

BATI ANADOLU'DAKİ BAZI YAYGIN KÜÇÜK MEMELİ TÜRLERİNİN ORTOHANTAVİRÜS TAŞIYICILIĞI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ceylan POLAT¹, Sercan IRMAK², Mustafa SÖZEN³, İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM⁴

C. Polat: 0000-0003-1511-4177, S. Irmak: 0000-0002-1577-8208, M. Sözen: 0000-0002-1911-605X, İ. M. A. Öktem: 0000-0002-3185-8355

¹Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

²Balıkesir Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, BALIKESİR

³Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ZONGULDAK

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZ

Hantaviridae ailesinin üyesi olan ortohantavirüsler, kemirici kaynaklı RNA virüsleridir. Enfekte kemiricilerin çıkartı ve sekresyonlarındaki viral partiküllerin aerosolizasyonu ve nadiren de enfekte kemiricilerle direkt temas yolu ile bulaşan ortohantavirüsler, Avrasya'da renal sendromlu kanamalı ateş ve epidemik nefropati olgularına, Amerika kıtasında ise hantavirüs kardiyopulmoner sendrom olgularına neden olabilen önemli halk sağlığı sorunlarıdır. Türkiye'de de enfeksiyonlara neden oldukları bildirilmiş ve küçük memelilerdeki varlıkları gösterilmiştir.

Bu çalışma ile renal sendromlu kanamalı ateş olgularının bildirildiği bazı Batı Anadolu illerinde dolaşımda olan ortohantavirüslerin ve olası konak türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında yedi farklı lokaliteden yakalanan 49 adet küçük memeliye ait serum ve akciğer dokusu örnekleri kullanılmıştır. Hem moleküler hem de serolojik yöntemler ile taranan örneklerde, Ortohantavirüs enfeksiyonuna yönelik bir pozitiflik saptanmamıştır. Bu durum, örneklem alanlarının zamansal, bölgesel ve iklimsel özelliklerinden kaynaklanmış olabilir.

Batı Anadolu'daki küçük memelilerin Ortohantavirüs taşıyıcılıklarının değerlendirilmesi, bölgeden bildirilmiş vakalar olması nedeniyle önem taşımaktadır. Bu çalışmanın örneklemini sınırlı olduğundan, olası konak türlerini ve farklı dönemlerde yapılmış örneklemeleri içeren kapsamlı bir çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Ortohantavirüs, *Microtus*, *Apodemus*, *Crocidura*, Anadolu, Türkiye

ABSTRACT

Evaluation of Some Common Small Mammal Species in Western Anatolia for *Orthohantavirus* Carriage

Orthohantaviruses, members of the *Hantaviridae* family, are rodent-borne RNA viruses. They transmitted by aerosolization of viral particles in the excretions and secretions of infected rodents and rarely by direct contact with infected rodents. They are an important public health concerns that cause hemorrhagic fever with renal syndrome and epidemic nephropathy cases in Eurasia and hantavirus cardiopulmonary syndrome cases in the Americas. They have also been reported to cause infections in Turkey and their presence in rodents have been indicated.

We aimed to determine the circulating orthohantaviruses and possible host species in some provinces of Western Anatolia where hemorrhagic fever with renal syndrome cases have been reported. Serum and lung tissue samples of 49 rodents collected from seven localities during a one-week field study were used. No positivity for *Orthohantavirus* infection was detected in the samples screened by both molecular and serologic methods. This situation may be related to the temporal, regional and climatic characteristics of the sampling areas.

The evaluation of rodents in Western Anatolia in terms of *Orthohantavirus* carriage is important due to the cases reported from the region. Since the sample size of this study was limited, a comprehensive study which includes possible host rodent species and samples collected from different periods is needed.

Keywords: *Orthohantavirus*, *Microtus*, *Apodemus*, *Crocidura*, Anatolia, Turkey

İletişim adresi: Ceylan POLAT. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA
e-posta: ceylan.polat@hacettepe.edu.tr

Received/Geliş: 26.03.2024 Accepted/Kabul: 29.04.2024 Published Online/Online Yayın: 30.08.2024

Atıf/Cite as: Polat C, Irmak S, Sözen M, Öktem İMA. Batı Anadolu'daki bazı yaygın küçük memeli türlerinin *Orthohantavirüs* taşıyıcılığı açısından değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 2024;38(2):30-36.

