a grubunda yer alan RABV örneklerinin % 73 oranında benzer oldukları bulundu. *Cosmopolitan* CA1 alt lineajındaki Ardahan ilinden izole edilen örnek (K1- MZ391102) İran’da tespit edilen “*Canis Lupus Familiaris*” örneği ile %99 oranında benzer bulundu. Yine bu çalışmadaki *Cosmopolitan* ME2 alt lineajında yer alan

örnekler ile daha önceden ülkemizde dizin analizi yapılan örnekler (David ve ark., 2007 ve Troupin ve ark., 2016) yüksek düzeyde benzer oldukları tespit edildi. Tez çalışmasında 6D (TR-Rabies-Fox-2013-6D) örneğine ait N gene dizin verileri elde edilemedi.

Bu çalışmada elde edilen RABV örnekleri G gen bölgesi bakımından GenBankta yer alan diğer RABV verileri ile yakınlıklarını göstermek amacıyla çizilen filogenetik ağaç Şekil 3.7’de gösterildi. Bu gen bölgesine ait ülkemizde sirküle olan RABV dizinlerinin Cosmopolitan ME1a, Cosmopolitan ME2 ve Cosmopolitan CA2 olmak üzere 3 alt lineaja ayrıldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı bünyesinde bulunan kuduz referans suşlarda (CVS ve PV) G gen bölgesi bakımından dizin analizine alınarak filogenetik ağaçta GenBanksında yer alan diğer RABV örnekleri ile yakınlıkları gösterildi (Şekil 3.7).

Sekans analizleri sonrası N ve G gen yönünden RABV örneklerinin amino asit (aa) benzerlik oranını gösteren tablo Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’ te sunulmuştur. Tez çalışması ile elde edilen RABV saha örneklerinde N gen dizileri birbirleriyle %71.5-99.4 aa homoloji sergiledi. Saha suşları ile GenBank izolatları karşılaştırıldığında %59.9-99.0 aa homolojisine sahip olduğu bulundu. Farklı küresel aşı suşları ile tez çalışmasındaki örnekler arasında N geninin filogenetik bir karşılaştırması % 58.1-93.8 aa benzerlik ortaya koydu. G gen dizileri bakımından bakılan tez çalışmasındaki örnekler birbirleriyle %71.7-98.8 aa homoloji sergiledi. Ayrıca GenBanktan elde edilen KX148166 ile bu çalışmada elde edilen saha dizileri %88,5-98,3 aa homolojisine sahip oldukları tespit edildi. Benzer şekilde G gen dizileri saha örnekleri ile kuduz referans virus CVS (% 80,0- 94.4) ve PV (% 72.2- 97.2) bakımından kıyaslandığında yüksek homoloji sergiledi.

Tez çalışmasındaki örnekler ile GenBanktan elde edilen RABV örneklerinde varyasyonlar yönünden N ve G gen bölgesindeki antijenik bölgeler amino asit

düzeyinde karşılaştırılarak benzerlik/farklılıkları Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’da gösterildi. G gen bölgesi bakımından iki saha izolatu (1K ve 2K) ve bir saha örneğinin (B2), eski Cosmopolitan lineajı (KX148133) ile karşılaştırılmasında, antijenik bölge IIa ve III’de herhangi mutasyona rastlanmamıştır. D3 örneğinde 338.aa pozisyonunda *Isoleucine* (Ile) I → *Asparagine* (Asn) N mutasyonu tespit edilmiş olup, aynı antijenik bölge içinde 331T (*Threonine*, Thr) mutasyonu görülmüştür. Antijenik bölge IIb içerisinde 7G örneğinde 41S (*Serine*, Ser), 2K örneğinde 41V (*Valine*, Val) ve 42C (*Cysteine*, Cys) mutasyonu tespit edilmiştir. Antijenik bölge IIa içerisinde B1 örneğinde 199K (*Lysine*, Lys), B2 örneğinde 200T (*Threonine*, Thr) mutasyonu belirlenmiştir. N proteininin fosforilasyon bölgesi olan 389. aa bölgesinde hiçbir örnekte mutasyon görülmezken, antijenik bölge I ve III alanlarında K1, B1, B2, 1K, 2K, 4D, 5D ve 7B örneklerinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Antijenik bölge I’de aa yapıda CVS suşunda 377S mutasyonunun varlığı dikkat çekerken aynı antijenik alan içinde D3 örneğinde 374T (*Threonine*, Thr) mutasyonu tespit edilmiştir. Antijenik alan III’de yer alan amino asit değişimleri D2, D4, B3, B4 ve D1 örneklerinde Şekil 3.8’de gösterilmiştir.

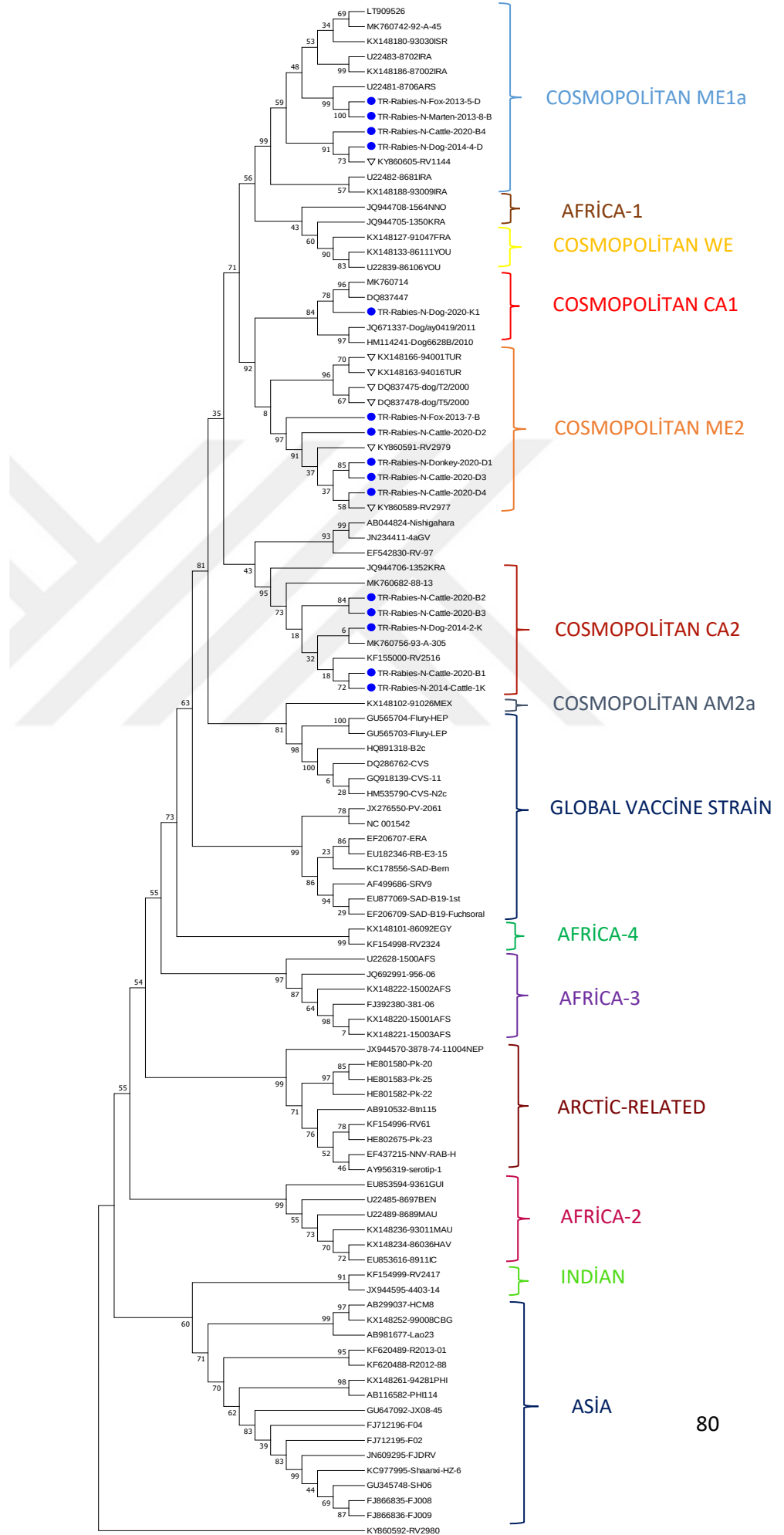
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. Rabies-N-Dog-2020-K1		98.2	98.7	98.2	97.8	88.4	98.2	98.2	97.8	98.7	82.7	91.8	58.3	97.1	99.1	98.4	97.8	97.8
2. Rabies-N-Donkey-2020-D1	98.4		98.7	99.1	97.8	88.0	97.8	97.8	97.1	98.2	81.8	90.9	57.6	96.7	98.7	98.0	97.6	97.3
3. Rabies-N-Cattle-2020-D2	98.9	98.7		99.1	99.1	88.9	98.7	98.7	97.6	99.1	82.7	91.8	58.3	97.6	99.6	98.9	98.4	98.2
4. Rabies-N-Cattle-2020-D3	98.7	99.3	99.3		98.2	88.4	98.2	98.2	97.1	98.7	82.2	91.3	57.9	97.1	99.1	98.4	98.0	97.8
5. Rabies-N-Cattle-2020-D4	98.2	98.0	99.3	98.7		88.0	98.0	97.8	96.7	98.2	81.8	91.6	57.6	96.9	98.7	98.0	97.6	97.3
6. Rabies-N-Fox-2013-7-8	91.1	90.7	91.6	91.3	90.9		88.4	88.4	87.3	88.9	81.4	88.3	54.4	87.8	88.9	88.2	88.0	87.8
7. Rabies-N-Cattle-2020-B1	99.1	98.4	99.3	99.1	98.7	91.3		99.1	98.0	98.7	82.9	92.2	58.1	98.0	99.1	98.4	98.2	98.2
8. Rabies-N-Cattle-2020-B2	99.1	98.4	99.3	99.1	98.7	91.3	99.6		98.0	98.7	82.7	91.8	58.1	98.0	99.1	98.4	98.2	98.2
9. Rabies-N-Cattle-2020-B3	98.7	97.8	98.2	98.0	97.6	90.2	98.4	98.4		97.6	81.6	90.7	57.3	96.9	98.0	97.3	97.1	97.1
10. Rabies-N-Cattle-2020-B4	99.1	98.4	99.3	99.1	98.7	91.3	99.6	99.6	98.4		82.7	92.2	58.4	97.6	99.6	98.9	98.2	98.2
11. Rabies-N-Dog-2014-2-K	83.3	82.4	83.3	83.1	82.7	84.2	83.6	83.6	82.4	83.6		87.3	53.4	82.0	83.1	82.4	82.0	82.2
12. Rabies-N-Dog-2014-4-D	93.3	92.4	93.3	93.1	92.7	92.8	93.6	93.6	92.4	93.6	88.9		57.0	91.1	92.2	91.6	91.1	91.6
13. Rabies-N-Fox-2013-5-D	61.8	61.2	61.8	61.7	61.4	58.3	62.0	62.0	61.2	62.1	56.2	60.9		57.9	58.7	58.4	57.9	58.1
14. Rabies-N-2014-Cattle-1-K	98.0	97.3	98.2	98.0	97.8	90.4	98.4	98.4	97.3	98.4	82.7	92.4	62.0		98.0	97.3	97.1	97.1
15. KX148166-9400 ITUR	99.3	98.7	99.6	99.3	98.9	91.6	99.8	99.8	98.7	99.8	83.8	93.8	62.5	98.7		99.3	98.7	98.7
16. GQ918139-CVS-11	99.3	98.7	99.6	99.3	98.9	91.6	99.8	99.8	98.7	99.8	83.8	93.8	62.5	98.7	100.0		98.2	98.2
17. EF206709-SAD-B19-FU...	98.9	98.2	99.1	98.9	98.4	91.1	99.3	99.3	98.2	99.3	83.3	93.3	62.1	98.2	99.6	99.6		99.1
18. JX276550-PV-2061	98.7	98.0	98.9	98.7	98.2	90.9	99.1	99.1	98.0	99.1	83.1	93.1	62.0	98.0	99.3	99.3	99.8	

Şekil 3.4. RABV örneklerinin N gen yönünden amino asit benzerlik ve farklılık tablosu.

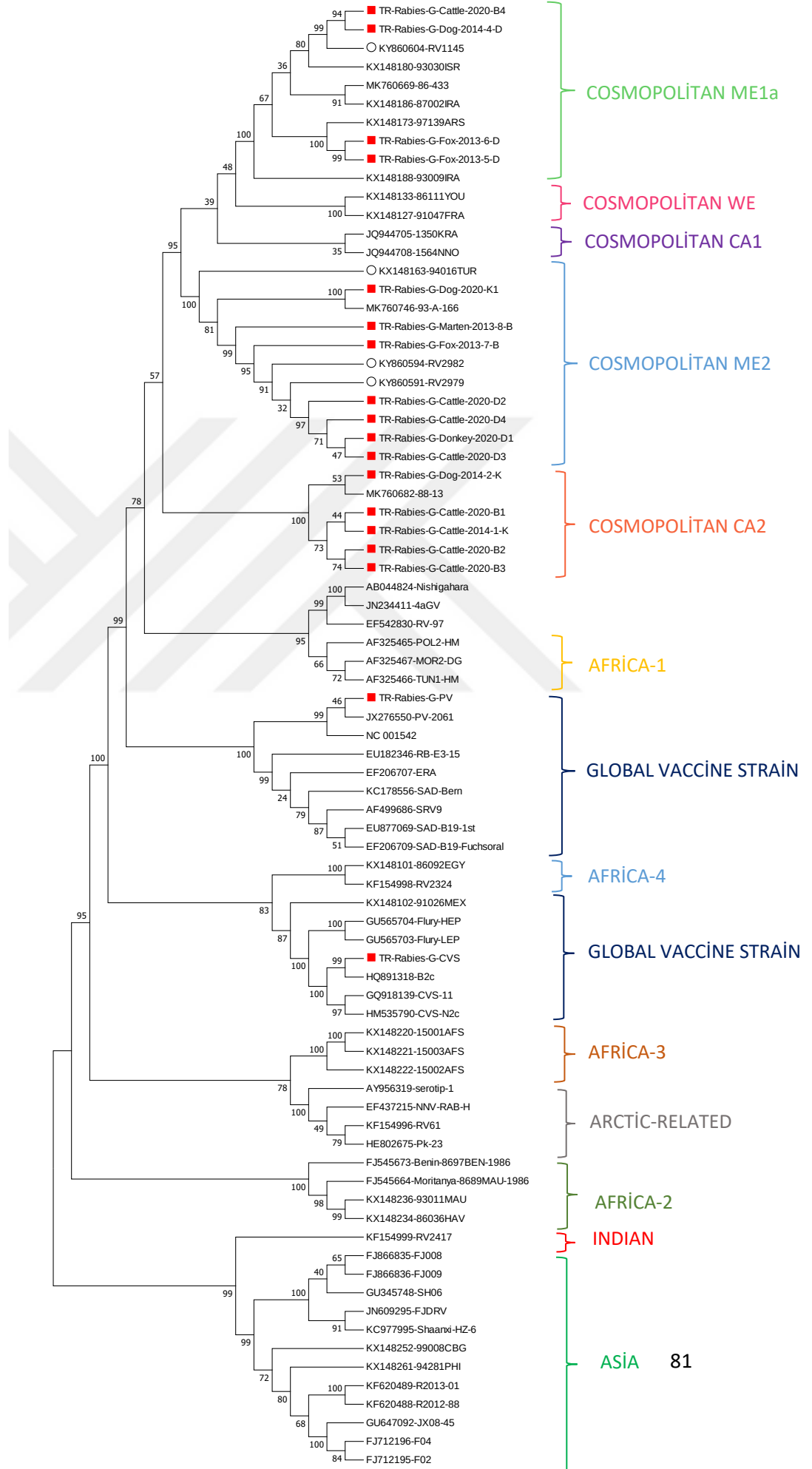
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. Rabies-G-Dog-2020-K1		96.9	97.2	97.1	97.0	90.3	93.5	93.7	93.3	94.1	90.5	88.3	72.7	60.2	93.4	97.6	91.7	92.3	92.2
2. Rabies-G-Donkey-2020-D1	96.9		99.1	99.4	98.9	91.8	93.9	93.9	93.6	94.7	90.8	88.5	72.4	59.9	93.6	98.0	91.9	92.0	92.0
3. Rabies-G-Cattle-2020-D2	97.2	99.1		99.5	99.5	92.2	94.3	94.5	94.2	95.0	91.2	88.8	72.9	60.1	94.1	98.4	92.4	92.5	92.5
4. Rabies-G-Cattle-2020-D3	97.1	99.4	99.5		99.3	92.2	94.2	94.3	93.9	94.9	91.1	88.7	72.7	59.9	94.0	98.4	92.3	92.4	92.4
5. Rabies-G-Cattle-2020-D4	97.0	98.9	99.5	99.3		92.0	94.2	94.2	93.8	94.8	91.0	88.8	72.6	60.2	93.9	98.2	92.2	92.2	92.2
6. Rabies-G-Fox-2013-7-B	90.3	91.8	92.2	92.2	92.0		87.5	87.5	87.1	88.1	88.0	88.0	72.5	59.5	87.4	91.1	85.6	85.6	85.6
7. Rabies-G-Cattle-2020-B1	93.5	93.9	94.3	94.2	94.2	87.5		99.1	98.7	94.5	95.6	88.8	72.6	59.7	98.2	94.9	93.0	93.9	93.9
8. Rabies-G-Cattle-2020-B2	93.7	93.9	94.5	94.3	94.2	87.5	99.1		99.2	94.7	95.4	88.7	72.6	59.7	98.1	94.8	92.9	94.2	94.2
9. Rabies-G-Cattle-2020-B3	93.3	93.6	94.2	93.9	93.8	87.1	98.7	99.2		94.2	95.0	88.3	72.2	59.5	97.7	94.5	92.6	93.6	93.6
10. Rabies-G-Cattle-2020-B4	94.1	94.7	95.0	94.9	94.8	88.1	94.5	94.7	94.2		91.5	93.0	75.0	61.9	95.0	95.1	91.9	92.9	92.9
11. Rabies-G-Dog-2014-2-K	90.5	90.8	91.2	91.1	91.0	86.6	95.6	95.4	95.0	91.5		86.3	70.3	57.3	94.9	91.6	89.8	90.8	90.9
12. Rabies-G-Dog-2014-4-D	88.3	88.5	88.8	88.7	88.8	85.0	88.8	88.7	88.3	93.0	86.3		80.6	67.4	89.2	89.2	85.9	86.8	86.9
13. Rabies-G-Fox-2013-5-D	72.7	72.4	72.9	72.7	72.6	69.5	72.6	72.6	72.2	75.0	70.3	74.7		85.3	73.2	73.2	71.5	71.2	71.1
14. Rabies-G-Marten-2013-8-B	60.2	59.9	60.1	59.9	60.2	56.5	59.7	59.7	59.5	61.9	57.3	61.6	63.6		60.1	60.3	58.8	58.5	58.3
15. Rabies-G-2014-Cattle-1K	93.4	93.6	94.1	94.0	93.9	87.4	98.2	98.1	97.7	95.0	94.9	89.2	73.2	60.1		94.5	92.2	93.4	93.4
16. KX148166-94001TUR	97.6	98.0	98.4	98.4	98.2	91.1	94.9	94.8	94.5	95.1	91.6	89.2	73.2	60.3	94.5		92.7	93.1	92.9
17. DQ286762-CVS	91.7	91.9	92.4	92.3	92.2	85.6	93.0	92.9	92.6	91.9	89.8	85.9	71.5	58.8	92.2	92.7		92.9	92.9
18. EF206709-SAD-B19-Fuchsoral	92.3	92.0	92.5	92.4	92.2	85.6	93.9	94.2	93.6	92.9	90.8	86.8	71.2	58.5	93.4	93.1	92.9		99.0
19. JX276550-PV-2061	92.2	92.0	92.5	92.4	92.2	85.6	93.9	94.2	93.6	92.9	90.9	86.9	71.1	58.3	93.4	92.9	92.9	99.0	

Şekil 3.5. RABV örneklerinin tam G gen yönünden amino asit benzerlik ve farklılık tablosu.

Şekil 3.6. N gen yönünden RABV filogenetik analizi. Filogenetik analiz yapılırken Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarları tercih edildi. “●” şekli ile gösterilen virüsler bu çalışmada elde edilen alttıplerdir. “▽” şekli ile gösterilen virüsler daha önceki çalışmalarda Türkiye’de tespit edilen RABV dizinleridir.



Şekil 3.7. G gen yönünden RABV filogenetik analizi. Filogenetik analiz yapılrken Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarı tercih edildi. “■” şekli ile gösterilen virüsler bu çalışmada elde edilen altiplerdir. “○” şekli ile gösterilen virüsler daha önceki çalışmalarda Türkiye’de tespit edilen RABV dizinleridir.