GİRİŞ

Ortohantavirüsler, tek iplikli, negatif polariteli, üç segmentli RNA genomuna sahip zarflı virüslerdir⁽²⁶⁾. Bulaş, enfekte konağa ait dışkı, idrar gibi çıkartılarında ve salya gibi sekresyonlarında bulunan viral partiküllerin solunması ve nadiren enfekte konaklarla doğrudan temas yoluyla gerçekleşmektedir. Konak türlerin yayılımı, bu virüslerin epidemiyolojisinde önemli rol oynamaktadır⁽¹¹⁾.

Dünya'da her yıl 150-200 bin kişiyi etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunu olan *Ortohantavirüs* kaynaklı enfeksiyonlar, Avrupa ve Asya'da görülen (Eski Dünya ortohantavirüsleri) renal sendromlu kanamalı ateş ve epidemik nefropati tablolarına neden olurken, Amerika kıtasında (Yeni Dünya ortohantavirüsleri) hantavirüs kardiyopulmoner sendromuna neden olmaktadır⁽⁹⁾. Türkiye'de de görülen ve dönem dönem salgınlara neden olan bu virüsler, ülkemizde ilk olarak 2009 yılındaki salgın ile birlikte dikkat çekmiştir⁽⁶⁾. Yapılan çalışmalarda, *Ortohantavirus dobravaense* (DOBV) ve *Ortohantavirus puumalaense* (PUUV) kaynaklı vakalar bildirilmiştir^(1,2,4,6-8,10,15,16,20,21,25). Yaban hayatı surveyans çalışmalarında ise küçük memelilerde DOBV, PUUV ve *Ortohantavirus tulaense* (TULV) varlığı saptanmıştır^(13,14,17-19).

Ortohantavirüs enfeksiyonlarında, yüksek ateş, miyalji ve halsizlik gibi spesifik olmayan bulguları nedeniyle tanı koyulması zordur ve virüse karşı doğrudan etkili bir antiviral ajan bulunmamaktadır. Bu nedenle enfeksiyondan korunma önem taşımaktadır. Yaban hayatı surveyansının yapılması, zoonotik virüslerden kaynaklanabilecek olası salgınlara karşı hazırlığın önemli bir parçası haline gelmiştir⁽²²⁾. Riskli bölgelerin belirlenmesi ve olası salgın bölgelerinin öngörülebilmesi, halk sağlığı güvenliği açısından kilit öneme sahiptir.

Bu çalışmada, renal sendromlu kanamalı ateş olgularının bildirildiği bazı Batı Anadolu illerinde dolaşımda olan ortohantavirüslerin ve olası konak türlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma planı için Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu'na başvurulmuş ve 28/2016 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Örnekler

Ortohantavirüs varlığının değerlendirilebilmesi için, 2016 yılında bir haftalık saha çalışması ile Balıkesir, Kütahya ve İzmir Bozdağ'daki yedi farklı lokaliteden canlı yakalama kapanları ile yakalanan küçük memelilere ait dokular ve serum örnekleri kullanıldı (Tablo 1). Memelilerin tür tayinleri, saha çalışmaları sırasında fenotipik olarak yapıldı ve olası bir pozitiflik saptanması durumunda moleküler yöntemler ile doğrulanması planlandı.

Küçük memelilere ait dokular, RNA stabilize edici solüsyon (RNAlater, Invitrogen, ABD) içerisinde -80°C'de, serum örnekleri ise doğrudan -80°C'de saklandı.

Tablo 1. Örneklem yapılan lokalitelerin koordinatları.