	Nucleoprotein																																							
	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	389				
GQ918139-OVS-11	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	S	D	V	A	L	A	D	S				
FJ866835-FJ08[asya-dog]	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	L	A	L	A	D	S				
KX148236-93011MAU[afrika-2-dog]	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
KX148220-15001AF[afrika-3-mongosa]	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	T	I	L	A	D	S				
KX148133-86111YO[cosmopolitan-fox]	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
EF43715-NNV-RAB-H[arctic_related-human]	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	G	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
KF154999-RV2417[indian-dog]	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	I	A	I	A	D	S				
MZ991102-K1-N-Dog-2020	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991103-D2-N-Cattle-2020	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	K	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991104-D3-N-Cattle-2020	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	T	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991105-D4-N-Cattle-2020	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	K	V	I	A	A	G	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991107-D2-N-Cattle-2020	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991109-84-N-Cattle-2020	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	T	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991111-8-B-N-Marten-2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
MZ991110-K1-N-2014-Cattle	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991112-D1-N-Donkey-2020	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991108-D3-N-Cattle-2020	H	F	V	G	C	Y	R	G	Q	A	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991114-D-N-Dog-2014	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991115-D-N-Fox-2013	H	F	V	G	C	Y	M	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
JX276550-PV-2061	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
EF206709-S40-819-Fuchsbarral	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991106-D1-N-Cattle-2020	H	F	G	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991116-7-B-N-Fox-2013	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
MZ991113-2-K-N-Dog-2014	H	F	V	G	C	Y	M	G	Q	V	R	S	L	N	A	T	V	I	A	A	C	A	P	H	E	L	T	K	T	D	V	A	L	A	D	S				
	Antigenic Site III (NIII)																																Antigenic Site I (NI)						Putative Phosphorylation	
Antigenic sites of Nucleoprotein affecting pathogenicity of rabies virus																																								

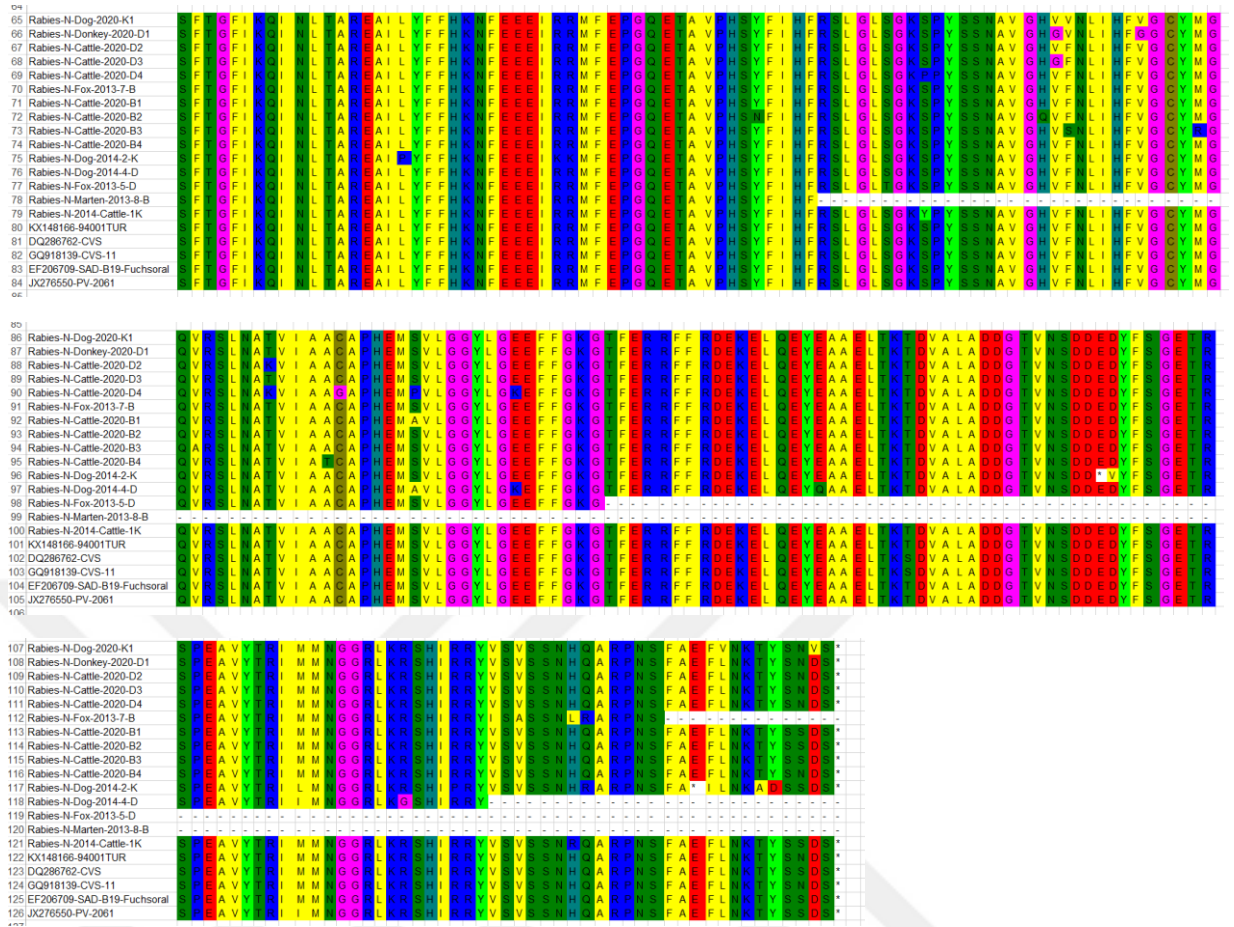
Şekil 3.8. RABV dizin analizi sonucu N gen antijenik bölge I ve III’ de meydana gelen amino asit değişimleri.

			ECTO domain of Glycoprotein																																																																					
			19	34	35	36	37	38	39	40	41	42	96	132	164	182	194	198	199	200	205	210	242	243	255	268	303	330	331	332	333	334	335	336	337	338	349																																			
KX148166-Rabies-94001TUR_			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
EF206709-SAD-B19-Fuchsoral			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	E	V	S	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
FJ866835-FJ008(gasia-dog)			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	G	A	K	V	A	I	D	I	H	K	S	I	R	T	W	N	E	I	G																																			
KX148236-93011MAU(africa-2-dog)			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	D	E	I	G																																			
EF437215-NNV-RAB-H(arctic_related-hi			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	I	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
KF154999-RV2417(indian-dog)			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	P	L	-	G	T	R	G	R	*	A	I	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																				
KX148133-86111YOU(cosmopolitan-fox			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391121-D1-G-Donkey-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391119-D3-G-Cattle-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	G	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	M	H	K	T	V	R	T	W	N	E	N	G																																			
MZ391120-D4-G-Cattle-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391124-B4-G-Cattle-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391125-1-K-G-Cattle-2014			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391128-2-K-G-Dog-2014			I	G	C	T	N	L	S	G	V	C	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391126-8-B-G-Marten-2013			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391132-6-D-G-Fox-2013			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391129-4-D-G-Dog-2014			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	R	E	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391117-K1-G-Dog-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	N	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391118-D2-G-Cattle-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
GQ918139-CVS-11			I	G	C	T	N	L	S	E	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391103-B3-G-Cattle-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	K	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391127-B1-G-Cattle-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	K	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
KX148220-15001AFS(africa-3-mongosa)			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	S	F	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
JX276550-PV-2061			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	A	E	V	S	M	G	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391122-B2-G-Cattle-2020			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	V	N	N	K	R	T	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
MZ391130-5-D-G-Fox-2013			I	G	C	T	N	L	S	G	F	S	A	L	M	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
TR-Rabies-2013-Fox-7-G			I	G	C	T	N	L	S	G	S	S	A	L	V	N	N	K	R	A	K	V	A	M	D	I	H	K	S	V	R	T	W	N	E	I	G																																			
			Antigenic site IIb															Antigenic site IIa															Antigenic site III																																							
Critical amino acid residues of ECTO domain of Glycoprotein affecting pathogenicity of rabies virus																																																																								

Bu çalışmada G gen bölgesi ektodomainde yer alan antijenik bölge II ve III de RABV patojenitesi üzerine etkili olan 242, 255, 268, 330 ve 333. amino asit pozisyonlarının bazılarında değişimler tespit edildi (Şekil 3.9). Benzer şekilde N gen bölgesi içinde kıyaslama yapılarak patojeniteden sorumlu NI ve NIII antijenik bölgelerdeki amino asit değişimlerinin tespiti yapıldı (Şekil 3.8).

Analizi yapılan Kuduz saha örneklerinin N ve G gen bölgelerine ait dizinler; amino asit farklılıkları ve benzerlikleri yönünden Referenz Kuduz virusu dizinleri ile karşılaştırıldı (Şekil 3.10 ve 3.11).



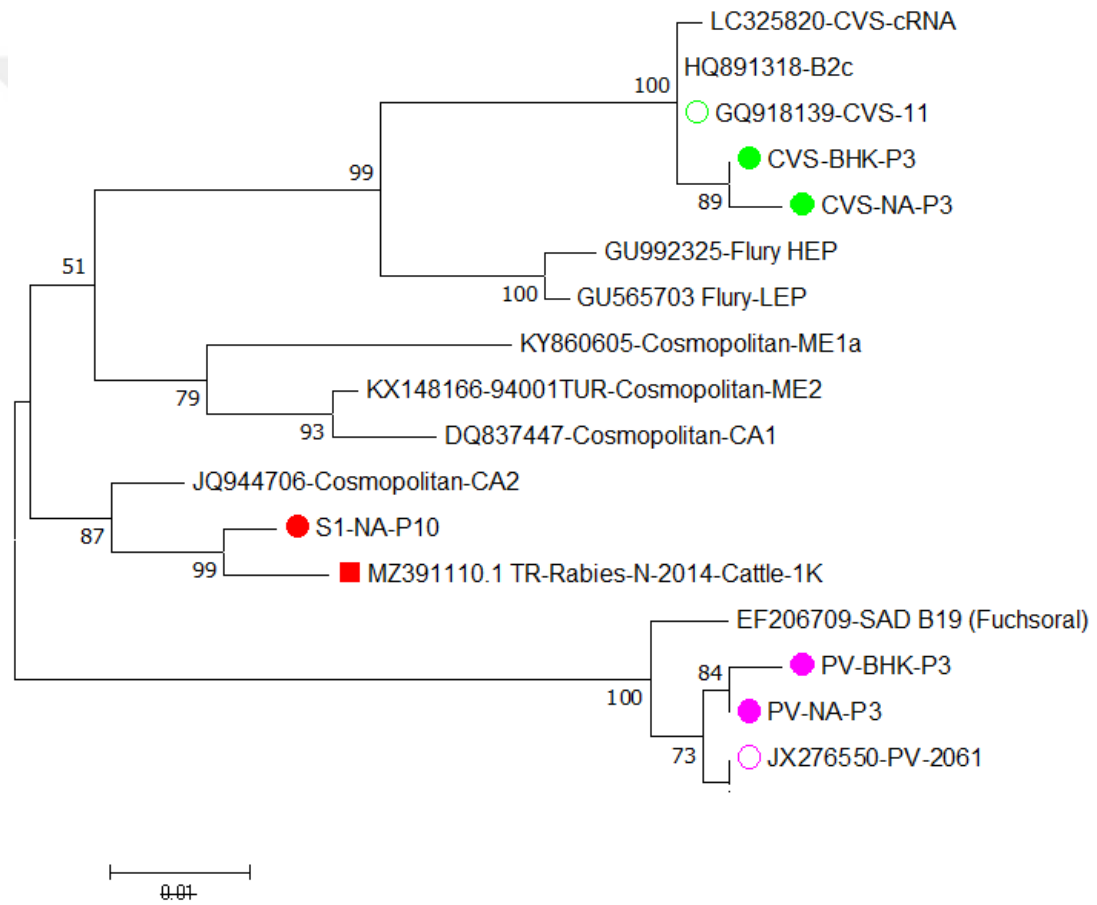


Şekil 3.10. Saha örnekleri ve Kuduz Refernz virüslara ait N gen bölgesi dizin analizlerinin a.a karşılaştırması.

86

116	TR-Rabies-G-Fox-2013-6-D	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
117	TR-Rabies-G-Donkey-2020-D1	R	R	H	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*
118	TR-Rabies-G-Cattle-2020-D3	R	R	T	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*
119	TR-Rabies-G-Cattle-2020-D4	R	R	T	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*
120	TR-Rabies-G-Cattle-2020-B1	R	K	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*
121	TR-Rabies-G-Dog-2020-K1	R	K	A	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*
122	TR-Rabies-G-Cattle-2020-B4	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
123	TR-Rabies-G-Cattle-2020-D2	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
124	TR-Rabies-G-PV	G	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*
125	TR-Rabies-G-Dog-2014-4-D	R	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*
126	TR-Rabies-G-Fox-2013-5-D	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
127	TR-Rabies-G-CVS	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
128	TR-Rabies-G-Cattle-2014-1-K	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
129	TR-Rabies-G-Dog-2014-2-K	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
130	TR-Rabies-G-Marten-2013-8-B	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
131	TR-Rabies-G-Cattle-2020-B2	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
132	TR-Rabies-G-Cattle-2020-B3	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
133	TR-Rabies-G-2013-Fox-7-B	R	V	R	P	E	F	T	Q	S	L	G	G	K	V	I	S	Q	G	V	I	S	W	E	S	Y	K	S	G	G	E	T	R	L	*	
134																																				

Şekil 3.11. Saha örnekleri ve Kuduz Referenz virüslerine ait G gen bölgesi dizin analizlerinin a.a karşılaştırması.



Şekil 3.12. Seri pasajları yapılan saha ve referans virüslerin N gen filogenetik analizi. Filogenetik analiz yapılırken Maximum Likelihood istatistik metodu, Kimura-2 modeli ve 1000 bootstrap tekrarı tercih edildi. “●” şekli hücre pasajları sonrası CVS-11 virus, “●” şekli hücre pasajları sonrası Pasteur virusa, “■” şekli 1K saha örneğine ve “●” şekli Na hücre pasajı sonrası 1K saha izolatına ait bu çalışmada kazanılan dizinlerdir.



Şekil 3.13. Hücre kültürü adaptasyonu sonrası Saha izolatu (1K) ve Kuduz Referenz virüslere ait kısmi N gen bölgesi dizin analizlerinin a.a karşılaştırması.

Hücre kültürü adaptasyonu ardından genetik yapıda herhangi bir değişimin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kuduz referans virüsler (CVS-11 ve PV) ve saha izolatları (1K, 2K ve 8B) kısmi N gen bakımından moleküler analize alınarak filogenetik anilizi yapıldı (Şekil 3.12). Hücre kültür pasajı sonrasında virüslarda ortaya çıkan mutasyonlar tabloda gösterildi (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Hücre kültürü adaptasyonu ile saha izolatları ve referenz suşların mutasyonları.

Virus	Gen bölgesi	Mutasyon Nükleotid	Amino asit Değişimi
1K	N	13G > A	E5K
		44A > T	D15V
		524A > C	K175T
		529A > C	T177P
		534T > A	F178L
		535G > C	—
CVS-BHK	N	534T > A	F178L
		535G > A	—
CVS-Na	N	533T > A	—
		534T > A	—
		535G > T	—
PV-BHK	N	283T > G	L95V
		533T > A	F178Y
		535G > C	—
PV-Na	N	283T > G	L95V

4.TARTIŞMA

Hem devlet desteği hem de Avrupa Birliği projesi ile finanse edilen evcil ve yaban hayattaki karnivorların aşılınması vasıtasıyla Ülkemizde etkin bir mücadele programı yürütülen Kuduz enfeksiyonu, gerek hayvan ve gerekse insan sağlığı açısından önemli viral zoonozlardan olup, bu vesile ile tek sağlık konseptinde değerlendirilen bir hastalıktır. Enfeksiyonla mücadelede kullanılan söz konusu aşılardan yurt dışından ithalat yoluyla edinilmesi, yerel saha izolatu kazanımını zorunlu bir ihtiyaç haline getirmiş olup, bu doktora tezinin ana konusunu oluşturmaktadır. Bu bağlamda, öncelikli olarak farklı coğrafik bölgelere ve farklı hayvan türlerine ait Kuduz pozitif saha örneklerinden Türkiye orijinli yerel saha izolatlarının kazanımı sayesinde, Ülkemizin dışa bağımlılığını azaltacak aşı suşu adaylarının eldesi hedeflenmiştir. Ayrıca, Kuduz virusu N ve G gen bölgesine yönelik primerler kullanılarak iki gen bölgesine ait tam genomik moleküler karakterizasyonu yapılan saha izolatlarının arasından öne çıkan yerel suş kullanılarak yapılan nötralizasyon testleri ile de bu saha izolatının ticari Kuduz aşısı ile aşılanan hayvanların kan serumlarında nötralizan antikor tanıma kapasitesi sorgulanmıştır. Sonuç olarak; tıpkı referans viruslar gibi yerel saha izolatının da nötralizan antikorları tanıyabildiği tespit edilmiştir.

Lyssavirus tanısı için OIE tarafından Gold Standart test olarak tanımlanan Floresan Antikor Testi (FAT) (Dean ve ark., 1973 ve Marston ve ark., 2012b) ile 2013-2020 yılları arasında Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarına gönderilen post-mortem beyin dokularından hazırlanan smear preparatlarda (n:18) viral antijenlerin tespitini takiben, doktora tezi materyalleri kazanıldı (Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün 76899830-604.01.01[020]-E.3741514 sayılı izni). Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden 2013-2020 yılları arasında Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'ne gönderilen 18 adet (Sığır n:8, Köpek n:3, Tilki n:4, Porsuk n:1, Eşek n:2) kuduz pozitif saha beyin

örnekleri ve 2 adet (CVS-11, PV) Kuduz referenz suşları doktora tez çalışması kapsamında kullanılmıştır.

Ün ve ark. (2012) Türkiye’de Kuduz enfeksiyonunun yayılımında evcil hayvanların, özellikle de köpeklerin etkenin bulaştırılmasında, vahşi yaşamdan daha fazla payı olduğunu bildirmişler, ikinci vektör olarak ise tilkilerin özellikle ülkenin batı bölgesinde hastalığın yayılımında önemli rol aldığını belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada, Türkiye’deki sığırlardaki Kuduz pozitif vaka oranındaki artışa dikkat çekilerek, bu durumu yaban hayat Kuduz vaka sayılarının artışı ile ilişkilendirmişlerdir (Vos ve ark., 2014). T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü’nün 2019 Kuduz Saha Rehberinde Kuduz enfeksiyonun hayvan türlerine göre dağılımında, hasta hayvanların % 90,17’sini evcil hayvanların oluşturduğu bildirilmiştir. Bu oranın % 43,62’sini köpekler ve % 36,63’ünü sığırlar oluşturmakta olup, bu 2 hayvan türü Türkiye’de en çok Kuduz vakalarının görüldüğü hayvan türleri olarak öne çıkmaktadır (https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/zoootik-vektorel-hastaliklar-db/zoootik-hastaliklar/2-Kuduz/6-Rehbler/Kuduz_Profilaksi_Rehberi.pdf). Türkiye’de insan Kuduz vakalarına yönelik bir çalışmada, kaynak olarak sığır gibi evcil hayvanların rolünün azımsanamayacak sayıda olduğu belirtilmiştir (Taşdemir ve ark., 2017).

Bu doktora tez çalışmasında Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’ne ülke genelinden gönderilen saha örneklerinden seçim yapılmış olup, 18 adet Kuduz pozitif örneğin 8’ini sığır orijinli örnekler oluşturmaktadır. Ülke coğrafyasındaki dağılımlarına göre; bu örnekler Hakkari (n=1), Hatay (n=1), Elazığ (n=1), Diyarbakır (n=1), Balıkesir (n=2) ve Çanakkale (n=2) illerinden gelmektedir. Bu bağlamda, Ülkemizin doğusu ve batısında sığırlarda Kuduz enfeksiyonunun yaygın olduğu kanaatine varılmıştır. Doktora tezi kapsamında; eşek (n=2) (Şanlı Urfa, Mardin) ve porsuk (n=1) (Çanakkale) gibi nadir kuduz pozitiflik tespit edilen türler de değerlendirilmiş olup, tür bazlı moleküler kıyaslama yapılmasına da imkan tanınmıştır.

Bu doktora tez çalışmasında, Kuduz virusu saha örnekleri ve referenz virusların moleküler karakterizasyonunu takiben, çeşitli hücre hatları kullanılarak virus izolasyonu çalışmaları eş zamanlı olarak planlanıp yürütülmüştür. Bu bölümde, öncelikle farklı hücre hatlarında virus izolasyonu çalışmalarının literatür eşliğinde tartışması yapılacak olup, ikinci kısımda moleküler karakterizasyon çalışmalarını takiben, son bölümde serolojik çalışma sonuçları tartışılacaktır.

Kuduz virusunun çeşitli hücre hatlarına adaptasyonunda dikkat edilmesi gereken husus, virus-spesifik reseptör bağlantısının sağlanmasıdır. Kuduz virusunun her hücre tipinde bulunan reseptörleri kullanma yeteneği kazanmasının mümkün olduğu araştırmacılar tarafından öne sürülmüş (Tuffereau ve ark., 1998) olsa da, saha RABV izolatlarının permanent hücre hatlarında zayıf bir şekilde replike olduğunu (Nolden ve ark., 2016 ve Takahashi ve ark., 1940) bildiren araştırmalar da bulunmaktadır. Hücre kültürü temelli çalışmalar; virus izolatlarının üretilmesinde kullanılmaktadır. Özellikle virusun köken aldığı konakçı dışındaki hücre hatlarının kullanılması veya doğal konakçıları dışındaki hayvanlarda seri pasajlara tabii tutulması ile attenüasyona uğrayabildiği gerçeğinden hareketle, sabit (fixed) virus suşlarının kazanımı gerçekleştirilmiştir (Nitschel ve ark., 2021). 1882’de izole edilen (tavşan orijinli) orijinal Pasteur Kuduz virusunun farelere adapte edilmesiyle geliştirilmiş Challenge Virus Standard (CVS-11) suşu, uluslararası organizasyonlar (OIE, WHO) tarafından da Kuduz aşısı üretimi ve challenge virus olarak kullanımı kabul edilmiş ve tam karakterize edilmiş referenz bir virus olarak bilinmektedir (Patel ve ark., 2015). Hindistan’da HEK-293, Na-2a ve BHK-21 hücre hatlarının Kuduz virusuna duyarlılıklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada; CVS-11 virusunun BHK-21 hücre hattına adapte olmadığı, saha viruslarının üretilmesinde BHK-21 hücre hattının, Na-2a ve HEK-293 hücre hatlarına göre daha düşük duyarlılıkta olduğu sonucuna varılmıştır (Madhusudana ve ark., 2010). Son yıllarda gerek insan ve gerekse hayvan aşılarının hazırlanmasında, Vero (insan aşıları için) ve BHK-21 (hayvan aşıları için) hücre hatları RABV üretimi amacıyla kullanılmaktadır (Hurisaa ve ark., 2013; Kallel ve ark., 2003; Yu ve ark., 2012 ve Zavareh, 2000). WHO, Kuduz virusu izolasyonunda

Murine Neuroblastoma hücre hattının yüksek hassasiyete sahip olduğunu bildirmiştir (https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIE_S.pdf). Bu doktora tez çalışmasında, referenz suş olan CVS-11 suşunun farklı hücre hatlarında (BHK-21, Vero ve Murine Neuroblastoma) yapılan seri pasajları sonunda, üreme kontrolü anti-nucleoprotein monoklonal antikor ile boyanarak yapılmış olup, ilgili titre değerleri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Buna göre, CVS-11 suşunun hem BHK hem de Murine neuroblastoma hücre hatlarına başarılı bir şekilde adapte olduğu ve ürettiği görülmektedir. Hatta BHK-21 hücre hattında $10^{6,25}$ DKID₅₀/ml olan titrenin, Murine neuroblastoma hücre hattında 10^8 DKID₅₀/ml titreye ulaştığı belirlenmiştir. Bu bağlamda, WHO manuelinde saha izolatları için önerilen Murine neuroblastoma hücre kültürü hattının CVS-11 referenz virusunun üretilmesinde de başarı ile kullanılabileceği gösterilmiştir. Aslında OIE tarafından CVS-11 virusunun üretimi için BHK-21 hücre hattı tavsiye edilmekte olup (OIE, 2018), bu tez çalışmasında Murine neuroblastoma hücre hattının da bu virusun üretilmesinde önemli bir alternatif olabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında kullanılan diğer bir referenz virus olan PV suşunun 3 farklı hücre hattından (BHK-21, Vero ve Murine Neuroblastoma) BHK-21'deki titresinin ($10^{6,25}$ DKID₅₀/ml) murine neuroblastomaya göre ($10^{5,75}$ DKID₅₀/ml) daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Rahpeyma ve ark. (2021)'nin MOI ve virus toplama zamanının virus üretimini etkilediğini rapor ettikleri çalışmadan hareketle, bu doktora tezinde kullanılan referenz virusların üretiminde üç pasaj yapılmış olup, PV suşu için üç pasaj sonucunda herhangi bir titre kaybı yaşanmaması nedeniyle Murine neuroblastoma hücre hattına inokulasyonlarda MOI ve inkubasyon periyodunda yapılabilecek kombinasyonlarla virus titresinin ileri pasajlarda arttırılabileceği kanaatine varılmıştır.

Hücre hatlarının çoğalma hızının, virus replikasyonu üzerinde doğrudan etkiye sahip olduğu, non-sitopatojen virustan olan Kuduz virusunun üretilmesi sırasında hücre hattının da gelişmeye devam ettiği bilinmektedir (Aga ve ark., 2021 ve Maria ve ark., 1988). Kuduz virusu fixed suşlarını (ERA ve PV) Vero ve BHK-21 hücre

kültürlerine pasajlayarak gelişim kinetiklerini değerlendirdikleri çalışmalarında, hücre hatlarının çoğalma hızları hesaplanmış olup, BHK-21'in 72 saatte, VERO'nun 72 saatten fazla sürede bulundukları kabın yüzey alanını tamamıyla kapladıkları sonucuna varmışlardır. Rekombinant Kuduz virusu ERA suşunun 96 saatlik inkubasyon sonunda VERO hücre hattında, PV suşunun ise 72 saat inkubasyon süresi ile BHK-21 hücre hattında en iyi üreme gösterdiğini bildirmişlerdir (Aga ve ark., 2021).

Sokak Kuduz Virusunu'nun izolasyonunda farklı hücre hatlarının duyarlılıkları üzerine yapılan çalışmalarda; bu virusun hücre kültürü hatlarına yavaş adapte olduğu, nöral kökenli murine neuroblastoma hücre hattının bu virusa duyarlı olduğu ve en üstün üreme yeteneğini bu hücre hattında gösterdiği belirtilmiş olup, virus izolasyonu için uygun üreme ortamlarından biri olarak da BHK-21 hücre hattı rapor edilmiştir (Larghi ve ark., 1975; Meslin ve ark., 1996; Rudd ve ark., 1987 ve Smith ve ark., 1977). Çin'de kuduz pozitif yaban gelinciğinin beyin homejenatı, önce fare beynine enjekte edilerek sokak virusu izole edilmiş, ardından BHK-21 hücre kültürüne adaptasyonu sağlanmış ve yerel saha suşundan inaktif kuduz aşısı üretimi için aday bir suş elde edilmiştir (Liu ve ark., 2012). Etiyopya'da yapılan benzer bir çalışmada, saha izolatlarından (Köpek beyni ve insan tükürüğü) karnivorlar için aşı geliştirmek amacıyla önce fare beyninde daha sonra BHK-21 hücre hattında adaptasyon ve izolasyon çalışmaları yapılmıştır (Aga ve ark., 2014). Uluslararası standartlara uygun bir insan Kuduz aşısı geliştirmek maksadıyla Tayland'da yapılan bir çalışmada, 50 adet saha Kuduz virusundan (37 adet köpek, 13 adet insan orjinli) 5 tanesi Neuroblastoma hücre hattına adapte edilebilmiştir. Bunlardan sadece biri kuduz aşısı adayı olarak Vero hücre kültürüne adapte edilebilmiştir (Nitapattana ve ark., 2020).

Bu doktora tez çalışmasında, FAT ile pozitifliği tespit edilen 18 beyin örneği, üç farklı hücre hattına (BHK-21, Vero ve Murine Neuroblastoma) inokule edilmiş olup, yapılan testler sonucunda sadece murine neuroblastoma hücre hattının Kuduz saha örneklerinin izolasyon çalışmalarında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda, Kuduz virusu saha örneklerinden virus izolatu eldesi için murine neuroblastoma hücre hattının, yukarıda literatür bilgide verilen fare beyni

inokulasyonlarının alternatifi olabileceği kanaatine varılmıştır. Çalışmada kullanılan 18 saha örneğinin sadece 3'ü izole edilebilmiş olup, bu sonuç benzer çalışmalarla da uyumlu bulunmuştur. 1K izolatu 2014 yılına ait sığır (Hatay), 2K izolatu 2014 yılına ait köpek (Şanlıurfa), 8B izolatu ise 2013 yılına ait sansar (Çanakkale) orijinli örnekler olup, filogenetik olarak Cosmopolitan lineajının CA2 ve ME alt lineajlarında yer almaktadırlar.

Doku kültürü enfeksiyon oranı, virus/hücre oranı arttıkça hücre büyümesinin daha yüksek oranda ve daha düşük inkübasyon süresi ile olması gerektiğini gösteren en önemli büyüme hızı belirteci faktörlerden biridir (Aga ve ark., 2021). CVS-11 virusunun en yüksek titre değeri eldesi için BHK-21 hücresinde en iyi enfeksiyon zamanını 72 saat olarak belirleyen Rahpeyma ve Bashar (2021), aynı zamanda yüksek MOI ile inokulasyon yapılmasının hücre büyüme hızını etkileyeceği, bu bağlamda tüm hücrelerin aynı anda enfeksiyona uğramasının virusun sadece 1 virus replikasyon döngüsünü tamamlaması nedeniyle düşük virus titresine neden olacağını rapor etmişlerdir. Diğer yandan düşük MOI ile inokulasyon sonrası hücrelerde minimum enfeksiyon gelişmesiyle virusun büyüme kinetiğinin yavaşlayacağı ve virus hasadının gecikeceği de bildirilmiştir (Chapman ve ark., 1973). Başka bir çalışmada, yerel kuduz saha virusunun BHK-21 hücre kültürüne adaptasyonunda, 72 saat inkubasyon uygulanmıştır (Aga ve ark., 2014). Bir virusun enfekte edebileceği duyarlı hücre sayısı MOI kavramı içinde incelenmekte olup, bu tez çalışmasında hücre kültürü pasajlarında ilk inokulasyonda 1 MOI oranı kullanılırken, ileri pasajlamalarda virus titresini arttırmak için 0,5 MOI tercih edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan referenz virusların da farklı hücre hatlarına adaptasyonu denenmiş, referenz virusların üretilmesinde inkubasyon süresi ilk 3 pasajda 72 saat olarak gerçekleştirilmiştir. İnokulasyon miktarı ise 0,5 MOI'dir. Vero hücre hattında, CVS-11 suşu ile giderek azalan bir titre eldesi gözlenmiş (Çizelge 3.4. $10^{2,75}$ ve $10^{1,75}$ DKID₅₀/ml), üçüncü pasaj sonunda herhangi üreme tespiti yapılamamıştır. Benzer sonuç PV suşunda da belirlenmiş olup, üç kör pasajın hiç birinde virus üremesi tespit edilememiştir. Ayrıca Vero hücre hattında, hiçbir saha suşunun izolasyonu da mümkün olamamıştır. Bu bağlamda, Vero hücre hattının zayıf titreye sahip yerel saha izolatlarının kazanımı için uygun olmadığı kanaatine varılmıştır.

Bu doktora tez çalışmasında, saha izolatlarının kazanımı için 1 MOI ve 72 saatlik inkubasyon süresi uygulanmıştır. 18 saha örneğinden 3 adedi (1K, 2K ve 8B) murine neuroblastoma hücre hattında üretilebilmiştir (Çizelge 3.1).

Moleküler analizler sonunda elde edilen genetik veriler Lyssavirus türlerindeki farklılıkların kantitatif karşılaştırılmasına imkan vermektedir (Marston ve ark., 2007). Ülkemizde sirküle olan Kuduz viruslarının moleküler karakterizasyonu, virus varyasyonunun ülke coğrafyasındaki dağılımını göstermekte olup, hastalığın sürdürülmesine dahil olan rezervuar türlerin de tanımlanmasına yardımcı olması açısından önem arz etmektedir. Kuduzla mücadele programlarından en üst düzeyde fayda sağlayabilmek için rezervuar türlerin tanımlanması, viral etkenle mücadele stratejilerini belirlemekte oldukça faydalı veriler sunmaktadır. Türkiye’de sirküle olan Kuduz virusları ile ilgili ilk filogenetik analiz, Avrupa genelinde yapılan geniş çaplı bir araştırmada bildirilmiştir (Bourhy ve ark., 1999). Ülkemizde varlığını sürdüren Kuduz virusları için, Orta Doğu ve Doğu Avrupa viral popülasyonları arasında aracı bir pozisyonda yer aldığı sonucuna varılmıştır (Johnson ve ark., 2010c). Filogenetik analizler neticesinde coğrafik orijinleri ile ilişkili olarak ülkemizdeki Kuduz saha izolatları farklı 3 dala (Doğu, Batı ve Kafkas) ayrılmış olsa da (Johnson ve ark., 2003), klasifikasyon çalışmalarında ortak bir isimlendirme yapılan Bourhy ve ark. (2008)’nın çalışmasında, Kuduz virusu N ve G gen bölgeleri incelenerek farklı lineajlarda (Afrika 2, Afrika 3, Kutupla ilişkili, Asya, Cosmopolitan ve Hindistan) adlandırılmışlardır. Bu tez çalışmasında, geçmiş yıllarda coğrafi kökene dayalı karakterize edilen Türk saha suşlarının da yeni isimlendirmeye göre moleküler karakterizasyonları yapılmış olup, tüm saha suşlarının *Cosmopolitan* alt lineajında oldukları belirlenmiştir (Tatan-Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022). Bu bağlamda, yıllar içinde enfekte yabani karnivorların Ülkemizin doğu ve batı bölgeleri arasındaki serbest hareketliliği, Kuduz saha suşları arasındaki coğrafik farklılığı ortadan kaldırmış olup, doğudaki suşların batıda, batıdaki suşların doğuda görülür olmasına neden olmuştur. Moleküler karakterize edilen saha suşlarına doğu/batı/kafkas isimlendirilmesi yerine, uluslararası literatürde kullanılan alt lineajlara ait lineaj sınıflandırmasının yapılmasının daha uygun olacağı kanaatine

varılmıştır. Bu tez çalışmasında karakterize edilen 18 adet Kuduz saha örneğinde, N ve G gen bölgelerine spesifik primerler kullanılarak anılan bu bölgelerin tam genomik analizi yapılmış, araştırılan tüm saha suşlarının *Cosmopolitan* lineajı içinde kümелendiği ve bu lineaj içinde ME1a, ME2, CA1 ve CA2 olarak isimlendirilen 4 alt lineaja ayrıldığı belirlenmiştir (Şekil 3.6 ve 3.7).

Cosmopolitan CA2 alt lineajına ait Kuduz virusunun varlığı İran, Irak, Rusya ve Azerbaycan gibi ülkelerde bildirilmiştir (Troupin ve ark., 2016 ve Zeynalova ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında elde edilen dizin analizleri neticesinde Ülkemizin doğu bölgelerinde *Cosmopolitan* CA2 alt lineajı daha baskın tip olarak görülmekteyken, batı bölgelerinde bu lineaja ait verilere rastlanamamıştır (Tatan-Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022). Türkiye’de hem yaban hayatı hem de karnivorlarda yaygın olarak görülen bir diğer alt lineaj ise *Cosmopolitan* ME1a’dır (Johnson ve ark., 2003 Johnson ve ark., 2013 ve Un ve ark., 2009). Bu alt lineaj çoğunlukla İran ve Türkiye’den rapor edilirken, Irak, İsrail, Ürdün ve Gürcistan’da da bu linajın bölgede sirküle olduğuna dair bildirimler yapılmıştır (Al-Eitan ve ark., 2021; Bannazadeh Baghi ve ark., 2018; Horton ve ark., 2015 ve Marston ve ark., 2017b). Bu tez çalışmasında elde edilen verilere göre ülkemizin doğu kesimlerinde hem *Cosmopolitan* CA2 hem de *Cosmopolitan* ME1a alt lineajlarının birlikte sirküle olduğu sonucuna varılmıştır. Hayvan hareketlerine bağlı olarak bu alt lineajların tek bir noktada sabit kalmayıp, zaman içerisinde yer değişimlerinin meydana geldiği tespit edilmiştir (Tatan-Atıcı ve Oğuzoğlu, 2022). Bu bağlamda, Ülkemiz genelinde *Cosmopolitan* lineajındaki ME1a, ME2, CA1 ve CA2 alt lineajlarına ait RABV suşlarının sirküle olduğu ve literatür bilgide görüldüğü gibi bu lineajların Türkiye’nin sınır komşusu olan ülkelerde de bulunduğu görülmüştür.

Ardahan ilinden gelen bir köpeğe ait örnek, tiplendirmede önemli olan N gen bölgesi sekans değerlendirmesinde *Cosmopolitan* CA1 alt lineajındaki örneklerle kümelenmiştir (Şekil 3.6). Bu alt lineaj, bugüne kadar Türkiye’de bildirilmemiş olup, ilk kez varlığı bu doktora tez çalışması ile tespit edilmiştir. İran, Rusya ve Azerbaycan gibi ülkelerde *Cosmopolitan* CA1 alt lineajın varlığı

bildirilmektedir (Hosseini Heydarabadi ve ark., 2020; Nadin ve Susan, 2020 ve Zeynalova, 2020). Johnson ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada, Ardahan ilindeki Kuduz pozitif köpek numunelerinde yeni nomenklatüre göre CA2 ve ME1a alt lineajlarının varlığı birlikte tespit edilmiş olup, bölgedeki kontrolsüz hareketlerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Literatür bilgidaki bu farklı alt lineajlara ilave olarak, bu doktora çalışmasında *Cosmopolitan* CA1'in de varlığı ilk kez belirlenmiştir. Aynı bölgede 3 farklı alt lineaja ait virusun sirküle olma nedeninin, coğrafik konumla ilişkili olduğu kanaatine varılmıştır. İleride yapılacak survey çalışmalarında, bu bölgedeki yeni alt lineajların varlığının araştırılmasının Kuduz enfeksiyonunun epidemiyolojik durumunun aydınlatılmasında önem arz edeceği düşünülmektedir.

Cosmopolitan ME2 alt lineajının Türkiye'ye Avrupa'dan giriş yaptığı ve uzun yıllardan beri bölgede korunmuş halde varlığını sürdürdüğü düşünülmekte olup, hem yaban hayatta hem de evcil köpeklerde görülen ME2 alt lineajının türler arası konakçı değişimine maruz kalarak ülke genelinde yaygın olarak yayılım gösterdiği rapor edilmiştir (Horton ve ark., 2015; Marston ve ark., 2017b; Un ve ark., 2009 ve Un ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında elde edilen filogenetik analizlerde de farklı hayvan türlerinde ME2 alt lineajının ülkede yaygın olarak seyir gösterdiği görülmüştür.

Türkiye'de Kuduz virusu suşları hakkında yapılan ilk çalışmalarda rezervuar konakçının köpek olduğu ve köpeklerden tilkilere yayılım gösterdiği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2003). Tilki ve köpek türlerinden elde edilen viruslar arasındaki yüksek sekans özdeşliği, iletimin RABV genomundaki konakçıya özgü kalıntılara bağlı olmadığını göstermiştir (Marston ve ark., 2017b). Doktora tezinde çalışılan tilki (n:2) ve köpek (n:4) numunelerinin N gen bölgesi bakımından aa homolojileri % 80,4-87,3 olarak belirlenmiş ve literatür verideki yüksek sekans özdeşliği ile uyumlu bulunmuştur.

Kuduz aşısı etkinliğinin, virus ve aşı suşları arasındaki genetik ve/veya antijenik farklılıklardan potansiyel olarak etkilenebildiği bildirilmiştir (Gao, 2018;

Mumford, 2007 ve Smith ve ark., 2004). Aşıların genellikle konakçıları filogrup I lyssaviruslarına (Brookes ve ark., 2005; Brookes ve ark., 2006; Hanlon ve ark., 2005 ve Nolden ve ark., 2014) karşı koruduğu, daha fazla genetik ve antijenik ıraksak olan filogrup II ve III lyssaviruslarına karşı ya az koruma sağladığı veya hiç koruma sağlamadığı bildirilmiştir (Badrane ve ark., 2001b; Hanlon ve ark., 2005 ve Horton ve ark., 2014). Mevcut kuduz aşıları, klasik RABV'lara karşı etkili koruma sağlamaktadır (Kaur ve ark., 2015). Ancak Sokak RABV izolatlarının G gen bölgesi sekanslarının bazı coğrafyalarda kullanılan mevcut aşı suşlarından farklılığı nedeniyle aşı ile korunmada potansiyel risk oluşabileceği belirtilmiştir (Ayorloo ve ark., 2018; Orłowska ve ark., 2014 ve Patel ve ark., 2015). Çok sayıda sokak virusunun aşı suşlarından antijenik olarak farklı olduğu gösterilmiş olup (Aghomo ve Rupprecht, 1990a; Aghomo ve Rupprecht, 1990b; Dietzschold ve ark., 1990; Okoh, 2000; Umoh ve ark., 1990; Wiktor ve Koprowski, 1980 ve Zanluca ve ark., 2011), aşıların sokak RABV varyantlarına karşı korunmada daha az etkili olduğu bildirilmiştir (Sureau ve ark., 1983 ve Wiktor ve Koprowski, 1980). Bu doktora tez çalışmasında, Ülkemizde farklı coğrafik alanlarda sirküle olan Kuduz saha izolatları N ve G gen bölgeleri tam genom analizi ile moleküler olarak karakterize edilmiştir (Şekil 3.6 ve 3.7). Ayrıca küresel olarak ticari kullanımda olan aşı suşlarının ilgili sekansları ile amino asit düzeyinde de kıyaslamalar yapılmıştır (Şekil 3.4 ve 3.5).

Kuduz virusunun konakçı adaptasyon modelinde etkin rol alan N geni, 450 amino asit kodlamakta ve yapısında 4 antijenik bölge bulundurmaktadır. Antijenik bölge I (374~383 aa) ve III (313~337 aa), RNA genomun enkapsidasyonunda ve viral replikasyon için gerekli olan aktif bir sitoplazmik ribonükleaz kompleksinin oluşumunda görev almaktadır (Sambrook ve Russel, 2001). Kuduz virusu transkripsiyon ve replikasyon mekanizmalarında önemli role sahip olan fosforilasyon bölgesi 389. aa pozisyonunda bulunmaktadır (Sambrook ve Russel, 2001 ve Wu ve ark., 2003). Değişikliklere karşı stabil bir yapıya sahip olan N proteini tüm Kuduz virusu suşlarında yüksek korunaklı bölge olarak tanımlanmaktadır. Ancak kısa segmentlerdeki aa farklılıkları Kuduz virusu genotipleri arasında genetik bakımdan çeşitliliğe sebep olabilmektedir (Kuzmin ve ark., 2005 ve Wunner, 2007). N gen bölgesine ait dizinlerin filogenetik analizinde, küresel aşı suşları ile tez çalışmasındaki

örnekler arasında % 58,1-93,8 aa'lik benzerlik olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4). Ayrıca doktora tez çalışmasında saha örneklerinin Antijenik bölge I ve III'deki aa benzerlik/farklılıkları Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Ülkemizde sirküle olan Kuduz saha virusları aa bakımından kendi aralarında yüksek homoloji sergilemekle birlikte, referenz viruslar ile karşılaştırıldığında bazı değişiklikler olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 3.4). T hücre epitopu olarak da tanımlanan Antijenik bölge IV'te (359-366 aa ve 375-383 aa) tez çalışmasında araştırılan tüm saha örneklerinin değişime uğramadığı, N protein yapının diğer bölgelerine kıyasla antijenik bölge IV'ün tüm örnekler için mutasyon bakımından korunaklı bölge olduğu değerlendirilmesi yapılmıştır (Şekil 3.8).

G proteini, viral nörotropizmin ana belirleyicisidir. Bu proteindeki mutasyonlar, virusun hücre kültüründe çoğalma yeteneğini bozmadan nöroinvasivliğini azaltır veya ortadan kaldırır (Dietzschold ve ark., 1983; Seif ve ark., 1985 ve Tuffereau ve ark., 1989a). RABV G proteini; sinyal peptid, ektodomain, transmembran alanı ve sitoplazmik kuyruk olmak üzere 4 kısımdan oluşur (Kuzmina ve ark., 2013b ve Wunner ve ark., 1988). G proteini üzerindeki ektodomain ve sitoplazmik yapı, Kuduz virusunun patojenitesi ve immün yanıttan kaçışı ile ilişkilendirilmektedir (Coulon ve ark., 1998; Huang ve ark., 2017; Prehaud ve ark., 2010 ve Virojanapirom ve ark., 2012;). Ektodomain bölgesinde tanımlanan 4 majör, 1 minör antijenik bölge bu yapı içerisinde yer almaktadır (Benmansour ve ark., 1991; Lafon ve ark., 1984 ve Luo ve ark., 2020). Söz konusu toplam 5 bölgeden G proteini üzerindeki 34-42 ve 198-200 aa'leri arasındaki bölgeler antijenik site II (Prehaud ve ark., 1988), 330-338 aa'ler arasındaki bölge ise antijenik site III olarak tanımlanmaktadır (Seif ve ark., 1985 ve Wunner ve ark., 1988). Doktora tez çalışmasında değerlendirilen Kuduz saha viruslarının G gen bölgesi antijenik alanlarında yer alan aa'lerin birkaçı dışında büyük oranda korunduğu tespit edilmiştir. GenBank'tan sağlanan 1993 yılına ait Türk saha izolatu (KX148166) ile tez çalışmasındaki örneklerin, antijenik bölge II ve III alanlarında yüksek homoloji gösterdiği (%88,5-98,3) belirlenmiştir. Ayrıca saha örneklerinin G gen dizilerinin de birbirleriyle yüksek aa homolojisi (%71,7-98,8) sergilemiş oldukları görülmektedir (Şekil 3.5). Aynı karşılaştırmalar tez kapsamında kullanılan referenz suşlar ile de

yapılmış olup, CVS-11 (%80-94,4) ve PV (%72,2-97,2) suşlarında da benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Ektodomain bölgesinde %4,8'lik aa değişiminin viruslar arasında 1 antijenik birimlik değişmesine neden olacağı ve bu oranın antikor titresinde ortalama 2 kat değişim meydana getirebileceği rapor edilmiştir (Evans ve ark., 2012). Bu bağlamda, saha suşları arasında G gen bölgesinin bütünü açısından bazı farklılıkların olduğu ve referenz viruslar ile de karşılaştırılmasında bu değişimlerin varlığı görülmektedir. Bu durum, Türk saha izolatlarındaki söz konusu farklılıkların antijenik ünitenin değişimine ve dolayısıyla antikor titresinde de oransal değişimlere neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

G proteininin 164 ve 303 aa'leri arasındaki 9 bölgenin (164, 182, 200, 205, 210, 242, 255, 268 ve 303) yetişkin farelerde virusun patojenitesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Takayama-Ito ve ark., 2004). Tez kapsamında değerlendirilen saha örneklerinde D3, 4D, 5D, K1, B2 ve B3 örneklerinde literatür bilgide bahsi geçen bölgelerde aa farklılıkları dikkat çekmektedir.