İl	Bölge	Enlem	Boylam	Küçük memeli türleri (n)
Kütahya	Çavdarhisar	39.18671	29.60044	<i>Apodemus</i> spp. (4) <i>Mus macedonicus</i> (2) <i>Crocidura leucodon</i> (1) <i>Microtus hartingi</i> (2)
	Akpınar Köyü	39.56989	30.12729	<i>Microtus hartingi</i> (8)
İzmir	Bozdağ	38.332140°	28.115745°	<i>Microtus subterraneus</i> (4)
	Bozdağ Yaylası	38.351177°	28.107274°	<i>Apodemus</i> spp. (1) <i>Apodemus mystacinus</i> (2) <i>Apodemus</i> spp. (1)
Balıkesir	Geçmiş Köyü	39.54630	27.35180	<i>Mus macedonicus</i> (2)
	Güre Köyü	39.61892	26.89033	<i>Apodemus flavicollis</i> (4) <i>Mus macedonicus</i> (2)
	Çağış Yerleşkesi	39.54340	28.00793	<i>Apodemus</i> spp. (7) <i>Mus macedonicus</i> (9)

Moleküler Tarama

Nükleik Asit İzolasyonu ve cDNA Eldesi

Küçük memelilere ait akciğer dokuları, TRIzol (Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisinde, steril çelik boncuklar yardımı ile homojenize edildi. Doku homojenizasyonunu takiben, guanidin-tiyosiyanat-fenol-kloroform yöntemi⁽³⁾ ile total nükleik asit izolasyonu yapıldı.

Elde edilen RNA'lar ters transkripsiyon yöntemi ile cDNA'ya çevrildi. Bu amaçla, "random hexamer" primer, ters transkriptaz enzimi, RNaz inhibitörü, deoksinükleotit trifosfat karışımı (dNTP) ve tampon içeren ticari kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde, her bir reaksiyon için 100 µM "random hexamer", 200 U RevertAid RT enzimi, 20 ünite (U) RiboLock RNase inhibitörü ve 20 mM dNTP kullanıldı.

Çalışmada, Helsinki Üniversitesi Viral Zoonozlar Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen *Orthohantavirus dobravaense*'ye ait RNA pozitif kontrol olarak kullanıldı.

RT-PZT ve Nested PZT

Örneklerin taranmasında, *Orthohantavirüs* genomunda RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlayan L-segmentteki korunmuş bölgeleri tanıyan ve bilinen tüm orthohantavirüslere özgül pan-hantavirus primer setleri kullanıldı⁽¹²⁾.

Tepkimeler, toplam hacimleri 25 µL olacak şekilde hazırlandı. Her iki reaksiyonda da 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10 µM ileri primer, 10 µM geri primer (Tablo 2) ve 2.5 U Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı.

Tablo 2. Pan-hantavirus taramasında kullanılan primerler⁽¹²⁾.

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

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

RT-PZT koşulları; 94°C'de 1 dakika ön denatürasyonun ardından 4°C'lik değişim içeren bir "touch-down" basamağı (94°C 30 saniye, 60-56°C arasından her beş döngüde 2°C düşecek şekilde 30 saniye, 72°C 1 dakika olacak şekilde toplam 15 döngü) ve ardından 20 döngülük bir basamağı (94°C 30 saniye, 52°C 30 saniye, 72°C 1 dakika) takiben 72°C'de 5 dakikalık bir son uzama basamağından oluştu. Nested PZT koşulları ise, 94°C'de 1 dakika ön denatürasyonu takiben 35 döngülük 94°C 30 saniye, 53°C 30 saniye, 72°C 1 dakika basamağı ve 72°C'de 5 dakikalık bir son uzama basamağından oluştu. Elde edilen PCR ürünleri, %1.5'lük agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülendi ve hedef bölge büyüklüğüne uygun bant (390 baz çifti) varlığı araştırıldı.

Serolojik Tarama

Orthohantavirüse karşı antikor varlığının belirlenmesi için, DOBV, PUUV ve HTNV rekombinant nükleokapsid antijenleri ile kaplı ELISA plakları ve immunoblot şeritleri (Euroimmun, Almanya) kullanıldı. Serolojik testlerde, Polat ve ark.⁽¹⁷⁾ tarafından kemirici serumlarına göre optimize edilen prosedürler uygulandı.