Sokak kuduz viruslarının G protein bölgesindeki *Arginin* (R333)/ *Proline* (P333) mutasyonunun, Kuduz aşısının indüklediği antikorlarda nötralizasyon duyarlılığını önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir. Ayrıca ortaya çıkan mutantların mevcut Kuduz aşısı etkinliğini potansiyel olarak düşürebileceğinden, yakından izlenmesi gerektiği düşünülmüştür (Wang ve ark., 2019a). Wang ve ark. (2019a) filogrup 1'de yer alan Lysaviruslar için R333 bölgesini yüksek oranda korunmuş aa sahip olduğunu bildirmiş olup, bu doktora çalışmasında da analiz edilen saha örneklerinde bu amino asit bölgesinde mutasyona rastlanmamıştır. Özellikle antijenik bölge III' te yer alan mutasyonların aşı kaynaklı antiserumlara çok dirençli olduğu bildirilmiştir. D3 örneğinde 331. aa'de Serine (Ser) S → *Threonine* (Thr) T ve 338. aa'de *Isoleucine* (Ile) I → *Asparagine* (Asn) N aa mutasyonları tespit edilmiş olup, bu pozitif Kuduz saha örneğinde aşı suşlarına karşı nötralizasyon direnci varlığı/yokluğu ileride yapılacak deneysel çalışmalarla açıklığa kavuşturulması gerektiği kanaatine varılmıştır. Antijenik bölge II değerlendirilmeye alındığında ise; aa bölgesinde 2K örneğinde 41V (*Valine*) ve 42C (*Cysteine*) mutasyonları mevcutken 7B örneğinde ise

41S (*Serine*) mutasyonu görülmektedir. Aynı bölgede GenBank'tan elde edilen CVS-11 suşu (GQ918139) içinde 40E (*Glutamic acid*) mutasyonu dikkat çekmektedir. *Cosmopolitan* ME2 dalında yer alan B1 ve B2 örneklerinde ise Antijenik bölge IIa üzerinde sırasıyla 199K (*Lysine*), 200T (*Threonine*) aa mutasyonları tespit edilmiştir. Ayrıca G proteini ektodomain bölge üzerinde yer alan aa yapıda D3 örneğinde 164G (*Glycine*) ve 268M (*Methionine*) mutasyonu görülmektedir.

Antikorlar ya da nöronal reseptörler tarafından tanınmayı sağlayan Antijenik bölge III (Benmansour ve ark., 1991) üzerinde yer alan *Arginin* 333'ün değişmesi, yetişkin hayvanlar için virulans kaybıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Dietzschold ve ark., 1983; Seif ve ark., 1985 ve Tuffereau ve ark., 1989a). Söz konusu bu aa'teki değişim, *Arginin* (R333)/*Aspartat* (D333) şeklinde olduğunda, Kuduz virusunun patojenitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir, ki Filogrup II'de bu viruslar yer almaktadır. Bu değişim büyük olasılıkla filogrupların patojenitesinde azalmaya sebep olmakta ve mevcut kuduz aşılarının filogrup I Lyssavirus'a karşı neden daha iyi koruma sağladığını açıklamaktadır (Brookes ve ark., 2005; Brookes ve ark., 2006; Hanlon ve ark., 2005 ve Nolden ve ark., 2014;). Ayrıca *Lysine* (K330)'un varlığı, Kuduz virusunun virulensinde etkili bulunmuştur (Badrane ve Tordo, 2001 ve Tuffereau ve ark., 1989a). R333/K333 ve K330'a sahip Kuduz viruslarının nöronal reseptörlere bağlanabilme ve motonöronlarda yayılabilme potansiyellerinin değiştiği bildirilmiştir (Badrane ve Tordo, 2001; Coulon ve ark., 1998 ve Tuffereau ve ark., 1998b). R333'e sahip suşun intrakraniyal (IC) inokülasyondan sonra yetişkin fareleri öldürdüğü, diğer aa'lere (*Glutamik asit* (*Glu*), *İzolösin* (*Ile*), *Glisin* (*Gly*), *Metionin* (*Met*) veya *Serin* (*Ser*)) sahip suşların ölümcül olmayan enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Seif ve ark., 1985 ve Tuffereau ve ark., 1989a). Bu tez kapsamında, tüm saha örneklerinde R 333'ün korunmuş olduğu ve literatür bilgiye dayanılarak tüm saha örneklerinin patojen suşlar olduğu kanaatine varılmıştır.

G proteini üzerinde N-glikosilasyon (NXT/S) bölgesi Kuduz virusunun hücre fonksiyonlarında, enfeksiyon, replikasyon, patogeneze ve bağışıklıktan kaçınma gibi fonksiyonlarda önemli role sahip olmakla birlikte viral evrim sırasında kolayca

etkilenecek kaybolabilen bir bölgedir (Vigerust ve Shepherd, 2007). RABV'de iki N-glikosilasyon bölgesi, Asn37 ve Asn319 yüksek oranda korunmuş bölgelerdir (Badrane ve Tordo, 2001). Düşük pH bağımlı füzyon ve virion üretimi gibi G proteini fonksiyonları bakımından önemli olan Asn319 RABV ve diğer Lyssaviruslarda korunurken (Badrane ve Tordo, 2001 ve Yamada ve ark., 2013a), Asn37 bazı saha izolatlarında bulunmamaktadır (Yamada ve ark., 2013b). Sokak virusu G proteininde Asn37 verimli çekirdek glikosilasyonunun virusun hücre kültüründe çoğalmasını arttırdığı bildirilmiştir (Yamada ve ark., 2013b). Çoğu sokak kuduz virusu G proteini iki N-glikosilasyon bölgesine (Asn37 ve Asn319) sahipken, fixed viruslar ek glikosilasyon bölgelerine (Asn158, Asn204 veya Asn247) sahiptir (Yamada ve ark., 2012). Bu doktora tez çalışmasında Kuduz saha virusu ve fixed suşların Glikoprotein analizinde Asn37 N-glikolizasyonu görülmektedir. Asn319 Lysaviruslarda genel olarak korunmuş yapıya sahip durumda olduğundan G proteini için önemli işleve sahip olduğu düşünülmektedir. Bu bölgede gerçekleşen mutasyonlar proteinde doğru katlanmayı önlemektedir (Badrane ve Tordo, 2001 ve Guadin, 1997). Tez çalışmasında, Asn319 N-glikolizasyonu bir örnek dışında (7B-TKP) tüm saha izolatlarında bulunmaktadır. Yamada ve ark. (2013b) CVS suşunda ilave Asn204 N-glikosilasyonunun varlığının Kuduz virusuna biraz daha virulent özellik kazandırdığı bildirmişlerdir. Çalışmamızda tıpkı fixed virus CVS-11'de olduğu gibi 5D örneğinde de ilave Asn204 N-glikosilasyon bölgesi tespit edilmiştir. Bunlara ilave olarak bu tez çalışmasında kullanılan PV suşunun, tıpkı Ming ve ark. (2009)'nın bildirdiği çalışmadaki gibi, Asn 247 ve N-glikolizasyon bölgelerine sahip olduğu görülmüştür. Yamada ve ark. (2013a) hücreye adapte suşlarda G proteininde tek bir ilave N-glikosilasyon (158, 194, 204 ve 247 pozisyonlarında) varlığının hücre adaptasyonu ile ilişkili olduğu bildirmiştir. Ancak tez çalışmasının hücre kültürü adaptasyon çalışmalarında 5D (Fox-Kahramanmaraş) izolatının 3 ayrı hücre kültüründe de üreme göstermemesi nedeniyle literatür bilginin aksine adaptasyonu sağlanamamıştır. Asn146'daki ilave N-glikanın, Neuroblastoma hücrelerinde sokak virusunun çoğalmasını arttırdığı bildirilmiştir (Yamada ve ark., 2013a). Ancak doktora tezinde çalışılan saha ve referenz suşlarda 146. Amino asit bölgesinde N-glikosilasyon bulunmamakla birlikte 3 saha virusunun (1K, 2K ve 8B) başarılı bir şekilde Murine Neuroblastoma hücre kültürüne adapte olup, üreme gösterdikleri belirlenmiştir. Bu

bağlamda, 146.aa'deki N-Glikozilasyon dışında, başka N-glikozilasyonların da (Asn37 ve Asn319) etkili olabileceği kanaatine varılmıştır. Sözü geçen bu iki glikozilasyon, hücre kültürüne adapte olan tüm saha izolatlarımızda (n=3) bulunmaktadır.

RNA virusları konak hücrelerde replikasyon sırasında mutasyona uğramaya meyillidir. Kuduz aşısı suşları ve aşısı geliştirme çalışmaları sırasında genomik mutasyonlar kuduz aşısı kalite kontrolü ve karakterizasyonu için önemli bilgi sağlar (Horiya ve ark., 2022). 1K izolatının Neuroblastoma hücre kültürü adaptasyonları ardından kısmi N gen bölgesi bakımından moleküler değerlendirilmesi yapılmıştır. Adapte izolat da aa bakımından nokta mutasyonlar (5., 15., 175., 177., 178.) dikkat çekmektedir (Çizelge 3.9). Aynı şekilde farklı hücre kültürüne adaptasyon basamakları tamamlanmış referenz suşlar değerlendirildiğinde; adapte virusların büyük oranda genomik kararlılığını koruduğu ve birkaç nokta mutasyon dışında moleküler seviyede değişiklik görülmediği tespit edilmiştir (Çizelge 3.9 ve Şekil 3.13).

Nötralizan antikorlar virusun duyarlı olduğu hücre reseptörlerine bağlanmasını bloke ederek enfeksiyon oluşumunu önleyebilme yeteneğine sahiptirler. Kan serumunda nötralizan antikor tespiti, aşısı ya da doğal enfeksiyon sonucu konakçıda oluşan spesifik bağışık yanıtın ana göstergesidir (Astawa ve ark., 2018). Kuduz virusuna karşı oluşan nötralizan antikorları saptamak ve seviyesini ölçmek için kullanılan RFFIT ve FAVN testleri, daha önce Kuduz enfeksiyonuna karşı aşılanmış ve/veya RABV ile enfekte olduğundan şüphelenilen deneklerden alınan biyolojik numuneler (serum, plazma ve serebrospinal sıvı) kullanılarak gerçekleştirilen, WHO ve OIE tarafından önerilen altın standart metotlardır (Ciconello ve ark., 2022). Uluslararası kuruluşlarca (WHO ve OIE) $\geq 0,5$ IU/ml Kuduz virusu nötralizan antikor titresi, kuduz enfeksiyona karşı aşılama sonrası minimum humoral yanıtın uyarılmasında yeterli olan seviye olarak kabul edilmektedir (Doornekamp ve ark., 2020; Manning ve ark., 2008; WHO, 2018 ve WOA, 2022). Merkezi sinir sisteminin enfeksiyondan korunmasında Kuduz virusu nötralizan antikor titresinin; inokulum dozuna, aşısı suşu ve virus arasındaki çapraz reaksiyonun derecesine, antikor yanıtın

baskın izotipine bağılı olduğu bilinmektedir (Ertl, 2018). Kuduz enfeksiyonuna karşı aşı ile bağışıklık sağlanmasında ana faktör, zarf proteini olan G proteinini nötralize edebilecek antikorların oluşumu ve sitokin üretimini indükleyen CD4⁺T hücrelerinin aktivasyonudur (Baer ve ark., 2007; Mifune ve ark., 1981; Wiktor ve ark., 1973 ve Wunderli ve ark., 1991;). Antikoru nötralize edici etkisi, aşılama sonrası uyarılan humoral bağışıklık tepsinin yanı sıra, IgG antikorunun değişken N-glikozilasyon bölgesinin antijene bağlanmasından ve antikoru karakteristik özelliklerinden de etkilendiği belirlenmiştir (Vigerust ve Shepherd, 2007; Ciconello ve ark., 2022). Antikoru nötralize edici aktivitesi, antikordaki N glikozilasyon bölgelerinin varlığına göre artabileceği ya da azalabileceği bilimsel çalışmalarla desteklenmiştir (Ciconello ve ark., 2022 ve Wright ve ark., 1991).

Doktora tez çalışmasında, Türkiye’de ticari olarak kullanılan 5 farklı kuduz aşısı ile aşılanmış ve Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı FAVN testi sonucu 0,5 IU/ml üzerinde olan 72 adet serum numunesi kullanılmıştır. Tez çalışmasında titre düzeyleri belirlenen CVS-11, PV ve Saha izolatına (1K) karşı test edilen serum örneklerinin antikor pozitifliklerini gösteren veriler tabloda sunulmuştur (Çizelge 3.6). Tez çalışması kapsamında FAVN testinde kullanılan referenz viruslar ve Kuduz virusu saha izolatı arasındaki antijenik farklılıklar yukarıda belirtilmiş olup, sözkonusu farklılıkların, özellikle immun yanıtı sorumlu G proteininin ektodomain bölgesine lokalize olduğu görülmektedir. Bu antijenik düzeydeki çeşitlilik serolojik sonuçlarda da kendini göstermekte olup, testlerde kullanılan virusların pozitif serum örneklerindeki nötralizan antikor titrelerini tanıma kapasitesi açısından da bu farklılıklarla uyumlu benzer bulgular alınmasına neden olmuştur. Antikor titre değerlerinin, CVS-11 ve PV suşunda $\geq 70,5$ ile 0,5 arasında dağılım gösterdiği, Saha suşunda ise $\geq 53,3$ ile 0,7 IU/ml arasında olduğu belirlenmiştir. CVS-11 suşunun aşıları hayvanlardan alınan tüm serum örneklerindeki Kuduz spesifik nötralizan antikorları, 0,5 IU/ml üzerinde tanıdığı (72/72, %100) tespit edilmiştir (Çizelge 3.6). PV suşunun 72 serum örneğinden ikisinde herhangi titre tespiti yapamadığı (70/72, %97,22), saha izolatının ise sadece 1 serum örneğinde negatif sonuç verdiği (71/72, %98,61) belirlenmiştir (Çizelge 3.5 ve 3.6). Elde edilen

sonuçlara göre; nötralizan antikorları tanıma açısından CVS-11>Saha izolatu>PV suşu olmak üzere bir başarı ölçüsü belirlenmiştir.

A aşısı SAD Vnukova Kuduz virusu suşu içermekte olup, bu aşı suşu, test virusları ile heterolog suş oluşturmaktadır. A aşısı ile aşılanan hayvanlara ait serum örneklerinde (n=14), CVS-11 ve saha izolatu ile tüm örneklerde pozitiflik tespit edilirken, PV suşu 1 örnekte herhangi titre değeri tespit edememiştir. A aşısı ile aşıli örneklerin çoğunda (n:10, %71,42) en yüksek nötralizan antikör titresi CVS-11 suşu tarafından tespit edilmiştir. Söz konusu pozitiflikleri, diğer referenz virus PV'ye göre saha izolatının daha başarı ile tanıdığı görülmektedir. Üstelik saha suşu ile yapılan FAVN testi ile tespit edilen titre değerleri açısından da benzer başarı dikkat çekmektedir (1,1- $\geq$ 40,5 IU/ml).

B aşısı BHK hücresinde kültüre edilmiş CVS suşu içermektedir. FAVN testinde kullanılan CVS-11 suşu B aşısı ile homolog suş oluşturmakta olup, bu aşı ile aşılanmış hayvanlarda (n=4), CVS-11'e karşı daha yüksek nötralizasyon titresi bulunması beklenen bir sonuçtur. B aşısı için heterolog suş olan PV ve Saha suşu ile yapılan FAVN testinde daha düşük nötralizan antikör titreleri tespit edilmiş olmakla birlikte, her iki heterolog test virusu ile de tüm pozitiflikler tanımlanabilmiştir. Sonuçların istatistiksel yönden değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis metodu kullanılmış olup, testte kullanılan 3 virusun da nötralizan antikorları tanıma başarıları benzer çıkmıştır ($p>0,05$).

C aşısı PV SVR289, D aşısı PV RIV ve E aşısı PV G52 suşlarını içermektedir. Her ne kadar PV referenz suşu bu aşılarıdaki virus suşları ile homolog suş olmasına rağmen, serum örneklerinde CVS-11 ile daha yüksek titre değeri tespiti yapılmıştır. C, D ve E aşıları ile aşılanmış hayvanlara ait toplamda 54 serum örneği bulunmaktadır. CVS-11 suşunda 7,8 IU/ml üzerinde antikör titresi %81,48 iken, bu oran PV suşunda %51,85 bulunmuştur. C, D ve E aşıları ile aşıli serum örneklerinde PV ve saha izolatu ile FAVN testi değerlendirmesinde her iki suşta da 1 örnekte koruyucu standart titre

değerinin altında nötralizan antikor seviyesi tespit edilirken, CVS-11 suşu ile yapılan nötralizasyon testinde tüm örneklerde koruyucu titre tespiti yapılmıştır. Bu durum; C, D ve E aşıları her ne kadar PV suşu ile homolog suş olsalar da üretim aşamasında farklı hücre kültürlerinde kültüre edilmiş olmaları ve seri pasajlar sonunda suşta meydana gelebilecek değişikliklerden kaynaklı referenz suşun nötralizasyon kinetiğinde farklılık oluşumuna sebep olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Aynı zamanda; serumların alındığı hayvanların geçmiş dönem aşı kayıtları bilinmediğinden, daha önce CVS ya da farklı suşta aşı ile aşılanmış olma olasılıkları da bu farklılığın sebeplerinden olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Sonuçların istatistiksel yönden değerlendirilmesinde Ki-Kare metodu kullanılmış olup, 31 ila ≥ 70 IU/ml arasındaki nötralizan antikor değerlerini en başarılı şekilde CVS-11'in tanıdığı ve bu sonuçların anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). 0,5 ila 5,9 IU/ml arasındaki antikor değerlerini ise, bu çalışmada izolasyonu gerçekleştirilen Türk saha suşunun en başarılı şekilde tanıdığı ve bu sonuçların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Yerel RABV izolatlarının kullanımı ile heterolog suşlarda immunizasyon elde edildiği (Astawa ve ark., 2018), laboratuvara uyarlanmış sabit suşların hücre kültürü adaptasyonları sırasında çoklu mutasyonlar kazanabildiği rapor edilmiştir (Li ve ark., 2021). G proteini ektodomain bölgesinde meydana gelen mutasyonlar suşların nötralizasyon kinetiklerinin farklılaşmasında önemli etki göstermektedir (Maillard ve Gaudin, 2002 ve Moore ve ark., 2005). Aşı çalışmalarında kullanılan challenge viruslarla homolog suşların kullanıldığı RFFIT testinde nötralizan antikor sonuçlarının %30 daha fazla ölçüldüğü, doğru bir spesifik antikor yanıt etkinliğini tespit etmek için heterolog suşlarla çalışılması gerektiği bildirilmiştir (Moore ve ark., 2005). Bu bağlamda, bu tez çalışmasında kullanılan saha izolatı, aşı suşları ve referenz viruslarla heterolog suş statüsünde olduğundan, referenz viruslara göre daha düşük nötralizan antikor titrelerini tanıyabilmesi söz konusu literatür bilgiye atfen anlamlı bulunmuştur. Saha suşu ile yapılan FAVN testi sonucunda antikor titreleri düşük tespit edilmiş olsa da, bu tez kapsamında elde edilen saha izolatının en az referenz viruslar kadar spesifik antikor yanıtı tanıyabilme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında Ülkemizde 2013 ve 2020 yılları arasında sirküle olan Kuduz virusu saha örneklerinin Nükleoprotein (N) ve Glikoprotein (G) gen bölgelerinin tüm genom düzeyinde moleküler analizleri yapılarak, Türkiye orijinli Kuduz saha suşlarından farklı hücre hatları kullanarak izolat kazanılması ve kazanılan izolatların aşılانmış hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde Kuduz virusu spesifik antikor varlığını tespit edebilme yeteneklerinin sorgulanması ve referenz virusların nötralizasyon aktiviteleri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Aşağıda tez kapsamında elde edilen sonuç ve öneriler listelenmiştir:

Bu çalışmada 18 adet pozitif Kuduz saha örneği, moleküler teknikler kullanılarak Kuduz Virusu N ve G gen bölgeleri yönünden karakterize edilmiştir. *Cosmopolitan* lineajında yer aldıkları tespit edilen saha suşlarının alt lineaj dağılımı ME2, ME1a, CA2 ve CA1 şeklinde bulunmuştur.

Bu tez kapsamında araştırılan 18 saha örneği çeşitli hayvan türlerinden elde edilmiştir. Sığır (n: 8), tilki (n: 4), köpek (n: 3) , eşek (n: 2) ve porsuk (n: 1) olmak üzere farklı hayvan türlerinin enfekte olduğu ve evcil köpeklerin yanı sıra, çiftlik hayvanlarından özellikle sığırlara tilki aracılı vahşi karnivor kuduzunun bulaştırıldığı dikkat çekici olarak bulunmuştur.