ELISA testi için her serum bir örneği 1/50 oranında fosfatlı tampon (PBS) ile seyreltildi. 100 µL seyreltilmiş serum örneği eklenen kuyucuklar, orbital çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de bir saat inkübe edildi. Her bir örnek için çift kuyucuk kullanıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar, 300 µL deterjan içeren yıkama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile üçer kez yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL 1/10.000 oranında PBS ile seyreltilmiş "horseradish" peroksidaz enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatından (Millipore, ABD) eklenerek, orbital çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de bir saat inkübe edildi. Ardından yıkama basamağı yukarıda anlatılan şekilde tekrarlandı. Kuyucuklara 100 µL 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin/hidrojen peroksit (TMB/H₂O₂) kromojen/substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve plak, 15 dakika süre ile oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyonu takiben kuyucuklara 100 µL 0.5 M sülfirik asit (H₂SO₄) eklenerek tepkime durduruldu ve optik dansiteleri (OD), tepkimenin durdurulmasını takip eden 30 dakika içerisinde, mikropalak okuyucu fotometre ile 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) ölçüldü. OD değeri, 0,326 ve üzerinde olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

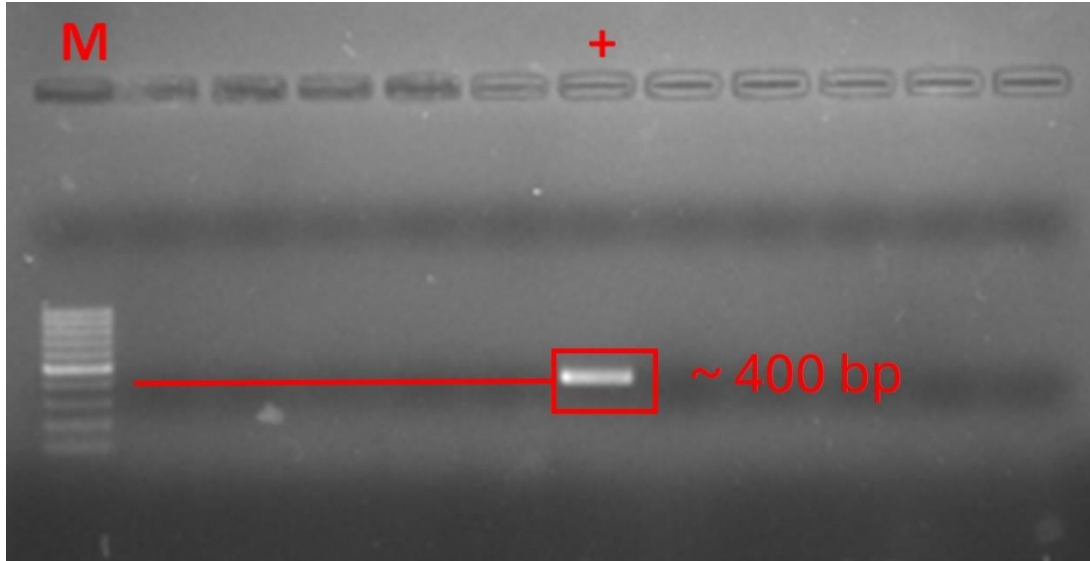
İmmunoblot testi için ise DOBV, PUUV ve HTNV rekombinant nükleokapsid antijenleri emdirilmiş şeritler, inkübasyon tepsi içinde 1.5 ml bloklama tamponu (Euroimmun, Almanya) ile 15 dakika boyunca oda sıcaklığında, çalkalayıcıda inkübe edildi. Her bir şeride 1.5 ml 1/100 oranlarında 1x dilüsyon tamponu (Euroimmun, Almanya) ile seyreltilen serum eklendi ve oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu takiben immunoblot şeritleri, üçer kez 1.5 ml 1x dilüsyon tamponu ile beşer dakika yıkandı. Yıkama sonrasında 1.5 ml 1/5.000 oranında 1x dilüsyon tamponu ile seyreltilen alkalen fosfataz enzimi ile işaretli keçi anti-fare IgG konjugatı (Santa Cruz Biotechnology, ABD) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Yıkama basamağı yukarıda anlatılan şekilde tekrarlandı. Her bir şerit üzerine 1.5 ml NBT/BCIP (nitrobluetetrazoliumchloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) substrat solüsyonu (Euroimmun, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında şeritler, üçer kez birer dakika distile su ile yıkandı ve şeritler üzerindeki bant yoğunlukları, şeritler kuruduktan sonra değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmada 19'u *Apodemus*, 15'i *Mus*, 14'ü *Microtus* ve biri *Crocidura* cinsi olmak üzere toplam 49 adet küçük memeli yakalandı. Bu küçük memelilerin tümünün akciğer dokularında moleküler tarama yapılırken, serum örneği alınabilen 20 bireye ait örnekler serolojik olarak da tarandı.