Kuduz virusunun N ve G gen bölgesi tüm genomik olarak araştırılmış olup, söz konusu saha izolatları ve GenBank veri tabanından alınan diğer lineajlara ait sekanslar kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Ayrıca nükleotid dizinleri aminoasit çevrilerek önemli antijenik bölgeler yönünden de analiz edilmiştir.

Viral replikasyon ve genom enkapsidasyonunda görevli N geni I ve III nolu antijenik bölgeler yönünden izolatların kendi aralarında yüksek homoloji sergilemekle birlikte, referenz viruslar ile karşılaştırıldığında bazı değişiklikler olduğu dikkati çekici olarak bulundu. Saha örneklerinde antijenik bölge IV yönünden bir değişim olmadığı ve tüm örnekler için mutasyon bakımından korunaklı bölge olduğu belirlendi.

Viral nörotropizmin ana belirleyicisi ve nötralizan antikor yanıt oluşumundan sorumlu G proteininin III nolu antijenik bölgesindeki R333 nolu aa'ın, tez kapsamında araştırılan tüm saha örneklerinde korunmuş olduğu ve bu suşların patojen oldukları tespit edilmiştir.

Saha suşlarının moleküler karakterizasyon çalışmalarının periyodik olarak yapılması ve sirkülasyondaki virusların çeşitliliğinin ortaya konulması açısından bu verilerin düzenli olarak takip edilmesi gerektiği bilinmektedir. Bu tez çalışması kapsamında *Cosmopolitan* lineajına ait Kuduz viruslarının Ülkemizde varlığı ve yaygınlığı hakkında moleküler kanıtlar elde edilmiş olup, mücadelede kullanılabilecek yerel aşı izolatının kazanımı gerçekleştirilmiştir.

Kuduz virusu izolasyonu çalışmalarında, Murine neuroblastoma hücre hattının, diğer devamlı hücre hatlarına (BHK-21, Vero) oranla daha duyarlı olduğu ve saha izolatlarının kazanımı için kullanımı önerilmektedir.

Doktora tezinin çıktısı olarak 3 saha izolatu kazanılmış olup, bunlardan biri seri pasajlar sonucunda 10^7 DKID₅₀ bir titreye ulaşmış ve FAVN testinde kullanılmak üzere standardize edilmiştir.

Genel olarak değerlendirmeye alındığında bu tez kapsamında kazanılan Kuduz saha izolatının referenz viruslar kadar nötralizan antikorları tanıma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiş olup, söz konusu viruslar nötralizan antikorları tanıma bakımından CVS-11 (%100) > Saha virusu (%98)> PV (%96) şeklinde sıralanmıştır.

Kullanılan aşı suşlarının, FAVN testinde kullanılan viruslardan (Referenz viruslar ve saha izolatı) antijenik farklılıkları antikorların nötralizasyon kinetiğini de etkilemekte olup, bu sebeple yerel saha izolatı ile aşılama sonrası yapılacak serolojik değerlendirmelerin in vivo olarak tekrarlanması önerilmektedir.



ÖZET

Kuduz Virusu Farklı Saha Suşlarının Hücre Kültürü Adaptasyonu ve Nötralizasyon Etkinliklerinin Araştırılması

Kuduz virusu hem insan hem de hayvan sağlığını direkt etkileyen, önemli ve son konakçısının ölümüyle sonuçlanan zoonotik bir enfeksiyöz ajandır. Hastalık Antartika kıtası dışında dünya genelinde bulunmakta olup, yoğunluk Afrika ve Asya kıtalarının çeşitli bölgelerinden yıllık olarak bildirilmektedir. İnsan Kuduz vakalarının hemen hemen çoğu enfekte köpeklerin ısırması sonucu meydana gelmektedir. Bu bağlamda, enfeksiyon zincirinin kırılması adına karnivorların aşılınması hayati öneme sahiptir.

Gerçekleştirilen bu çalışma bir doktora tezi olup; ülkemiz orijinli Kuduz virusuyla enfekte hayvanlardan elde edilen saha suşlarının hücre kültürü adaptasyonlarının sağlanmasını ve izolat kazanımını hedeflemiştir. Elde edilen izolat; sahadan gelen Kuduz antikor pozitif serum örneklerindeki nötralizan antikorları tanıyabilme yeteneği yönünden test edilmiş olup, sonuçların karşılaştırılmasında homolog suşlar yanısıra heterolog referenz suşlar da kullanılmıştır. Ayrıca hücre kültürüne adapte edilen suşların, adaptasyon sonrası kazanabilecekleri olası farklılıklarının tespiti için, hem monoklonal antikorlarla hem de Kuduz virusunun nükleoprotein (N) gen bölgesi yönünden dizin analizi yardımıyla araştırılması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 18 saha örneği, moleküler teknikler kullanılarak karakterize edilmiş olup, 3 adedinin hücre kültüründe üretimleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma sayesinde ülkemiz orijinli Kuduz virusu saha suşlarının kazanımı gerçekleştirilmiş olup, ileride yapılacak aşı çalışmalarında kullanılabilecek izolatların saha serum örneklerinde nötralizasyon aktiviteleri de test edilmiştir. Böylelikle Kuduz enfeksiyonu için yerli aşı üretimine dayalı yeni araştırma projelerine hammadde temini konusunda önemli kazanımlar gerçekleştirilmiş olup, öncül araştırma niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Kuduz, saha suşları, hücre kültürü adaptasyon, nötralizan antikor etkinliği

SUMMARY

Investigation of Cell Culture Adaptation and Neutralization Efficiency of Different Field Strains of Rabies Virus

Rabies virus is a zoonotic infectious agent that directly affects both human and animal health, which is important and resulting in the death of final host. Disease; except the Antarctic continent, is found throughout the world, and the large scale of infection is reported annually from various parts of Africa and Asia. Most of the human rabies cases are caused by the bite of infected dogs. In this context, vaccination of carnivores is of vital importance for breaking the chain of infection.

This study is a doctoral thesis; the aims of this study are to provide the adaptation of cell culture of strains obtained from rabies-infected animals originating from our country and to obtain isolate. The obtained isolate; against the Rabies antibody from the field will be tested for the ability to recognise neutralising antibodies in positive serum samples, the comparison of the results will be used homologous strains as well as heterologous reference strains. Besides, to determine the possible differences of the strains that will be adapted to the cell culture after the adaptation period, we will investigate both the monoclonal antibodies and the rabies virus by using the nucleoprotein (N) gene regions specific primers. In the study, 18 field samples were characterized using molecular techniques, and 3 of them were produced in cell culture.

The results of this study are the preliminary research aiming to gain the isolates that can be used in future vaccination studies from the origin of our country. Thus, significant gains have been made in the supply of raw materials for new research projects based on domestic vaccine production for rabies infection, and it is a preliminary research.

Keywords: Rabies virus, field strains, cell culture adaptation, neutralizing antibody activity

KAYNAKLAR

- ABRAHAM G, RHODES DP, BANERJEE AK. (1975). The 5' terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus. *Cell* **5**, 51–58.
- AGA A, HURİSA B, TESFAYE T, LEMMA H, WOLDEMİCHAEL D, WOLD G, URGAK. (2014). Adaptation of Local Rabies Virus Isolates to High Growth Titer and Determination of Pathogenicity to Develop Canine Vaccine in Ethiopia. *The Open Vaccine Journal*. **5**. 1000245.
- AGA MA, HURİSA B, NİWAYESİLLASİE B, BANKOVİSKY D, LEMMA H, GEBREWOLDE G, URGAK. (2021). Multiplicity of infection and incubation period for fixed rabies virus strains propagation on BHK-21 and Vero cell lines. *Ethiop. j. public health nutr.* **2** (2)
- AGHOMO HO, RUPPRECHT CE. (1990a). Antigenic characterisation of virus isolates from vaccinated dogs dying of rabies. *Trop Anim Health Prod.* **22** (4):275–280. doi: 10.1007/BF02240413
- AGHOMO HO, RUPPRECHT CE. (1990b). Further studies on rabies virus isolated from healthy dogs in Nigeria. *Vet Microbiol.* **22** (1):17–22. doi: 10.1016/0378-1135(90)90120-K
- AİKİMBAYEV A, BRİGGS D, COLTAN G, DODET B, FARAHTAJ F, IMNADZE P, KOREJWO J, MOİSEİEVA A, TORDO N, USLUER G, et al. (2014). Fighting Rabies in Eastern Europe, the Middle East and Central Asia—Experts Call for a Regional Initiative for Rabies Elimination. *Zoonoses Public Health*. **61**, 219–226.
- AJORLOO M, MİRZAEİ H, SADEGHİ Y, TARBAN N, SOLTANİ S, MOHAMMADİ FS, DAVARİNEJAD P, AMİRİ ROUDY M, JAHANTİGH HR, ABOUHAMZEH K, MOHAMMADHOSAYNİ M, RAZAVİ NİKOO H, ALAMDARY A, NOROUZİ Met. (2018). Evaluation and phylogenetic analysis of regular rabies virus vaccine strains. *Arch Iran Med.* **21**(3):101–110
- ALAİFAN T AND ALTAMİMİ A. (2019). A Systematic Review of epidemiology of Rabies in Arab countries. *Journal of Health Informatics in Developing Countries*, **13** (2). <https://www.jhidc.org/index.php/jhidc/article/view/242>
- AL ABAİDANİ I, AL ABRİ S, PRAKASH KP, HUSSAİN MH, HUSSAİN MH, AL RAWAHİ AH. (2015). Epidemiology of rabies in Oman: A retrospective study (1991–2013). *East. Mediterr. Health J.*, **21**, 591–597.
- ALBERTİNİ AA, WERNİMONT AK, MUZİOL T, RAVELLİ RB, CLAPIER CR, SCHOEHN G, WEİSSENHORN W, RUİGROK RW. (2006). Crystal structure of rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*, **313**:360-63
- ALBERTİNİ AA, SCHOEHN G, WEİSSENHORN W, RUİGROK RW. (2008). Structural aspects of rabies virus replication. *Cell Mol Life Sci.* **65**(2):282-94
- ALBERTİNİ A, BRESSANELLI S, LEPAULT J, GUADİN Y. (2011a). Structure and working of viral fusion machinery. *Curr Top Membr.* **68**:49-80.

- ALBERTINI AA, RUIGROJ RW, BLONDEL D. (2011b). Rabies virus transcription and replication. *Adv Virus Res.* **79**:1-22.
- AMENGUAL B, WHITBY JE, KING A, COBO JS, BOURHY H. (1997). Evolution of European bat lyssaviruses. *Journal of General Virology.* **78**: 2319–2328.
- AMARASINGHE GK, BAO Y, BASLER CF, BAVARI S, BEER M, BEJERMAN N, BLASDELL KR, BOCHNOWSKI A, BRIESE T, BUKREYEV A, CALISHER CH, CHANDRAN K, COLLINS PL, DIETZGEN RG, DOLNIK O, DÜRRWALD R, DYE JM, EASTON AJ, EBIHARA H, FANG Q, FORMENTY P, FOUCHIER RAM, GHEDIN E, HARDING RM, HEWSON R, HIGGINS CM, HONG J, HORIE M, JAMES AP, JIANG D, KOBINGER GP, KONDO H, KURATH G, LAMB RA, LEE B, LEROY EM, LI M, MAISNER A, MÜHLBERGER E, NETESOV SV, NOWOTNY N, PATTERSON JL, PAYNE SL, PAWESKA JT, PEARSON MN, RANDALL RE, REVILL PA, RIMA BK, ROTA P, RUBBENSTROTH D, SCHWEMMLE M, SMITHER SJ, SONG Q, STONE DM, TAKADA A, TERREGINO C, TESH RB, TOMONAGA K, TORDO N, TOWNER JS, VASILAKIS N, VOLCHKOV VE, WAHL-JENSEN V, WALKER PJ, WANG B, WANG D, WANG F, WANG LF, WERREN JH, WHITFIELD AE, YAN Z, YE G, KUHN JH. (2017). Taxonomy of the order Mononegavirales: Update 2017. *Arch Virol.* **162**:2493–2504
- ASAYE M. AND GETACHEW N.(2014). Rabies virus proteins and their mechanism of pathogenicity. *Indian J. Drugs.* **2**, 89-95.
- ASSENBERG R, DELMAS O, MORIN B, GRAHAM C, DE LAMBALLERIE X, LAUBERT C, COUTARD B, GRIMES JM, NEYTS J, OWENS RJ, BRANDT BW, GORBALENYA A, TUCKER P, STUART DI, CANARD B, BOURHY H. (2010) Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription. *Antiviral Research*, **87** (2), 149-61
- ASTAWA INM, AGUSTINI NLP, MASA TENAYA IW, ARYAWIGUNA IPGW. (2018). Protective antibody response of Balb/c mice to Bali rabies virus isolate propagated in BHK-21 cells. *J Vet Med Sci.* **80**(10):1596-1603. doi: 10.1292/jvms.17-0385.
- ATICI YT, OĞUZOĞLU TÇ. (2022). The comparison of full G and N gene sequences from turkish rabies virus field strains. *Virus Res.* **315**:198790. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198790.
- AYLAN O, EL-SAYED AFM, FARAHTAJ F, JANANI AR, LUGACH O, TARKHAN-MOURAVI O, USLUER G, VODOPIJA R, VRANJES N, TORDO N, DODET B. (2011). Report of the First Meeting of the Middle East and Eastern Europe Rabies Expert Bureau, Istanbul, Turkey (8–9 June 2010). *Adv. Prev. Med.*, 2011, 1–4.
- BADRANE H, BAHLOUL C, PERRIN P, TORDO N. (2001a). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of Virology*, **75**(7), 3268-3276.
- BADRANE H, TORDO N (2001) Host switching in lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol.* **75**(17):8096–8104
- BAER GM, BRODERSON JR, YAGER PA. (1975). Determination of the site of oral rabies vaccination, *American Journal of Epidemiology.* **101**(2), 160–164.

- BAER GM. (2007). The history of rabies. Rabies. *Academic Press*, 1-22.
- BANNAZADEH BAGHI H, ALINEZHAD F, KUZMIN I, RUPPRECHT CE. (2018). A Perspective on Rabies in the Middle East-Beyond Neglect. *Vet Sci.* 5(3):67
- BANYARD AC, HAYMAN D, JOHNSON N, MCELHINNEY L, FOOKS AR.. (2011). Bats and lyssaviruses. *Advances in Virus Research.* **79**, 239-289.
- BANYARD AC, HAYMAN D, FREULING CM, MÜLLER T, FOOKS AR, JOHNSON N. (2013). Bat rabies. In: Jackson, A.C. (Ed.). Rabies: Scientific Basis of the Disease and its Management. *Academic Press*, New York, USA, pp. 215-265.
- BARECHA CB, GIRZAW F, KANDI RV. PAL M.(2017). Epidemiology and Public Health Significance of Rabies. *Persp. Med. Res.* **5**: 55–67
- BARR JN, WHELAN SP, WERTZ GW. (1997). cis-Acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *J. Virol.* **71**, 8718–8725.
- BARR JN, WERTZ GW. (2001). Polymerase slippage at vesicular stomatitis virus gene junctions to generate poly(A) is regulated by the upstream 3' -AUAC-5' tetranucleotide: implications for the mechanism of transcription termination. *J. Virol.* **75**, 6901–6913.
- BEGEMAN L, GEURTSVANKESSEL C, FINKE S, FREULING CM, KOOPMANS M, MÜLLER T, RUIGROK TJH, KUIKEN T. (2017). Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans. *PLoS Metrics.* **18**: 4, 147-159. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30574-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30574-1)
- BENJATHUMMARAK, S, FA-NGOEN C, PIPATTANABOON C, BOONHA K, RAMASOOTAP & PITAKSAJAKUL P. (2016). Molecular genetic characterization of rabies virus glycoprotein gene sequences from rabid dogs in Bangkok and neighboring provinces in Thailand, 2013–2014. *Archives of Virology*, **161**(5), 1261–1271. doi:10.1007/s00705-016-2789-8
- BENGOUMI M, MANSOURI R, GHAM B, MÉROT J. (2018). Rabies in North Africa and the Middle East: current situation, strategies and outlook. La rage dans les pays d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient : situation actuelle et perspectives. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **37**(2), 497–510.
- BENMANSOUR A, LEBLOIS H, COULON P, TUFFEUREAU C, GUADIN Y, FLAMAND A, LAFAY F. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol.* **65**(8): 4198–203.
- BENSON DA, CLARK K, KARSCH-MIZRACHI I, LIPMAN DJ, OSTELL J, SAYERS EW. (2014). GenBank, *Nucleic Acids Research*, **42**: 32-37.
- BLANCOU J, KIENY MP, LATHE R, LECOCQ JP, PASTORET PP, SOULEBOT JP, DESMETTRE P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, **322**(6077), 373–375. doi:10.1038/322373a0.

- BLASDELL KR, GUZMAN H, WIDEN SG, FIRTH C, WOOD TG, HOLMES EC, TESH RB, VASILAKIS N, WALKER PJ. (2015). Ledantavirus: A proposed new genus in the Rhabdoviridae has a strong ecological association with bats. *Am J Trop Med Hyg.* **92**:405–410.
- BRIGGS DJ, (2011). Immunological Basis for Immunization. Module 17: Rabies. World Health Organization, Geneva, Retrieved from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44517/1/9789241501088_eng.pdf.
- BROOKES SM, PARSONS G, JOHNSON N, MCELHINNEY LM, FOOKS AR. (2005). Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses. *Vaccine.* **14**;23(32):4101–4109. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.03.037
- BROOKES SM, HEALY DM, FOOKS AR. (2006). Ability of rabies vaccine strains to elicit cross-neutralising antibodies. *Dev Biol (Basel).* **125**:185–193.
- BODY MHH, AL-RAWAHÍ A, HUSSAİN MH, AL-HABSI SS, WADİR AA, SARAVANAN N, AHMED SA, RAJAMONY S. (2014). Study on molecular characterization of rabies virus N gene segment from different animal species in the Sultanate of Oman. *J. Vet. Med. Anim. Heal.* **6**, 295–301
- BORIŠOV AV, TOLOKNOV AC, METLIN AE, MIKHALISHIN VV, RYBAKOV SS. (2002). Efficacy and safety testing of the viral vaccine “Sinrab” on the targeted species. Scientific notes of Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine. Vitebsk, Belarus, 38, 15-18.
- BOTVINKIN, AD, POLESCHUK EM, KUZMIN IV, BORISOVA TI, GAZARYAN SV, YAGER P, RUPPRECHT CE. (2003). Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerging Infectious Diseases.* **9**: 1623–1625.
- BOTVINKIN A, KOSENKO M (2004) Rabies in the European Parts of Russia, Belarus and Ukraine. In: King AA, Fooks AR, Aubert M, Wandeler AI, editors. Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin Paris: OIE(World Organisation for Animal Health) pp. 47–60. PMID:18634462
- BOURHY H, KISSI B, TORDO N. (1993). Molecular Diversity of the Lyssavirus Genus. *Virology*, **194**(1), 70–81. doi:10.1006/viro.1993.1236.
- BOURHY H, KISSI B, AUDRY L, SMRECZAK M, SADKOWSKA-TODYS M, KULONEN K, TORDO N, ZMUDZIŃSKI JF, HOLMES EC (1999). Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J Gen Virol.* **80**, 2545-2557
- BOURHY H, REYNES JM, DUNHAM EJ, DACHEUX L, LARROUS F, HUONG VTQ, XU G, YAN J, MIRANDA MEG, HOLMES EC. (2008). The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J Gen Virol.* **89** (Pt 11):2673-2681. doi: 10.1099/vir.0.2008/003913-0.
- ČAČ Ž. (2003). Success of Oral Vaccination of Foxes against Rabies by Evaluation of Their Immune Status. Ph.D. Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia. (In Croatian).

- CALISHER CH, ELLISON JA. (2012). The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel medicine and infectious disease*, **10**(2), 69-79.
- CALVELAGE S, TAMMIRANTA N, NOKIREKI T, GADD T, EGGERBAUER E, ZAECK LM, POTRATZ M, WYLEZICH C, HÖPER D, MÜLLER T, FINKE S VE FREULING CM (2021). Genetic and Antigenetic Characterization of the Novel Kotalahti Bat Lyssavirus (KBLV). *Viruses*, **13**(1), 69. <https://doi.org/10.3390/v13010069>
- CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. **10**, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- CAUNA N. (1980). Fine morphological characteristics and microtopography of the free nerve endings of the human digital skin. *Anat Rec*. **198**: 643-656
- CDC. Centre for Disease Control and Prevention; Animals and Rabies. 2021 January. Available from: <https://www.cdc.gov/rabies/animals/index.html>
- CHAPMAN W, RAMSHAW I, CRICK J. (1973). Inactivated rabies vaccine produced from the Flury LEP strain of virus grown in BHK-21 suspension cells. *Appl Microbiol*. **26** (6): 858-62.
- CHARLTON KM CASEY GA WANDELER AI NADIN-DAVIS S. (1996). Early events in rabies virus infection of the central nervous system in skunks (*Mephitis mephitis*). *Acta Neuropathol*. **91**: 89-98
- CHARLTON KM, NADIN-DAVIS S, CASEY GA, WANDELER AI. (1997). The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at site of exposure. *Acta Neuropathol*. **94**:73-7.
- CICONELLO FN, KATZ I, FERNANDES, ER, GUEDES F, SILVA SR. (2022). A comparative review of serological assays for the detection of rabies virus-specific antibodies. *Acta tropica*, **226**, 106254.
- CLIQUE F, AUBERT M, SAGNÉ L. (1997). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of Immunological Methods*. **212**, 79-87
- CLIQUE F. (2008). Vaccines used for rabies control programmes: types, performance in different species, quality control, storage. In: Exposé' presented at the Workshop on Rabies: Regional Cooperation Towards Eradicating the Oldest Known Zoonotic Disease in Europe, Anatlaya, Turkey. (http://www.fve.org/news/presentations/taix/2008/2008_4_12_vaccines_rabies_fcliquet.pdf.)
- COERTSE J, GROBLER CS, SABETA CT, SEAMARK EC, KEARNEY T, PAWESKA JT, MARKOTTER W. (2020). Lyssaviruses in insectivorous bats, South Africa 2003–2018. *Emerg Infect Dis*. **26**(12), 3056-3060. <https://doi.org/10.3201/eid2612.203592>.
- COETZER A, SABETA CT, MARKOTTER W, RUPPRECHT CE, NEL LH. (2014). Comparison of biotinylated monoclonal and polyclonal antibodies in an evaluation of

a direct rapid immunohistochemical test for the routine diagnosis of rabies in southern Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **8**, e3189

CONTRERAS MA, EASTWOOD G, GUZMAN H, POPOV V, SAVIT C, URIBE S, KRAMER LD, WOOD TG, WIDEN SG, FISH D, TESH RB, VASILAKIS N, WALKER PJ. (2017). Almendravirus: A proposed new genus of rhabdoviruses isolated from mosquitoes in tropical regions of the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* **96**:100–109.