Polat ve ark.⁽¹⁷⁾ tarafından kemirici serum örnekleri için optimize edilen prosedüre göre optik dansite (OD) değeri 0.326 ve üzerinde olan örnekler, pozitif olarak değerlendirildi. 20 bireyden dördünde *Ortohantavirüs* açısından düşük düzeyde seropozitiflik saptandı. Ancak bu pozitiflikler, immunoblot testi ile doğrulanamadı.

Çalışmada yer alan küçük memelilerin virüs taşıyıcılıkları açısından moleküler olarak taranması sonucunda, örneklerde hedef bölge büyüklüğüne uygun bant gözlenmedi (Şekil 1).



Şekil 1. Küçük memelilerin doku örneklerine ait nested PZT ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

M: Marker (100-1000 bp, her bir çizgi 100 bp'lik artış ifade etmektedir), **+**: *Ortohantavirüs dobravaense* pozitif kontrol

TARTIŞMA

Ciddi klinik tablolara neden olabilen *Ortohantavirüs* kaynaklı enfeksiyonlarda, yüksek ateş, miyalji ve halsizlik gibi spesifik olmayan bulguların gözlenmesi ve tanısının zor olması, vireminin kısa sürmesi, virüse karşı doğrudan etkili bir antiviral ajanın bulunmaması, enfeksiyondan korunmayı öne çıkarmaktadır. Bu nedenle, ortohantavirüsler gibi zoonotik etkenlerin neden olabileceği salgınlara karşı hazırlıklı olmak ve riskli bölgeleri belirleyebilmek için yaban hayatı surveyansının yapılması önem taşımaktadır.

Türkiye'de 2009-2018 yılları arasında %5,1 mortalite oranıyla toplam 251 *Ortohantavirüs* kaynaklı vaka bildirilmiştir⁽²³⁾. Ayrıca, yaban hayatı monitörizasyonu çalışmaları sırasında küçük memelilerin DOBV, PUUV ve TULV taşıyıcılığının serolojik ve moleküler yöntemler ile saptanmış olması, ortohantavirüslerin Trakya ve Kuzey Anadolu'daki dolaşımını ortaya koymuştur^(13,14,17-19).

Çalışma kapsamında yakalanan küçük memelilere ait örnekler hem serolojik hem de moleküler yöntemler ile taranmıştır. Serolojik tarama için kullanılan ve eşik OD değeri 0.326 olan ELISA testi ile, dört örnekte düşük düzeyde seropozitiflik saptanmış, ancak immunoblot testi ile doğrulanamamıştır. Örneklemin farklı cins ve türde küçük memeli örneklerinden oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda, ELISA testi için belirlenen eşik OD değerinin, farklı türler için değişkenlik gösterebileceği düşünülebilir. Bu yüzden örneklerin değerlendirilmesinde, ELISA testinin yanı sıra altın standart olan immunoblot testi de dikkate alınmıştır.

Bu çalışmadaki örneklerin moleküler taramasında kullanılan ve L-segmenti hedef alan pan-hantavirus primerleri, yaygın olarak kullanılmaktadır⁽¹²⁾. Fakat bu primerlerin duyarlılığının düşük olduğu, viral yükü düşük olan örneklerde ve yeni bir *Ortohantavirüs*'ün saptanmasında performansının düşük olabileceği bildirilmiştir⁽⁵⁾. Bu nedenle virüsün L-segmenti yerine, oldukça korunmuş bir bölge olan S-segmentini hedef alan yöntemlerin tercih edilmesi, duyarlılığı artırabilir.

Çalışma kapsamında toplanan örneklem grubunda *Ortohantavirüs* varlığına rastlanmamıştır. Herhangi bir pozitiflik saptanmamasında, örneklem alanlarının dönemsel, bölgesel ve iklimsel özelliklerinin rolü olabilir. *Ortohantavirüs* enfeksiyonlarında, besin miktarındaki artışın küçük memeli popülasyonlarındaki artışa neden olmasından dolayı belirli dönemlerde artış gözlenebilmektedir⁽²⁴⁾. Bu nedenle örneklemin yapıldığı zaman ve lokaliteler, bu artışın gözlenmediği bir döneme rastlamış olması olasıdır. Diğer yandan daha önce yapılan çalışmalarda pozitiflik saptanmış olan Trakya, Kuzey ve Doğu Anadolu'daki lokalitelerin iklimsel özellikleri, bu çalışma kapsamında örneklem yapılan ve Batı Anadolu'da yer alan lokalitelerden farklılık göstermektedir. Bu iklimsel özellikler, bir RNA virüsü olan *Ortohantavirüs*'ün dış ortam şartlarında enfektivitesini sürdürmesi için uygun şartları sağlamıyor olmayabilir.

Bu çalışma, Batı Anadolu'daki küçük memelilerin *Ortohantavirüs* taşıyıcılıklarının değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Ancak bölgedeki durumun detaylı şekilde ortaya konabilmesi için farklı türlerinden oluşan, farklı dönemlerde örneklem yapılmış daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Zoonotik enfeksiyonlar açısından riskli oluşturabileceği düşünülen bölgelerde düzenli yaban hayatı monitörizasyonu ile olası etkenlerin varlığı saptanabilecek ve bölgelerin risk durumu ortaya konabilecektir.

Etik Kurul Onayı: Çalışma planı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (28/2016 numaralı karar) tarafından onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Proje için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

Ethics Committee Approval: The study plan was approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments (decision number 28/2016) of Dokuz Eylul University.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial support: No financial support was received for the project.

Teşekkür

Araştırmanın saha çalışmalarına katkı sağlayan Dr. Ortaç Çetintaş ve Prof. Dr. Ferhat Matur'a teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Akar N, Çalışkan E, Öztürk CE, et al. Seroprevalence of hantavirus and *Borrelia burgdorferi* in Düzce (Turkey) forest villages and the relationship with sociodemographic features. *Turk J Med Sci.* 2019;49(2):483-9. doi: 10.3906/sag-1807-160
2. Cesur S, Unverdi S, Ciftci A, et al. The seroprevalence of hantavirus in patients with chronic renal failure in two provinces of Central Anatolia. *KLİMİK Derg.* 2012;25(3):103-6. doi:10.5152/kd.2012.29

3. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty- something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5. doi:10.1038/nprot.2006.83
4. Çelebi G, Öztoprak N, Öktem İMA, et al. Dynamics of Puumala hantavirus outbreak in Black Sea Region, Turkey. *Zoonoses Public Health.* 2019;66(7): 783-97. doi: 10.1111/zph.12625
5. Erdin M, Stanoeva KR, Mögling R, et al. External quality assessment of orthohantavirus and lymphocytic choriomeningitis virus molecular detection and serology in Europe, 2021. *Euro Surveill.* 2023;28(40):pii=2300054. doi:10.2807/1560-7917.ES.2023.28.40.2300054
6. Ertek M, Buzgan T. An outbreak caused by hantavirus in the Black Sea region of Turkey, January-May 2009. *Euro Surveill.* 2009;14(20):19214. doi: 10.2807/ese.14.20.19214-en
7. Gozalan A, Kalaycioglu H, Uyar Y, et al. Human Puumala and Dobrava hantavirus infections in the black sea region of Turkey: A cross-sectional study. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(2):111-8. doi: 10.1089/vbz.2011.0939
8. Gözel MG, Engin A, Elaldi N, Bakir M, Dökmetaş I, Uyar Y. First cases of hemorrhagic fever with renal syndrome from the Middle Anatolia Region of Turkey and the first case of hantavirus and crimean-congo hemorrhagic fever virus co-infection in a patient. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2013;33(1):224-8. doi: 10.5336/medsci.2011-22742
9. Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):412-41. doi: 10.1128/CMR.00062-09
10. Kaya S, Yilmaz G, Erensoy Ş, Yağçi Çağlayık D, Uyar Y, Köksal I. Hantavirus infection: Two case reports from a province in the Eastern Black Sea Region, Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(3):479-87.
11. Klein SL, Calisher CH. Emergence and persistence of hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;315:217-52. doi: 10.1007/978-3-540-70962-6_10
12. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(5):838-40. doi: 10.3201/eid1205.051487
13. Laakkonen J, Kallio-Kokko H, Öktem MA, et al. Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *J Wildl Dis.* 2006;42(3): 672-6. doi: 10.7589/0090-3558-42.3.672
14. Oktem İMA, Uyar Y, Dincer E, et al. Dobrava-belgrade virus in *Apodemus flavicollis* and *A. uralensis* mice, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(1):121-5. doi: 10.3201/eid2001.121024
15. Oncul O, Atalay Y, Onem Y, et al. Hantavirus infection in Istanbul, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(2): 303-4. doi: 10.3201/eid1702.100663
16. Ozkan O, Tupek T, Yildiz E, Ayozturk Velioglu E, Gursu M, Ozturk S. Hantavirus infections and renal manifestations: Case report and update. *Turkish J Nephrol.* 2013;22(1):129-32. doi: 10.5262/tndt.2013.1001.23
17. Polat C, Karataş A, Sözen M, Matur F, Abacioglu H, Öktem MA. Yabani kemiricilerde Eski Dünya Hantavirüs IgG antikorlarının saptanması için ELISA ve immunoblot yöntemlerinin optimizasyonu. *Mikrobiyol Bul.* 2016; 50(2):245-55. doi: 10.5578/mb.23161
18. Polat C, Sironen T, Plyusnina A, et al. Dobrava hantavirus variants found in *Apodemus flavicollis* mice in Kırklareli province, Turkey. *J Med Virol.* 2018;90(5):810-8. doi: 10.1002/jmv.25036
19. Polat C, Ergünay K, Irmak S, et al. A novel genetic lineage of Tula orthohantavirus in Altai voles (*Microtus obscurus*) from Turkey. *Infect Genet Evol.* 2019;67:150-8. doi: 10.1016/j.meegid.2018.11.015
20. Polat C, Ergin Ç, Akkaya Y, Oktem İMA. Investigation of Orthohantavirus seroprevalence in northern rural areas of Denizli Province, Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2020;73(3):201-4. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.330
21. Sarigüzel N, Hofmann J, Canpolat AT, et al. Dobrava hantavirus infection complicated by panhypopituitarism, Istanbul, Turkey, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(7):1180-3. doi: 10.3201/eid1807.111746
22. Sikkema RS, Koopmans MPG. Preparing for emerging zoonotic viruses, "Bamford DH, Zuckerman M (eds): Encyclopedia of Virology, 4. baskı" kitabında s. 256-66, Academic Press, London (2021) doi: 10.1016/B978-0-12-814515-9.00150-8.

23. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Eylem Planı, 1. baskı, Artı6 Medya Tanıtım Matbaa Ltd. Şti., Ankara (2019).
24. Tersago K, Verhagen R, Vapalahti O, Heyman P, Ducoffre G, Leirs H. Hantavirus outbreak in Western Europe: reservoir host infection dynamics related to human disease patterns. *Epidemiol Infect.* 2011;139(3):381-90. doi: 10.1017/S0950268810000956
25. Uyar Y, Caglayik DY, Korukluoglu G, et al. Investigation of hantavirus infections among CCHFV negative cases in the Western Black Sea Region of Turkey. *Acta Med Mediterr.* 2014;30(4):855-60.
26. Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev Med Virol.* 2013;23(1):35-49. doi: 10.1002/rmv.1722