CONTAMINE DAG S. (2008). Sigma rhabdoviruses. *Encyclopedia Virol.* **5**: 576–581.

CONZELMANN KK. (1998). Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* **32**:123–162.

COULON P, TERNAUX JP, FLAMAND A, TUFFEREAU C. (1998). An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motor neurons in vivo and in vitro. *J. Virol.* **72**. 273–278. 10.1128/jvi.72.1.273-278.1998

DANCHO B, MCKENZIE MO, CONNOR JH, LYLES DS (2009). Vesicular stomatitis virus matrix protein mutations that affect association with host membranes and viral nucleokapsids. *J. Biol. Chem.* **284**, 4500-9

DA POIAN AT, CARNEIRO FA, STAUFFER F. (2005). Viral membrane fusion: Is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Braz J Med Biol Res.* **38**:813–823.

DAVID D, HUGHES GJ, YAKOBSON BA, DAVIDSON I, UN H, AYLAN O, KUZMIN IV, RUPPRECHT CE. (2007). Identification of novel canine rabies virus clades in the Middle East and North Africa. *J Gen Virol.* **88**(Pt 3):967-980. doi: 10.1099/vir.0.82352-0. PMID: 17325371.

DAVID D, DVERES N, YAKOBSON B, DAVIDSON I (2009). Emergence of dog rabies in the northern region of Israel. *Epidemiology & Infection.* **137**(4):544-8

DAVIS BM, RALL GF, & SCHNELL MJ. (2015). Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annual review of virology*, **2**(1), 451–471. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055157>

DEAN DJ, ABELSETH MK. (1973). Laboratory techniques in rabies: the fluorescent antibody test, Monograph Series. World Health Organisation **3**(1): 93-6

DEAN DJ, ABELSETH MK, ATANASIU P. (1996). The fluorescent antibody test. In: Laboratory Techniques in Rabies. (FX Meslin, MM Kaplan, H Koprowski, editos). World Health Organization, Geneva. Pp 88-95

DECHANT G, AND BARDE YA. (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): Novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.* **5**:1131–1136.

DE MELO GD, PARIZE P, JOUVION G, DACHEUX L, CHRÉTIEN F, BOURHY H. (2020). Infections of the Central Nervous System - Chapter 13: Rabies. Fabrice Chrétien. Infections of the Central Nervous System: Pathology and Genetics, Wiley, 978-1-119-46774-8 (ebook). (10.1002/9781119467748.ch13)

- DELMAS O, HOLMES EC, TALBÍ C, LARROUS F, DACHEUX L, BOUCHIER C, BOURHY H (2008). Genomic Diversity and Evolution of the Lyssaviruses. *PLoS ONE* **3**(4):e2057
- DENDUANGBORIPANT J, WACHARAPLUESADEE S, LUMLERTDACHA B, RUANKAEW N, HOONSUWAN W, PUANGHAT A, HEMACHUDHA T. (2005). Transmission dynamics of rabies virus in Thailand: implications for disease control. *BMC Infect Dis*; **5**:52.
- DE-SERRES G, DALLAIRE F, CÔTE M AND SKOWRONSKI DM. (2008): Bat rabies in the United States and Canada from 1950 through 2007: Human cases with and without bat contact. *Clin. Infect. Dis.*, **46**: 1329-1337.
- DIETZGEN RG, CALISHER CH, KURATH G, KUZMIN IV, RODRIGUEZ LL, STONE DM (2012). Family rhabdoviridae. In: KING AMQ, ADAMS MJ, CARSTENS EB, LEFKOWITZ EJ (Eds.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, USA, pp. 686–714
- DIETZSCHOLD B, FABER M, SCHNELL M. (2003). New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert Rev. Vaccines*. **2**, 89-96
- DIETZSCHOLD B, GORE M, CASALI P, Ueki Y, RUPPRECHT CE, NOTKINS AL, KOPROWSKI H (1990). Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus. *J Virol*. **64**(6):3087–3090.
- DIETZSCHOLD B, WUNNER WH, WIKTOR TJ, LOPES AD, LAFON M, SMITH CL AND KOPROWSKI H (1983) Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 70–74.
- DOORNEKAMP L, EMBREGTS CWE, ARON GI, GOEIJENBIER S, VAN DE VIJVER DAMC, VAN GORP ECM, GEURTSVANKESSEL CH. (2020) Dried blood spot cards: A reliable sampling method to detect human antibodies against rabies virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **14**(10): e0008784.
- DOYMAZ MZ. (2000). *Medikal Viroloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri.
- DRAKE RL, VOGL WA, MITCHELL AW. (2015). The body. In: Drake RL, Vogl WA, Mitchell AW, eds. *Gray's anatomy for students*. 3rd edn., Philadelphia, PA: Elsevier 1-50.
- DIETZSCHOLD B, LI J, FABER M, SCHNELL M.(2008). Concepts in pathogenesis of rabies. *Fut. Virol.***3**, 481-490.
- DRINGS A, JALLET C, CHAMBERT B, TORDO N, PERRIN P (1999). Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine*, **17**:1549-57
- ERTL HCJ. (2018). Human immune responses to traditional and novel rabies vaccines. *Rev. Sci. Tech.* **37**(2), 649-656.

- ESTERHUYSEN JJ, PREHAUD C, THOMSON GR. (1995). A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J Virological Methods*. **51**(1):31–42
- ETESSAMI R, CONZELMANN KK, FADAÏ-GHOTBI B, NATELSON B, TSIANG H, CECCALDI PE. (2000). Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: an in vitro and in vivo study. *J. Gen. Virol.* **81**: 2147–53.
- EVANS JS, HORTON DL, EASTON AJ, FOOKS AR, BANYARD AC (2012) Rabies virus vaccines: is there a need for a pan-lyssavirus vaccine? *Vaccine*, **30**: 7447–54.
- FENG Y, LIU Y, WANG Y, GONG W, HE B, GUO H, TU C. (2019). Laboratory Training on Rabies. https://rr-asia.oie.int/wp-content/uploads/2020/10/201016_malaysia-training.pdf
- FENJE P. (1960). Propagation of rabies virus in cultures of hamster cells. *Can J Microbiol*; **6**:479–84
- FERNANDO BG, YERSIN CT, JOSÉ CB, PAOLA ZS. (2016). "Predicted 3D Model of the Rabies Virus Glycoprotein Trimer", *BioMed Research International*, vol. , Article ID 1674580, 11 pages, <https://doi.org/10.1155/2016/1674580>
- FİNKE S AND CONZELMANN KK. (2005) Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* **111**, 120 – 131.
- FREY HR, LIESS B. (1971). Vermehrungskinetik und Verwendbarkeit eines stark zytopathogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische Untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, **18**(1), 61-71.
- FODOR I, GRABKO VI, KHOZINSKI VV, SELIMOV MA. (1994). Nucleotide and deduced amino acid sequences of glycoprotein gene of rabies virus vaccine strain Vnukovo-32. *Arch. Virol.* **135**, 451-459.
- FOOKS AR, BANYARD AC, HORTON DL, JOHNSON N, MCELHINNEY LM, & JACKSON AC. (2014). Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet* (London, England), **384**(9951), 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62707-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62707-5)
- FREULING CM, BEER M, CONRATHS FJ, FİNKE S, HOFFMANN B, KELLER B, KLIENT J, METTENLEITER TC, MÜHLBACH E, TEIFKE JP, WOHLSEIN P, MÜLLER, T. (2011). Novel lyssavirus in Natterer's bat, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. **17**(8):1519–22. doi: 10.3201/eid1708.110201 PMID: 21801640
- FREULING CM, HAMPSON K, SELHORST T, SCHRODER R, MESLIN FX, METTENLEITER TC, MÜLLER T. (2013). The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. *Phil Trans R Soc B*. **368**:20120142
- FRY T, VANDALEN K, DUNCAN C, VERCAUTEREN K. (2013). The safety of ONRAB (R) in select non-target wildlife. *Vaccine*. **31**. 10.1016/j.vaccine.2013.06.069.
- GAO F. (2018). From “A”IV to “Z”IKV: Attacks from emerging and re-emerging pathogens. *Cell*. **8**;172(6):1157–1159. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.025

- GARG SR. (2014). Rabies in Man and Animals. 1st ed. Haryana: Springer.
- GAUDIN Y. (2000). Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J. Cell. Biol.* **150**, 601 – 612.
- GERARD FC, RIBEIRO EDE JR. A, LEYRAT C, IVANOV I, BLONDEL D, LONGHI S, RUIGROK RW, JAMIN M (2009). Modular organization of rabies virus phosphoprotein. *J. Mol. Biol.* **388**, 978-996
- GRDZELISHVILLI VZ, SMALLWOOD S, TOWER D, HALL RL, HUNT DM, MOYER SA (2005). A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral m RNA cap methylation. *J. Virol.* **79**, 7327-7337
- GRUZDEV KN, NEDOSEKOV VV. (2001). Rabies of Animals. Moscow, Akvarium, p. 57.
- GOTO H, MINAMOTO N, ITO H, LUO TR, SUGIYAMA M, KINJO T AND KAWAI A. (1995). Expression of the nucleoprotein of rabies virus in Escherichia coli and mapping of antigenic sites. *Arch. Virol.* **140**: 1061–1074
- GOTO H, MINAMOTO N, HIROSHI I, ITO N, SUGIYAMA M, KINJO T, KAWAI A. (2000). Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *The Journal of general virology.* **81**. 119-27. 10.1099/0022-1317-81-1-119.
- GOULD AR, HYATT AD, LUNT R, KATTENBELT JA, HENGSTBERGER S, BLACKSELL SD. (1998). Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pterid bats in Australia. *Virus Res.* **54**(2):165-87.
- HALL TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- HANLON CA, KUZMIN IV, BLANTON JD, WELDON WC, MANANGAN JS, RUPPRECHT CE. (2005). Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.* **111**, 44–54.
- HAYMAN DTS, FOOKS AR, MARSTON DA, GARCIA-R JC (2016) The Global Phylogeography of Lyssaviruses - Challenging the 'Out of Africa' Hypothesis. *PLoS Negl Trop Dis.* **10**(12): e0005266. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005266>
- HAZAR S, YARKIN F, AKAN E (2000). Kuduz ve Önemi. *Flora.* **5**(3): 159-167
- HEINRICH BS, CURETON DK, RAHMEH AA, WHELAN SPJ. (2010). Protein Expression Redirects Vesicular Stomatitis Virus RNA Synthesis to Cytoplasmic Inclusions. *PLoS Pathog.* **6**(6): e1000958.
- HERCYK N, HORIKAMI SM, MOYER SA. (1988). The vesicular stomatitis virus L protein possesses the mRNA methyltransferase activities. *Virology.* **163**, 222–225.
- HORIE M, AKASHI H, KAWATA M, TOMONAGA K. (2020). Identification of a reptile lyssavirus in Anolis allogus provided novel insights into lyssavirus evolution. *Virus Genes.* **57**, 40–49. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01803-y>

- HORIYA M, POSADAS-HERRERA G, TAKAYAMA-ITO M, YAMAGUCHI Y, IIZUKA-SHIOTA I, KATO H, OKAMOTO A, SAJO M, LIM CK. (2022). Genetic Characterization of Human Rabies Vaccine Strain in Japan and Rabies Viruses Related to Vaccine Development from 1940s to 1980s. *Viruses*, **14**, 2152. <https://doi.org/10.3390/v14102152>
- HORTON DL, BANYARD AC, MARSTON DA, WISE E, SELDEN D, NUNEZ A, HICKS D, LEMBO T, CLEVELAND S, PEEL AJ, KUZMIN IV, RUPPRECHT CE, FOOKS AR. (2014). Antigenic and genetic characterization of a divergent African virus, Ikoma lyssavirus. *J Gen Virol*. **95**(Pt 5):1025-1032.
- HORTON DL, MCELHINNEY LM, FREULING CM, MARSTON DA, BANYARD AC, GOHARRIZ H, et al. (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>
- HOSSEINI HEYDARABADI F, BAESSI K, BASHAR R, FAZELI M, SHEIKHOLESAMI F (2020). A phylogenetic study of new rabies virus strains in different regions of Iran. *Virus Genes* **56**, 361–368 <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01752-6>
- HUANG J, ZHANG Y, HUANG Y, GNANADURAI CW, ZHOU M., ZHAO L, FU ZF. (2017). The ectodomain of rabies virus glycoprotein determines dendritic cell activation. *Antiviral Res*. **141** 1–6. [10.1016/j.antiviral.2017.01.022](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.01.022)
- HURISAA B, MENGESHAA A, NEWAYESILASSIEA B, KERGAA S, KEBEDEA G, BANKOVISKYB D, METLINC A, URGAA K. (2013). Production of cell culture based anti- rabies vaccine in Ethiopia. *Procedia Vaccinol*. **7**: 2–7. doi: [10.1016/j.provac.2013.06.002](https://doi.org/10.1016/j.provac.2013.06.002)
- ITO N, KAKEMIZU M, ITO K, YAMAMOTO A, YOSHIDA Y, SUGIYAMA M, MINAMOTO N. (2001). A comparison of complete sequences of the attenuated RC-HL strain of rabies virus used for production of animal vaccine in Japan, and the parental Nishigahara strain. *Microbiol. Immunol*. **45**, 51-58.
- IVANOV I, CREPIN T, JAMIN M AND RUGROK RW. (2010). Structure of the dimerization domain of the rabies virus phosphoprotein. *J. Virol*. **84**: 3707–3710.
- IVANOV I, YABUKARSKI F, RUGROK RWH, JAMIN M. (2011). Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex. *Virus Research*, **162**(1-2), 126–137. doi:[10.1016/j.virusres.2011.09.02](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.02)
- JACKSON AC. (2002). Pathogenesis. In “Rabies” (A. C. Jackson and W. H. Wunner, eds.), *Academic Press*, San Diego. 245–282.
- JACKSON AC, RANDLE E, LAWRENCE G, ROSSITER JP. (2008). Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. *J. Neurovirol*. **14**: 368–75
- JACOB Y, REAL E AND TORDO N. (2001). Functional interaction map of lyssavirus phosphoprotein: Identification of the minimal transcription domains. *J. Virol*. **75**: 9613–9622.

- JAISWAL R, CHHABRA M, SINGH P, GUPTA, N, SINGHAİ M, DHARIWAL AC, TRİPATHİ P. (2018). Molecular Epidemiology and Sequence Analysis of Rabies Virus Isolates from North and North East India. *J. Commun. Dis*, **50**(4), 4.
- JOHNSON N, BLACK C, SMİTH J, UN H, MCELHİNNY L.M, AYLAN O, FOOKS AR (2003). Rabies emergence among foxes in Turkey. *Journal of Wildlife Diseases*, **9**: 1623-1625
- JOHNSON N, BROOKES SM, FOOKS AR, ROSS RS. (2005). Review of human rabies cases in the UK and in Germany. *Vet Rec*. **157**(22):715
- JOHNSON N, UN H, VOS A, AYLAN O, FOOKS AR (2006). Wildlife rabies in western Turkey: The spread of rabies through the western provinces of Turkey. *Epidemiology and Infection*, **134**: 369-375
- JOHNSON N, CUNNINGHAM AF, FOOKS AR. (2010a). The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*, **28**(23), 3896-3901
- JOHNSON N, UN H, FOOKS AR, FREULİNG C, MÜLLER T, AYLAN O, VOS A (2010c). Rabies epidemiology and control in Turkey: Past and Present. *Epidemiology and Infection*.**138**,305-312
- JOHNSON N, VOS A, FREULİNG C, TORDO N, FOOKS A, MÜLLER T. (2010b). Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Veterinary microbiology*.; **142**(3-4):151-9
- JOHNSON N, FOOKS AR, FREULİNG C, MÜLLER T, KLIEMT A, UN H, AYLAN O, UNAL N, ESKİİZMİRLİLER S, AKKOCA N, VOS A (2013). The Role of Phylogeography in the Control of Wildlife Rabies in Turkey “In Introduction to Sequence and Genome Analysis III, *iConcept Press Ltd.*, ISBN: 978-1-922227-09-6” p:279.
- JOHNSON N, ARÉCHİGA-CEBALLOS N, AGUİLAR-SETİEN A (2014) Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses*. **6**:1911–1928
- JUNTRAKUL S, RUANGVEJVORACHAI P, SHUANGSHOTİ S, WACHARAPLUESADEE S, AND HEMACHUDHA T. (2005). Mechanisms of escape phenomenon of spinal cord and brainstem in human rabies. *BMC Infect. Dis*. **5**:104.
- KALLEL H, ROUROU S, MAJOUL S, LOUKİL H. (2003). A novel process for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-l bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **61**: 441–446. doi: 10.1007/s00253-003-1245-3
- KÄRBER G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol*. **162**,480
- KASSİRİ H, EBRAHİMİ A, LOTFİ M. (2018). Animal Bites: Epidemiological Considerations in the East of Ahvaz County, Southwestern Iran (2011 - 2013), *Arch Clin Infect Dis*. **13**(5):e62384.

- KAUR M, GARG R, SINGH S, BHATNAGAR R. (2015). Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading? *Expert Rev Vaccines*. **(3)**:369–381.
- KIENY MP, LATHE R, DRILLIEN R, SPEHNER D, SKORY S, SCHMITT D, WIKTOR, T, KOPROWSKI H, LECOCQ, JP. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*. **312**:163–166.
- KING AA, FOOKS AR, AUBERT M, WANDELER AI. (2004). Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin. AI Wandeler World Organization for Animal Health (OIE); Paris, France:
- KISSI B, TORDO N, BOURHY H (1995). Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*. **209**, 526-537
- KNOBEL DL, CLEAVELAND S, FÈVRE EM AND MELTZER MI. (2005): Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. WHO*, **83**:360–368.
- KONDO H, MAEDA T, SHIRAKO Y, TAMADA T (2006). Orchid fleck virus a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *J. Gen. Virol.* **87**, 2413-2421
- KOPALIANI N, SHAKARASHVILI M, GURIELIDZE Z, QURKHULI T, TARKHNIISHVILI D. (2014). Gene Flow between Wolf and Shepherd Dog Populations in Georgia (Caucasus). *Journal of Heredity*. **105**: 345–353. pmid:24622972
- Kuduz Profilaksi Rehberi (2019). T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı Ankara. ISBN: 978-975-590-728-4
- KUHN JH, BEKAL S, CAI Y, CLAWSON AN, DOMIER LL, HERREL M, JAHRLING PB, KONDO H, LAMBERT KN, MIHINDUKULASURIYA KA, NOWOTNY N, RADOSHITZKY SR, SCHNEIDER U, STAEHEL P, SUZUKI N, TESH RB, WANG D, WANG LF, DIETZGEN RG. (2013). Nyamiviridae: Proposal for a new family in the order Mononegavirales. *Arch Virol*. **158**:2209–2226.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. **33**(7):1870–1874
- KUZMIN IV, NOVELLA IS, DIETZGEN RG, PADHI A, RUPPRECHT CE. (2009). The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, **9**(4), 541-553.
- KUZMIN IV, BOZICK B, GUAGLIARDO SA, KUNKEL R, SHAK JR, TONG S AND RUPPRECHT CE. (2011): Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerging health threats J.*, **4**: 1-21.
- KUZMINA NA, KUZMIN IV, ELLISON JA, TAYLOR ST, BERGMAN DL, DEW B, RUPPRECHT CE. (2013a). A reassessment of the evolutionary timescale of bat rabies viruses based upon glycoprotein gene sequences. *Virus Gen*. **47**, 305-310. Doi: 10.1007/s11262-013-0952-9.

- KUZMĪNA NA, KUZMĪN IV, ELLĪSON JA, RUPPRECHT CE (2013b) Conservation of Binding Epitopes for Monoclonal Antibodies on the Rabies Virus Glycoprotein. *J Antivir Antiretrovir* **5**: 037-043. doi:10.4172/jaa.1000061
- KUZMĪN IV, HUGHES GJ, BOTVĪNKĪN AD, ORCĪARĪ LA, RUPPRECHT CE (2005). Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for Lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* **111**:28-43
- LACKAY SN, KUANG Y AND FU ZF. (2008): Rabies in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **38**: 851- 861
- LAFON M, WĪKTOR TJ, MACFARLAN RI. (1983). Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* **64** (Pt 4):843-51. doi: 10.1099/0022-1317-64-4-843. PMID: 6834008.
- LAFON M, IDELER J AND WUNNER WH. (1984). Investigation of the antigenic structure of rabies virus glycoprotein by monoclonal antibodies. *Dev. Biol. Stand.* **57**, 219–225.
- LAFON M. (2005). Rabies virus receptors. *J. Neurovirol.* **11**:82–87.
- LAHAYE X, VIDY A, POMĪER C, OBĪANG L, HARPER F, GAUDĪN Y, BLONDEL D. (2009). Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol.* **83**(16):7948–7958.
- LAMB RA. (2013). Mononegavirales. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*, 6th ed, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. (pp. 1357-1361)
- LARGHĪ OP, NEBEL AE, LAZARO L, SAVY VL. (1975). Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylaminoethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples. *J Clin Microbiol.* **1**:243-5.
- LE BLANC I, LUYET PP, PONS V, FERGUSON C, EMANS N, PETĪOT A, MAYRAN N, DEMAUREX N, FAURÉ J, SADOUL R, PARTON, R. G., & GRUENBERG, J. . (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat. Cell Biol.* **7**: 653–64.
- LEMBO T, NĪEZGODA M, VELASCO-VĪLLA A, CLEAVELAND S, ERNEST E, RUPPRECHT CE. (2006). Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerging infectious diseases.* **12**(2):310–3.
- LENTZ TL, BURRAGE TG, SMĪTH AL, CRĪCK J, TĪGNOR GH (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science.* **215**,182-184
- LEONOVA GN, SOMOVA LM, BELĪKOV SI, KONDRATOV IG, PLEKHOVA NG, KRYLOVA NV, PAVLENKO EV, TĪUNOV MP, TKACHEV SE. (2013). The Fatal Case of Lyssavirus Encephalitis in the Russian Far East. *Encephalitis. IntechOpen* DOI: 10.5772/52869. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/41737>
- LEUNG AK, DAVĪES HD, HON KL. (2007). Rabies: Epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis. *Adv Ther.* **24**:1340–1347.

- LǪ J, WANG JT, WHELAN SP (2006). A unique strategy for m RNA cap methylation used by vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8493-8498
- LǪ C, WANG Y, LǪU H, ZHANG X, BAOLǪGE D, ZHAO S, HU W AND YANG Y (2021) Change in the Single Amino Acid Site 83 in Rabies Virus Glycoprotein Enhances the BBB Permeability and Reduces Viral Pathogenicity. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**:632957. doi: 10.3389/fcell.2020.632957
- LǪU Y, ZHANG S, ZHANG F. HU R. (2012). Adaptation of a Chinese ferret badger strain of rabies virus to high-titered growth in BHK-21 cells for canine vaccine development. *Arch Virol* **157**, 2397–2403.
- LOJKIĆ I, ŠIMIĆ I, BEDEKOVIĆ T, KREŠIĆ N. (2021). Current Status of Rabies and Its Eradication in Eastern and Southeastern Europe. *Pathogens*, **10** (6), 742. doi:10.3390/pathogens10060742
- LUO J, ZHANG B, WU Y, GUO X. (2020). Amino Acid Mutation in Position 349 of Glycoprotein Affect the Pathogenicity of Rabies Virus. *Frontiers in Microbiology*. **11**:481. doi: 10.3389/fmicb.2020.00481
- LYLES DS, KUZMĪN IV, RUPPRECHT CE. (2013). Rhabdoviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Field Virology*, 6th edition. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 885-922.
- MA X, MONROE BP, CLEATON JM, ORCIARI LA, GIGANTE CM., KIRBY JD, CHIPMAN RB. FEHLNER-GARDINER C, CEDILLO VG, PETERSEN BW, OLSON V, AND WALLACE RM. (2020). Public Veterinary Medicine: Public Health: Rabies surveillance in the United States during 2018. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **256**:2, 195-208
- MACINNES CD. SMITH SM, TINLINE RR, AYERS NR, BACHMANN P, BALL DG, CALDER LA, CROSGREY SJ, FIELDING C, HAUSCHILDT P, HONIG JM, JOHNSTON DH, LAWSON KF, NUNAN CP, PEDDE MA, POND B, STEWART RB, VOIGT DR. (2001). Elimination of rabies from red foxes in eastern Ontario. *J. Wildl. Dis.* **37**, 119–132.
- MADHUSUDANA SN, SUBHA S, THANKAPPAN U, ASHWIN YB. (2012). Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Viol. Sin.*, **27**, 299–302
- MADHUSUDANA SN, SUNDARAMOORTHY S, ULLAS PT. (2010). Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. *Int J Infect Dis.* **14**(12):e1067-71. doi: 10.1016/j.ijid.2010.07.004. Epub 2010 Oct 13. PMID: 20947403
- MANĪE SN, DE BREYNE S, VINCENT S, GERLIĒR D (2000). Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J. Virol*, **74**, 305-311
- MASATANĪ T, ITO N, SHIMIZU K, ITO Y, NAKAGAWA K, ABE M, YAMAOKA S, SUGIYAMA M. (2011). Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus

- nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity. *Virus Res.* **155**, 168–174.
- 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**, 4002–4012.
- MASATANI T, ITO N, ITO Y, NAKAGAWA K, ABE M, YAMAOKA S, OKADERA K, SUGIYAMA M. (2013). Importance of rabies virus nucleoprotein in viral evasion of interferon response in the brain. *Microbiol. Immunol.* **57**, 511–517.
- MAIER T, SCHWARTING A, MAUER D, ROSS RS, MARTENS A, KLIEB V, WAHL J, PANNING M, BAUMGARTE S, MÜLLER T, PFEFFERLE S, EBEL H, SCHMIDT J, TENNER-RACZ K, RACZ P, SCHMID M, STRÜBER M, WOLTERS B, GOTTHARDT D, BITZ F, FRISCH L, PFEIFFER N, FICKENSCHER H, SAUER P, RUPPRECHT CE, ROGGENDORF M, HAVERICH A, GALLE P, HOYER J, DROSTEN C. (2010). Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantation from a donor infected with rabies virus. *Clinical Infectious Diseases*, **50**(8):1112–1119
- MAILLARD A, GAUDIN Y. (2002). Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *J Gen Virol.* **83**:1465e76
- MAKI J, GUIOT AL, AUBERT M, BROCHIER B, CLIQUE F, HANLON CA, KING R, OERTLI EH, RUPPRECHT CE, SCHUMACHER C, SLATE D, YAKOBSON B, WOHLERS A, LANKAU EW. (2017). Oral vaccination of wildlife using a vaccinia–rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG®): a global review. *Vet Res* **48**, 57
- MANNING SE, RUPPRECHT CE, FISHBEIN D, HANLON CA, LUMBERTDACHA B, GUERRA M, HULL HF. (2008). Human rabies prevention—United States, 2008: recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Recomm. Rep.* **57** (RR-3), 1-28.
- MARIA T, BUONAVOGHIA C, TRANI L AND VIGNOLO E. (1988). Sensitivity of Different Cell Lines for Rabies Virus Isolation. *Zoonosis and Public Health*, **35**(1): 504-508
- MARISSEN WE, KRAMER RA, RICE A, WELDON WC, NIEZGODA M, FABER M, SLOOTSTRA JW, MELOEN RH, CLIJSTERS-VAN DER HORST M, VISSER TJ, JONGENELEN M, THIJSE S, THROSBY M, DE KUIF J, RUPPRECHT CE, DIETZSCHOLD B, GOUDSMIT J, BAKKER AB. (2005) Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis. *J Virol.* **79**: 4672-4678
- MARSTON DA, MCELHINNEY LM, JOHNSON N, MULLER T, CONZELMANN KK, TORDO N, FOOKS AR (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. *J Gen Virol.* **88**:1302-1314

- MARSTON DA, ELLIS RJ, HORTON DL, KUZMIN IV, WISE EL, MCELHINNEY LM, BANYARD AC, NGELEJA C, KEYYU J, CLEAVELAND S, LEMBO T, RUPPRECHT CE, FOOKS AR (2012a). Complete genome sequence of Ikoma lyssavirus. *Journal of Virology*. 86(18):10242–3. doi: 10.1128/JVI.01628-12 PMID: 22923801
- MARSTON DA, HORTON DL, NGELEJA C, HAMPSON K, MCELHINNEY LM, BANYARD AC, HAYDON D, CLEAVELAND S, RUPPRECHT CE, BIGAMBO M, FOOKS AR, LEMBO T. (2012b) Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. *Emerg Infect Dis*. **18**(4):664-7.
- MARSTON DA, ELLIS RJ, WISE EL, ARE'CHIGA-CEBALLOS N, FREULING CM, BANYARD AC, MCELHINNEY LM, DE LAMBALLERIE X, MÜLLER T, FOOKS AR, ECHEVARRIA JE (2017a). Complete genomic sequence of Lleida bat lyssavirus. *Genome Announcements*. 5(2):e01427–16.
- MARSTON DA, HORTON DL, NUNEZ J, ELLIS RJ, ORTON RJ, JOHNSON N, BANYARD AC, MCELHINNEY LM, FREULING CM, FIRAT M, ÜNAL N, MÜLLER T, DE LAMBALLERIE X, FOOKS AR. (2017b). Genetic analysis of a rabies virus host shift event reveals within-host viral dynamics in a new host. *Virus evolution*, **3**(2), vex038. <https://doi.org/10.1093/ve/veX038>.
- MATTER H, BLANCOU J, BENELMOUFFOK A, HAMMAMI S, FASSI-FEHRİ N. (2004). Rabies in North Africa and Malta. Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin; World Organisation for Animal Health and World Health Organization: Paris, France; Geneva, Switzerland, pp. 185–199.
- MEBATSION T, WEILAND F, CONZELMANN KK (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**, 242-250
- MEMISH ZA, ASSIRI AM, GAUTRET P. (2015). Rabies in Saudi Arabia: A need for epidemiological data. *Int. J. Infect. Dis.*, **34**, e99–e101.
- MESLIN FX, KAPLAN MM, KOPROWSKI H. (Eds.). (1996). Laboratory techniques in rabies. 4th.Ed. (pp. 157-174). Geneva: World Health Organization.
- MIFUNE K, TAKEUCHI E, NAPIORKOWSKI PA, YAMADA A, SAKAMOTO K. (1981). Essential Role of T cells in the postexposure prophylaxis of rabies in mice. *Microbiology and immunology*, **25**(9), 895–904
- MINAMOTO N, TANAKA H, HOSHIDA M, GOTO H, ITO H, NARUSE S, YAMAMOTO K, SUGIYAMA M, KINJO T, MANNEN K & MIFUNE K. (1994). Linear and conformation-dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus. *Microbiology and Immunology*. **38**, 449-455
- MING P, DUA J, TANGA Q, YANB J, NADIN-DAVIS SA, LI H, TAOA X, HUANGD Y, HUD R, LIANGE G. (2009). Molecular characterization of the complete genome of a street rabies virus isolated in China. *Virus Res*.**143**:6–14. doi: 10.1016/j.virusres.2009.02.014.
- MITRABHAKDI E, SHUANGSHOTI S, WANNAKRAIROT P, LEWIS RA, SUSUKI K, LAOTHAMATAS J, HEMACHUDHA T. (2005). Difference in neuropathogenetic

- mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J Neurol Sci.* **15**;238(1-2):3-10. doi: 10.1016/j.jns.2005.05.004.
- MÜLLER T, FREULING CM, WYSOCKI P, ROUMIANTZEFF M, FRENEY J, METTENLEITER TC, VOS A. (2015). Terrestrial rabies control in the European Union: Historical achievements and challenges ahead. *The Veterinary Journal.* **203** (1),10-17.
- MUMFORD JA. (2007). Vaccines and viral antigenic diversity. *Revue Scientifique et Technique. International Office of Epizootics.* **26**(1):69–90.
- MURPHY FA BAUER SP HARRISON AK WINN JR, WC. (1973). Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses. Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. *Lab Invest.* **28**: 361-376
- MURPHY FA, PAUL E, GIBBS J, HORZINEK MC, VE STUDDERT MJ. (1999). Veterinary Virology. 3rd edition. USA: Academic Press; Chapter 27;429-445. ISBN: 9780080552033
- MOCHIZUKI N, KOBAYASHI Y, SATO G, HIRANO S, ITOU T, ITO FH, SAKAI T. (2011). Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *The Journal of veterinary medical science*, **73**(6), 759–766. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0238>
- MOORE SM, RICHE TA, DAVIS RD, BRIGGS DJ. (2005). The influence of homologous vs. heterologous challenge virus strains on the serological test results of rabies virus neutralizing assays. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, **33**(4), 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.06.005>
- MORIMOTO K, HOOPER DG, SPITSIN S, KOPROWSKI H, DIETZSCHOLD B. (1999). Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J. Virol.* **73**, 510-518.
- MOYER SA, BANERJEE AK. (1975). Messenger RNA species synthesized in vitro by the virion-associated RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Cell.* **4**, 37–43.
- NADIN-DAVIS, SUSAN A. (2020). *Rabies || Molecular epidemiology* Anthony R. Fooks, Alan C. Jackson, *Rabies (Fourth Edition)*, Academic Press, 143–193. doi:10.1016/B978-0-12-818705-0.00005-4
- NAGARAJA T, MADHUSUDANA S AND DESAI A. (2018). Molecular characterization of the full-length genome of a rabies virus isolate from India. *Virus Genes*, **36**(3): 449-459.
- NAKANE PK, PIERCE GB JR. (1966). Enzyme-Labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem.* **14**:929-31.
- NANDI S, KUMAR M. (2011). Global perspective of rabies and rabies related viruses: a comprehensive review. *Asian J. Anim. Vet. Adv*, **6**, 101-16.

- NEGRÌ A. (1903) Contributo allo studio delleziologia della rabia. *Bol. Soc. Med. Chir. Pavia*, 88 – 114
- NEL LH, RUPPRECHT CE. (2007). Emergence of lyssaviruses in the Old World: the case of Africa. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.**315**:161–93. PMID: 17848065
- NĪTATPATTANA N, PRĪMSĪRĪKUNAWUT A, BUREE S, CHUAPUDEE D, RODPAĪ E, CHAĪYO K, CHANSĪPRASERT K, NAKGOĪ K, POOLAM K, LUKEBUO A, SANGKĪTPORN S,MANDJA BM, GONZALEZ JP (2020) Selection of a Rabies Virus Strain as a New Candidate for Vaccine Development in Thailand. *J Vaccines Res Vaccin*, **6**: 015.
- NĪTSCHER S, ZAECK LM, POTRATZ M, NOLDEN T, TE KAMP V, FRANZKE K, HÖPER D, PFAFF F, FİNKE S. (2021). Point Mutations in the Glycoprotein Ectodomain of Field Rabies Viruses Mediate Cell Culture Adaptation through Improved Virus Release in a Host Cell Dependent and Independent Manner. *Viruses*. **3**;13(10):1989. doi: 10.3390/v13101989.
- NOLDEN T, BANYARD AC, FİNKE S, FOOKS AR, HANKE D, HÖPER D, HORTON DL, METTENLEİTER TC, MÜLLER T, TEİFKE JP, FREULİNG CM. (2014). Comparative studies on the genetic, antigenic and pathogenic characteristics of Bokeloh bat lyssavirus. *J Gen Virol*. **95**(Pt 8):1647–1653.
- NOLDEN T, PFAFF F, NEMİTZ S, FREULİNG CM, HOPER D, MULLER T, FİNKE S. (2016). Reverse genetics in high throughput: Rapid generation of complete negative strand RNA virus cDNA clones and recombinant viruses thereof. *Sci. Rep*. **6**:23887. doi: 10.1038/srep23887/
- OBERHUBER M, SCHOPF A, HENNRİCH AA, SANTOS-MANDUJANO R, HUHNG AG, SEİTZ S, RİEDEL C, CONZELMANN K-K. (2021). Glycoproteins of Predicted Amphibian and Reptile Lyssaviruses Can Mediate Infection of Mammalian and Reptile Cells. *Viruses*.**13**(9):1726. <https://doi.org/10.3390/v13091726>
- OBONYO M, AKOKO JM, ORİNDE AB, OSORO E, BORU WG, NJERU I, FÈVRE EM. (2016). Suspected Rabies in Humans and Animals, Laikipia County, Kenya. *Emerging infectious diseases*, **22**(3), 551–553.
- OGİNO T, KOBAYASHİ M, IWAMA M, MİZUMOTO K (2005). Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific m RNA. *J.Biol. Chem*. **280**, 4429-4435
- OGUNKOYA AB. (2007). Clinical rabies in animal and man. In: Rabies-Basic Concepts, Problems and Prospects of its Control in Nigeria, Oreofe Publishers Nigeria, Limited. Pp. 24-38.
- OIE, (2013) May. Rabies, Chapter 2.1.13. https://caninerabiesblueprint.org/IMG/pdf/oie_terrestrial_manual_2013_ch_2.1.13_rabies.pdf
- OIE (2018) Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus). In: OIE (ed) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organization for Animal Health, Paris

https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf

- OKOH AE. (2000). Antigenic characterization of rabies virus isolates from vaccinated dogs in plateau state, Nigeria. *Vet Res Commun.* **24**(3):203–211. doi: 10.1023/A:1006412516340 ,
- ORLOWSKA A, ZMUDZIŃSKI JF. (2014). Molecular epidemiology of rabies virus in Poland. *Arch Virol.* **159**(8):2043–2050. doi: 10.1007/s00705-014-2045-z
- ORTEGA V, STONE J, CONTRERAS E, IORIÓ R, AGUILAR H. (2018). Addicted to sugar: roles of glycans in the order Mononegavirales. *Glycobiology.* **29**. 10.1093/glycob/cwy053.
- PAL M, HAÏLU A, AGARWAL RK AND DAVE P. (2013): Recent developments in the diagnosis of rabies in humans and animals. *J.V. Public Health* **11**: 77-62.
- PATEL AC, UPMANYU V, RAMASAMY S, GUPTA PK, SINGH R, SINGH RP. (2015). Molecular and immunogenic characterization of BHK-21 cell line adapted CVS-11 strain of rabies virus and future prospect in vaccination strategy. *VirusDisease*, **26**, 288-296.
- PICOT V, RASULI A, ABELLA-RIDER A, SAADATIAN-ELAHİ M, AIKIMBAYEV A, BARKİA A, BENMAİZ S, BOUSLAMA Z, DE BALOGH K, DEHOVE A, DAVLYATOV F, FARAHTAJ F, GONGAL G, GHOLAMİ A, IMNADZE P, ISSAD M, KHOUFİ S, NEDOSEKOV V, RAFİLA A, RICH H, SOUFİ A, TUYCHIEV J, VRANJES N, VODOPIJA R, ZAOUIA I, NEL L (2017) The Middle East and Eastern Europe rabies Expert Bureau (MEEREB) third meeting: Lyon-France (7–8 April 2015) *J. Infect. Public Health.***10**:695–701.
- POCH O, BLUMBERG BM, BOUGUELERET L, TORDO N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J. Gen. Virol.* **71**: 1153– 1162.
- PORTNOÏ D, FAVRE S, SUREAU P. (1982). Use of neuroblastoma cells (MNB) for the isolation of Street rabies virus from field specimens. Atlanta (GA): United States Centers for Disease Control and Prevention Rabies Information Exchange. **6**: 35-6.
- PREHAUD C, COULON P, LAFAY F, THIERS C, FLAMAND A. (1988). Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol.* **62**, 1–7. doi: 10.1128/jvi.62.1.1-7.1988.
- PREHAUD C, WOLFF N, TERRIEN E, LAFAGE M, MEGRET F, BABAUT N, CORDIER F, TAN GS, MAÏTREPIERRE E, MÉNAGER P, CHOPY D, HOOS S, ENGLAND P, DELEPIERRE M, SCHNELL MJ, BUC H, LAFON M. (2010). Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci. Signal.* **3**:a5 10.1126/scisignal.2000510
- PRINGLE CR (1997). The order Mononegavirales- current status. *Arch.Virol.***142**,2321-2326
- QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ AND LEONARD FC. (2002): Rabies. In: Veterinary Microbiology and Microbial diseases, 1st ed., Black well science Ltd, United Kingdom. Pp. 390-395

- RAHPEYMA M, BASHAR R. (2021). Evaluation of Multiplicity of Infection (MOI) and Harvesting Time on the Production of CVS-11 Strain of Rabies Virus in BSR Cell Line. *JoMMID*; **9** (1) :25-31
- REULARD P. (1996). Cell-culture vaccines for veterinary use. In F. M. Meslin, M. M. Kaplan, & H. Koprowski (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies* (pp. 314–323). Geneva: WHO.
- RIEDER M, CONZELMANN KK. (2011). Interferon in Rabies Virus Infection. *Research Advances in Rabies*, 91–114. doi:10.1016/b978-0-12-387040-7.00006-8
- ROBARDET E, PICARD-MEYER E, ANDRIEU S, SERVAT A. CLIQUET F. (2011). International interlaboratory trials on rabies diagnosis: an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. *J. Virol. Methods*, **177**, 15–25.
- ROOSTERMAN D GOERGE T SCHNEIDER SW BUNNETT NW STEINHOFF M. (2006). Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.*; **86**: 1309-1379
- ROSATTE RC, POWER MJ, MACINNES CD, CAMPBELL JB. (1992). Trap–vaccinate–release and oral vaccination for rabies control in urban skunks, raccoons and foxes. *Journal of Wildlife Diseases*, **28**(4):562–571.
- RUDD RJ, TRIMARCHI CV, ABELSETH MK. (1980). Tissue culture technique for routine isolation of Street strain rabies virus. *J Clin Microbiol.* **12**: 590-3.
- RUDD RJ, TRIMARCHI CV. (1987). Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine Neuroblastoma cells in the isolation of street strain rabies virus. *J Clin Microbiol*; **25**:1456-8.
- RUDD RJ, TRIMARCHI CV. (1989). Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the Mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J Clin Microbiol.* **27**: 2522-8.
- RUPPRECHT CE, WIKTOR TJ, JOHNSTON DH, HAMIR AN, DIETZSCHOLD B, WUNNER WH, GLICKMAN LT, KOPROWSKI H. (1986). Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(20), 7947–7950.
- RUPPRECHT CE, CLIQUET F, FEHLNER-GARDINER C, FOOKS AR, MUELLER T, SABETA C, SLATE D. (2014). Progress in the development of a direct rapid immunohistochemical test for diagnosing rabies. *OIE Bulletin*, No. 3, 87–95.
- RUPPRECHT E., FOOKS A.R., ABELA-RIDDER B. (2018). Laboratory techniques in rabies. Geneva: World Healthy Organization. Fifth edition Volume 1 (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310836/9789241515153-eng.pdf>)
- RUPPRECHT C, KUZMIN I, MESLIN F.(2017). Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Research*, **6**:184. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10416.1>

- SAMBROOK JF AND RUSSEL DW. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Cold Spring Harbor.
- SAMÍ D AND ENNAJÍ MM.(2020).Global epidemiology and genetic variability of rabies viruses. *Emerging and reemerging viral pathogens*. Elsevier.259-275
- SCHNELL MJ AND CONZELMANN KK. (1995). Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology* **214**: 522–530.
- SCHNELL MJ, MCGETTIGAN JP, WIRBLICH C, PAPANERÍ A. (2009). The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Reviews Microbiology*, **8**(1), 51–61. doi:10.1038/nrmicro2260
- SEİF I, COULON P, ROLLIN PE, AND 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**:926-934.
- SHEN CF, LANTHIER S, JACOB D, MONTES J, BEATH A, BERESFORD A, et al. (2012). Process optimization and scale-up for production of rabies vaccine live adenovirus vector (AdRG1.3). *Vaccine*, **30**(2), 300–306. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.095
- SHIPLEY R, WRIGHT E, SELDEN D, WU G, AEGERTER J, FOOKS AR, BANYARD AC. (2019). Bats and Viruses: Emergence of Novel Lyssaviruses and Association of Bats with Viral Zoonoses in the EU. *Trop. Med. Infect. Dis.* **4**, 31. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010031>
- SIDWA TJ, WILSON PJ, MOORE GM, OERTLI EH, HICKS BN, ROHDE RE, JOHNSTON DH. (2005). Evaluation of oral rabies vaccination programs for control of rabies epizootics in coyotes and gray foxes: 1995–2003, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **227**(5), 785-792.
- SINCLAIR JR, WALLACE RM, GRUSZYNSKI K, FREEMAN MB, CAMPBELL C, SEMPLE S, INNES K, SLAVINSKI S, PALUMBO G, BAIR-BRAKE H, ORCIARIL, CONDORI RE, LANGER A, CARROLL DS, MURPHY J. (2015). Rabies in a dog imported from Egypt with a falsified rabies vaccination certificate- Virginia. *MMWR*. **64**:1359-62. Doi: 10.15585.mmwr.mm6449a2.
- SINGH R, SINGH KP, CHERIAN S, SAMINATHAN M, KAPOOR S, REDDY GBM, 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, DOI: 10.1080/01652176.2017.1343516
- SLATE DF, ALGEO TD AND NELSON KM. (2009): Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities and challenges. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **3**: 1-9.
- SLAVICA A, SEVERIN K, ČAČ Ž, CVETNIĆ Ž, LOJKIĆ M, DEŽDEK D, KONJEVIĆ D, PAVLAK M, BUDIŠČAK Z. (2010). A model of the spatial spread of silvatic rabies on Croatian territory over the period of thirty years. *Vet. Stanica* , **41**, 199–210.
- SMITH JS, YAGER PA, BEAR GM. (1973). A rabid reproducible test for determining rabies neutralising antibody. *Bull. WHO* **5**,902.
- SMITH AL, TIGNOR GH, MUFUNE K, MOTOHASHI T. (1977). Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology*. **8**: 92-9.

- SMITH AL, TIGNOR GH, EMMONS RW, WODDIE JD. (1978). Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology*. **9**: 359-61.
- SMITH JS, FISHBEIN DB, RUPPRECHT CE, CLERK K. (1991). Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. *N Engl J Med*; **324**:204–11.
- SMITH JS, SEIDEL HD. (1993). Rabies: a new look at an old disease. *Prog. Med. Virol.* **40**, 82-106.
- SMITH DJ, LAPEDES AS, DE JONG JC, BESTEBROER TM, RIMMELZWAAN GF, OSTERHAUS AD, FOUCHIER RA. (2004). Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* (New York. NY. **305**(5682):371–376.
- SOBEY KG, JAMIESON SE, WALPOLE AA, ROSATTE RC, DONOVAN D, FEHLNER-GARDINER C, NADIN-DAVIS SA, DAVIES JC, KYLE CJ. (2019). ONRAB® oral rabies vaccine is shed from, but does not persist in, captive mammals. *Vaccine*. **18**;37(31):4310-4317. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.046. Epub 2019 Jun 24. PMID: 31248686.
- SOLON J, GAREIL O, BASEREAU P, GAUDIN Y (2005). Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *J. Gen. Virol.* **86**, 3357-3363
- SRINIVASAN A, BURTON EC, KUEHNERT MJ, RUPPRECHT C, SUTKER WL, KSIAZEK TG, PADDOCK CD, GUARNER J, SHIEH WJ, GOLDSMITH C, HANLON CA, ZORETIC J, FISCHBACH B, NIEZGODA M, EL-FEKY WH, ORCIARI L, SANCHEZ EQ, LIKOS A, KLINTMALM GB, CARDO D, LEDUC J, CHAMBERLAND ME, JERNIGAN DB, ZAKI SR. (2005). Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *New England Journal of Medicine*, **352**:1103–1111.
- STECK F, WANDELER A, BICHSEL P, CAPT S, SCHNEIDER L. (1982). Oral immunization of foxes against rabies. *Zbl. Vet. Med. B.* **29**, 372-396.
- SUDARSHAN MK, MADHUSUDANA SN, MAHENDRA BJ, RAO NS. N, ASHWATH DH, NARAYANA A, ABDUL RS, MESLIN FX, LOBO D, RAVIKUMAR K AND GANGABORAIAH. (2007): Assessing the burden of human rabies in India: results of a national multi-center epidemiological survey. *International Infectious Diseases*, **11**: 29-35.
- SUREAU P, ROLLIN P, WIKTOR TJ. (1983). Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. *Am J Epidemiol.* **117**(5):605–609.
- SUREAU P. (1986). Rapid technics for laboratory diagnosis of rabies. *Arch Inst Pasteur Tunis.* **63**:183-97.
- SVENDA M, BERG M, MORENO-LOPEZ J, LINNE T (1997). Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* **48**,57-70
- TAKAHASHI T, INUKAI M, SASAKI M, POTRATZ M, JARUSOMBUTI S, FUJII Y, NISHIYAMA S, FINKE S, YAMADA K, SAKAI H, SAWA H, NISHIZONO A,

- SUGIYAMA M, ITO N. (2020). Genetic and Phenotypic Characterization of a Rabies Virus Strain Isolated from a Dog in Tokyo, Japan in the 1940. *Viruses*. **12**:914. doi: 10.3390/v12090914
- TAKAYAMA-ITO M, ITO N, YAMADA K, MINAMOTO N, SUGIYAMA M. (2004). Region at amino acids 164 to 303 of the rabies virus glycoprotein plays an important role in pathogenicity for adult mice, *Journal of Neurovirology*, **10**:2, 131-135, DOI: [10.1080/13550280490279799](https://doi.org/10.1080/13550280490279799)
- TAŞDEMİR RA, OĞUZÖNCÜL AF, PİRİNÇİ E. (2017). An Evaluation Of Rabies Cases At A Town Public Hospital. *Kocaeli Medical Journal*, **6**(1), 63-67.
- TATAN ATICI Y, OĞUZÖĞLU TÇ. (2022). The Comparison of Full G and N Gene Sequences From Turkish Rabies Field Strains. *Virus Research*, **315**, 198790. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198790>.
- TAYLOR LH, KNOPF L. (2015). Partners for Rabies Prevention. Surveillance of human rabies by national authorities—A global survey. *Zoonoses Public Health*. **62**, 543–552.
- T.C. Sağlık Bakanlığı-Kuduz Saha Rehberi 2019. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu [erişim Ocak 2021]. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/zoootik-vektorel-hastaliklar-db/zoootik-hastaliklar/2-Kuduz/6Rehber/Kuduz_Profilaksi_Rehberi.pdf
- TE KAMP V, FREULING CM, VOS A. et al. (2020). Responsiveness of various reservoir species to oral rabies vaccination correlates with differences in vaccine uptake of mucosa associated lymphoid tissues. *Sci Rep* **10**, 2919
- THOULOZE MI, LAFAGE M, SCHACHNER M, HARTMANN U, CREMER H, LAFON M (1998). The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J. Virol.* **72**, 7181-7190
- TROUPIN C, DACHEUX L, TANGUY M, SABETA C, BLANC H, BOUCHIER C, VIGNUZZI M, DUCHENE S, HOLMES EC, BOURHY H. (2016). Large-Scale Phylogenomic Analysis Reveals the Complex Evolutionary History of Rabies Virus in Multiple Carnivore Hosts. *PLoS Pathog* **12**(12): e1006041. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006041>
- TUFFEREAU C, BENEJEAN 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**, 7250-7259
- TUFFEREAU C, DESMEZIERES E, BENEJEAN J, JALLET C, FLAMAND A, TORDO N, PERRIN P (2001). Interaction of lyssaviruses with the low-affinity nerve-growth factor receptor p75NTR. *J. Gen. Virol.* **82**, 2861-2867
- TUFFEREAU C, LEBLOIS H, BÉNEJEAN J, COULON P, LAFAY F AND FLAMAND A (1989a) Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence. *Virology*, **172**, 206–212.
- TUFFEREAU C, BENEJEAN J, ROQUE ALFONSO A-M, FLAMAND A, FISHMAN MC. (1998b). Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surface of lepidoptera cells. *J Virol.* **72**:1085–1091

- TUNCMAN ZM. (1958). Researches on the rabies virus in bats of Turkey. *Microbio Dergisi Turk*, **11**, 81.
- UGOLINI G. (2011). Rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections. *Adv. Virus Res.* **79**: 165–202
- UMOH JU, BLENDEN DC. (1983). Comparison of primary skunk brain and kidney and raccoon kidney cells with established cell lines for isolation and propagation of street rabie virus. *Infect immun.* **41**:1370-2.
- UMOH JU, COX JH, SCHNEIDER LG. (1990). Antigenic characterization of street rabies virus isolates from Nigeria using monoclonal antibodies. *Zentralblatt für Veterinarmedizin Reihe B Journal of Veterinary Medicine.* **37**(3):222–228.
- UN H, ESKİİZMİRLİLER S, UNAL N, FREULING C, JOHNSON N, FOOKS AR, MÜLLER T, VOS A, AYLAN O. (2012). Oral vaccination of foxes against rabies in Turkey between 2008 and 2010. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **125**:203-8.
- VİGERUST DJ, SHEPHERD VL. (2007).Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol.* **15** (5), 211–218
- VİROJANAPIROM P, KHAWPLOD P, SAWANGVAREE A, WACHARAPLUESADEE S, HEMACHUDHA T, YAMADA K, et al. (2012). Molecular analysis of the mutational effects of Thai street rabies virus with increased virulence in mice after passages in the BHK cell line. *Arch. Virol.* **157** 2201–2205. 10.1007/s00705-012-1402-z
- VOS A, FREULING CM, HUNDT B, KAİSER C, NEMİTZ S, NEUBERT A, NOLDEN T, TEİFKE JP, TE KAMP V, ULRİCH R, FİNKE S, MÜLLER T.(2017). Oral vaccination of wildlife against rabies: Differences among host species in vaccine uptake efficiency, *Vaccine.***35**(32),3938-3944
- VOS, A, ÜN H, HAMPSON K, DE BALOGH K, AYLAN O, FREULING C, MÜLLER T, FOOKS AR, JOHNSON N. (2014). Bovine rabies in Turkey: Patterns of infection and implications for costs and control. *Epidemiology and Infection*, **142**(9), 1925-1933. doi:10.1017/S0950268813002811
- WADHWA A, WİLKİNS K, GAO J, CONDORİ CONDORİ RE, GİGANTE CM, ZHAO, H, MA X, ELLİSON JA, GREENBERG L, VELASCO-VİLLA A, ORCİARİ L, Lİ Y. (2017). A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. *PLoS neglected tropical diseases*, **11**(1), e0005258
- WALLACE RM, BLANTON J. (2020). Chapter 4 - Epidemiology. Rabies, 103–142. Editor(s): Anthony R. Fooks, Alan C. Jackson, Rabies (Fourth Edition), Academic Press, 2020, Pages 103-142
- WANG L, TANG Q, & LIANG G. (2014). Rabies and Rabies Virus in Wildlife in Mainland China, 1990-2013. *International Journal of Infectious Diseases*, **25**, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.04.016>.
- WANG F, FANG Q, WANG B, YAN Z, HONG J, BAO Y, KUHN JH, WERREN JH, SONG Q, YE G. (2017). A Novel Negative-Stranded RNA Virus Mediates Sex Ratio in its Parasitoid Host. *Plos Pathog.* **13**:E1006201.

- WANG J, WANG Z, LIU R, SHUAI L, WANG X, LUO J, WANG C, CHEN W, WANG X, GE J, HE X, WEN Z, BU Z. (2018) Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus. *PLoS Pathog* **14**(7): e1007189. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007189>
- WANG W, MA J, NIE J, LI J, CAO S, WANG L, YU C, HUANG W, LI Y, YU Y, LIANG M, ZIRKLE B, CHEN XS, LI X, KONG W, WANG Y. (2019a). Antigenic variations of recent street rabies virus. *Emerg Microbes Infect.* **8**(1):1584-1592. doi: 10.1080/22221751.2019.1683436. PMID: 31682199; PMCID: PMC6844422.
- WANG W, MA J, NIE J, LI J, CAO S, WANG L, YU C, HUANG W, LI Y, YU Y, LIANG M, ZIRKLE B, CHEN XS, LI X, KONGW AND WANG Y. (2019b). Analysis of the evolution, infectivity and antigenicity of circulating rabies virus strains. *Emerging Microbes & Infections* **11**:1, pages 1474-1487
- WARRELL MJ, WARRELL DA. (2004). Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet* (London, England), 363(9413), 959–969. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15792-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15792-9)
- WHELAN SP, BARR JN, WERTZ GW. (2004). Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**: 61–119.
- WHITE DO & FENNER F (1994). Medical virology. Gulf Professional Publishing. 4th. Ed. Chapter 29, Rhabdoviridae, 475-488
- WHO position paper on rabies vaccines. (2010-a). *Weekly Epidemiological Record*, 85:309-320.
- World Health Organization. (2010-b). Human and dog rabies prevention and control: report of the WHO/Bill and Melinda Gates Foundation Consultation, Annecy, France, 7-9 October 2009. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70253>
- WHO Expert Consultation on Rabies, third report. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO Technical Report Series, No. 1012). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Organisation for Animal Health (2024). Organic Statutes of the Office International des Epizooties. OIE-Listed Diseases 2021. OIE, Paris. Available online: <https://www.oie.int/en/who-we-are/structure/framework/basic-texts/organic-statutes/>; <https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/>
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. (2007). Fifty-sixth report, Annex 2. Geneva, World Health Organization, (WHO Technical Report Series, No. 941).
- World Health Organization. (2013). WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. World Health Organization technical report series, (982), 1.
- WHO. Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030; (2018c), Available from: <<http://www.who.int/rabies/resources/9789241513838/en/>>.
- WHO. World Health Organization; Rabies "What is Rabies?" 2018-b. Available from: <https://www.who.int/rabies/about/en/>.

- World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.1.13. Rabies. Paris, , 2012
(<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/> access-online/; accessed 4 December 2012).
- World Organisation Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022 Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses) Erişim tarihi 25.10.2022
- WIKTOR TJ, GYÖRGY E, SCHLUMBERGER HD, SOKOL F, KOPROWSKI H. (1973). Antigenic properties of rabies virus components. *The Journal of Immunology* .**110** (1) 269-276.
- WIKTOR TJ, KOPROWSKI H. (1980). Antigenic variants of rabies virus. *J Exp Med.* **152**(1):99–112. doi: 10.1084/jem.152.1.99.
- WIKTOR TJ, MACFARLAN RI, REAGAN KJ, DIETZSCHOLD B, CURTIS PJ, WUNNER WH, KIENY MP, LATHE R, LECOCQ JP, MACKETT M. (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**(22), 7194–7198.
- WRIGHT A, TAO MH, KABAT EA, MORRISON SL. (1991). Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *EMBO J.* **10** (10), 2717–2723.
- WU X, LEI X, FU ZF. (2003). Rabies virus nucleoprotein is phosphorylated by cellular casein kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **304** (2), 333-338.
- WU X, FRANKA R, VELASCO-VILLA A, RUPPRECHT CE (2007). Are all lyssavirus genes equal for phylogenetic analyses? *Virus Res* **129**: 91-103
- WUNDERLI PS, SHADDOCK JH, SCHMID DS, MILLER TJ, BAER GM. (1991). The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. *Vaccine* **9** (9), 638-642.
- WUNNER WH, LARSON JK, DIETZSCHOLD B AND SMITH CL. (1988). The molecular biology of rabies viruses. *Rev. Infect. Dis.* **10**(Suppl. 4), 771– 784.
- WUNNER WH. (1991). The chemical composition and molecular structure of rabies virus. In: Baer GM, editor. The natural history of rabies. Boca Raton (FL): CRC Press; p.31-37.
- WUNNER WH. (2002). Rabies virus. In: Jackson, A.C. and Wunner, W.H., editors. Rabies. Elsevier Science (USA), London, UK. p23-61.
- WUNNER WH. (2007). Chapter 2 Rabies Virus. Rabies 2nd Ed. Academic Press. Jackson AC, WUNNER WH. DOI:10.1016/B978-012369366-2/50004
- YAKOBSON BA, KING R, AMIR S, DEVERS N, SHEICHAT N, RUTENBERG D, MILDENBERG Z, DAVID D. (2006). Rabies vaccination programme for red foxes (*Vulpes vulpes*) and golden jackals (*Canis aureus*) in Israel (1999–2004). *Dev. Biol.*, **125**, 133–140

- YAKOBSON B, DVERES N, ROTBLAT S, SPERO LANKAU EW, MAKI J. (2017). Impact of Rabies Vaccination History on Attainment of an Adequate Antibody Titre Among Dogs Tested for International Travel Certification, Israel—2010–2014. *Zoonoses Public Health*, **64**, 281–289
- YAMADA K, NOGUCHI K, NONAKA D, MORITA M, YASUDA A, KAWAZATO H, NISHIZONO A. (2013a). Addition of a single N-glycan to street rabies virus glycoprotein enhances virus production. *J. Gen. Virol.* **94** (2), 270–275.
- YAMADA K, NOGUCHI K, NISHIZONO A. (2013b). Efficient N-glycosylation at position 37, but not at position 146, in the street rabies virus glycoprotein reduces pathogenicity. *Virus research*. 179. 10.1016/j.virusres.2013.10.015
- YAMADA K, PARK CH, NOGUCHI K, KOJIMA D, KUBO T, KOMIYA N, MATSUMOTO T, MITUI MT, AHMED K, MORIMOTO K, INOUE S, NISHIZONO A. (2012). Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* **165** (1), 34–45
- YANG J, HOOPER DC, WUNNER WH, KOPROWSKI H, DIETZSCHOLD B, FU ZF. (1998). The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. *Virology*. **242**:107–117
- YANG DK, PARK YN, HONG GS, KANG HK, OH YI, CHO SD, SONG JY. (2011). Molecular characterization of Korean rabies virus isolates. *J Vet Sci.* **12**(1):57-63. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.1.57>
- YANG DK, KIM HH, LEE KW, & SONG JY. (2013). The present and future of rabies vaccine in animals. *Clinical and experimental vaccine research*, **2**(1), 19–25. <https://doi.org/10.7774/cevr.2013.2.1.19>
- YOUSAF MZ, QASIM M, ZIA S, KHAN MU, ASHFAQ UA, KHAN S. (2012). Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. *Virol J.* **9**:50.
- YU P, HUANG Y, ZHANG Y, TANG Q, LIANG G. (2012). Production and evaluation of a chromatographically purified Vero cell rabies vaccine (PVRV) in China using microcarrier technology. *Hum. Vaccin. Immunother.* **8**: 1230–1235. doi: 10.4161/hv.20985
- ZAKOWSKI JJ, WAGNER RR. (1980). Localization of membrane-associated proteins in vesicular stomatitis virus by use of hydrophobic membrane probes and cross-linking reagents. *J Virol* **36**: 93–102
- ZANLUCA C, AIRES LR, MUELLER PP, SANTOS VV, CARRIERI ML, PINTO AR, ZANETTI CR. (2011). Novel monoclonal antibodies that bind to wild and fixed rabies virus strains. *J Virol Methods.* **175**(1):66–73. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.04.019
- ZAVAREH Z. (2000). Immunogenicity of BHK-Rabies vaccine in Cattle. *Iranian Biomed. J.* **4**: 129–131.
- ZEYNALOVA SK, SHIKHIYEV M, ALIYEVA, T, ISMAYILOVA R, WISE E, ABDULLAYEV R, ASADOV K, RUSTAMOVA S, QULIYEV F, WHATMORE

- AM, MARSHALL ES, FOOKS AR, HORTON DL. (2015). Epidemiological characteristics of human and animal rabies in Azerbaijan. *Zoonoses and public Health*, **62**, Issue 2, 111–118.
- ZHANG G, WANG H, MAHMOOD F, FU Z F.(2013). Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms. *Veterinary Microbiology*, **162**, 2–4.
- ZHU S, GUO C. (2016). Rabies control and treatment: From prophylaxis to strategies with curative potential. *Viruses*. **8** (11):pii: E279.



EKLER

Ek-3. Seroloji sonuçlarının istatistiksel sonuçları

Kruskal Wallis								
titre								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	4	16,9500	7,43034	3,71517	5,1267	28,7733	7,80	23,00
2,00	4	11,2250	8,28749	4,14375	-1,9622	24,4122	1,10	18,00
3,00	4	4,1000	2,76043	1,38022	-,2925	8,4925	1,50	7,80
Total	12	10,7583	8,12454	2,34535	5,5962	15,9204	1,10	23,00

Crosstabs yüksek antikor titrelerine

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
sus * titre	162	100,0%	0	0,0%	162	100,0%

sus * titre Crosstabulation

			titre		Total
			1,00	2,00	
sus	1,00	Count	27	27	54
		% within sus	50,0%	50,0%	100,0%
	2,00	Count	10	44	54
		% within sus	18,5%	81,5%	100,0%
	3,00	Count	9	45	54
		% within sus	16,7%	83,3%	100,0%
Total	Count	46	116	162	
	% within sus	28,4%	71,6%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	18,641 ^a	2	,000
Likelihood Ratio	18,043	2	,000
Linear-by-Linear Association	14,664	1	,000
N of Valid Cases	162		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 15,33.

Crosstabs orta titrelerde						
Notes						
Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
sus * titre	162	100,0%	0	0,0%	162	100,0%
sus * titre Crosstabulation						
			titre		Total	
			1,00	2,00		
sus	1,00	Count	20	34	54	
		% within sus	37,0%	63,0%	100,0%	
	2,00	Count	25	29	54	
		% within sus	46,3%	53,7%	100,0%	
	3,00	Count	15	39	54	
		% within sus	27,8%	72,2%	100,0%	
Total	Count		60	102	162	
	% within sus		37,0%	63,0%	100,0%	
Chi-Square Tests						
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)			
Pearson Chi-Square	3,971 ^a	2	,137			
Likelihood Ratio	4,003	2	,135			
Linear-by-Linear Association	,987	1	,321			
N of Valid Cases	162					
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 20,00.						

Crosstabs düşük titrelerde

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
sus * titre	162	100,0%	0	0,0%	162	100,0%

sus * titre Crosstabulation

			titre		Total
			1,00	2,00	
sus	1,00	Count	7	47	54
		% within sus	13,0%	87,0%	100,0%
	2,00	Count	18	36	54
		% within sus	33,3%	66,7%	100,0%
	3,00	Count	29	25	54
		% within sus	53,7%	46,3%	100,0%
Total	Count		54	108	162
	% within sus		33,3%	66,7%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	20,167 ^a	2	,000
Likelihood Ratio	21,270	2	,000
Linear-by-Linear Association	20,042	1	,000
N of Valid Cases	162		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 18,00.