

# Trakya Bölgesi'nde Farelerde Kültür, Seroloji ve Moleküler Yöntemlerle *Francisella tularensis* Varlığının Aranması\*

## Investigation of the Presence of *Francisella tularensis* by Culture, Serology and Molecular Methods in Mice of Thrace Region, Turkey

Gülizar ÜNAL YILMAZ<sup>1</sup>, Şaban GÜRCAN<sup>2</sup>, Beytullah ÖZKAN<sup>3</sup>, Aynur KARADENİZLİ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Hakkari Yüksekova Devlet Hastanesi, Hakkari.

<sup>1</sup> Hakkari Yüksekova State Hospital, Hakkari, Turkey.

<sup>2</sup> Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

<sup>2</sup> Trakya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Edirne, Turkey.

<sup>3</sup> Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Edirne.

<sup>3</sup> Trakya University Faculty of Science, Biology Department, Edirne, Turkey.

<sup>4</sup> Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

<sup>4</sup> Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Turkey.

\* Bu çalışma, ilk yazarın tez çalışması olup, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TÜBAP- 2012/108 numaralı proje ile desteklenmiş ve Uluslararası Tularemi Sempozyumu (19-22 Haziran 2013, Ürgüp, Nevşehir)'nda poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.11.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 17.01.2014

### ÖZET

Tularemi Türkiye'de 1936 yılından beri bildirilen bir hastalıktır ve etkenin insanlara bulaşmasında farelerin rolü üzerinde durulmaktadır. Ancak bugüne kadar etkenin bulaşmasında farelerin rolü kesin olarak gösterilememiştir. Bu çalışmanın amacı, farelerde *Francisella tularensis* varlığının kültür, seroloji ve moleküler yöntemlerle araştırılmasıdır. Çalışma için Trakya Bölgesi'nden, daha önce tularemi olgularının bildirildiği dört köy (Edirne-Demirköy, Kırklareli-Kaynarca, Tekirdağ-Muzruple, Tekirdağ-Sinanlı) seçilmiş ve Aralık 2012 tarihinde bu köylere gidilerek uygun depolar, ahırlar, ambarlar, dere ve kuyu kenarları, yemlikler ve su depoları gibi bölgelere toplam 126 adet canlı fare yakalama kapanları kurulmuştur. Kapanlar bir gece bekletildikten sonra toplanmış ve yakalanan farelerin türleri belirlenmiştir. Canlı olarak yakalanan farelerden anestezi altında kalp kanları alınmış; daha sonra tüm farelerin karaciğer ve dalak dokuları sınıf-2 güvenlik kabini içinde aseptik şartlarda çıkartılmıştır. Bu dokular %5 koyun kanı, %0.1 sistein ve %1 glukoz içeren Francis besiyerlerine ekilmiş; besiyerleri hem normal atmosferde hem de %5

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Şaban Gürçan, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 22030 Edirne, Türkiye. Tel (Phone): +90 284 226 0232, E-posta (E-mail): sabangurcan@trakya.edu.tr

karbondioksit içeren etüvde yedi gün boyunca inkübe edilmiştir. Canlı olarak yakalanıp kanları alınabilen farelerin serumlarında *F.tularensis*'e özgül antikorlar mikroagglütinasyon testi ile araştırılmıştır. Çalışmada ayrıca, farelerin karaciğer ve dalak dokularından DNA izolasyonu yapılmış ve *F.tularensis* ISFtu2 genine özgül primerler ve prob kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Tularemi RT-PCR; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara) uygulanmıştır. Çalışmamızda 11'i canlı olmak üzere toplam 19 adet tarla faresi yakalanmış; bunların 10'unun *Apodemus flavicollis*, yedisinin *Mus macedonicus*, ikisinin ise *Mus musculus* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Farelerin karaciğer ve dalak dokularından yapılan kültürlerin hiçbirisinden *F.tularensis* izole edilememiş; serolojik yöntemin uygulanabildiği 10 fare serumu ise negatif sonuç vermiştir. Buna karşın RT-PCR testi ile, 1936 yılında Türkiye'de ilk tularemi olgularının görüldüğü ve daha sonra başka olgunun bildirilmediği Kaynarca beldesinde yakalanan iki farenin dalak dokusunda pozitiflik tespit edilmiştir. Bunlardan biri canlı olarak yakalanan dişi bir *Mus macedonicus*, diğeri ise ölü olarak yakalanan erkek bir *Apodemus flavicollis*'tir. Yapılan kantitatif değerlendirmede, organ başına bakteri sayısı *Mus macedonicus* için  $4 \times 10^3$  cfu/dalak, *Apodemus flavicollis* için  $4 \times 10^4$  cfu/dalak olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma ile doğal ortamdaki farelerin tularemi etkenini taşıdıkları Türkiye'de ilk kez gösterilmiş ve 1936 yılından bu yana *F.tularensis*'in Kaynarca'da varlığını sürdürerek, salgınlar için potansiyel risk oluşturmaya devam ettiği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** *Francisella tularensis*; tularemi; fare; Trakya bölgesi; Türkiye.

## ABSTRACT

Tularemia is a disease that has been reported in Turkey since 1936. Although mice are considered to have a role in the transmission of *Francisella tularensis* to man, this has not been exactly confirmed yet. The aim of this study was to investigate the presence of *F. tularensis* in mice by using culture, serology and molecular methods. For this purpose, four villages (Edirne-Demirkoy, Kırklareli-Kaynarca, Tekirdag-Muzruplu, Tekirdag-Sinanlı) were selected in Thrace Region of Turkey where tularemia cases had been reported previously. A total of 126 live-catch mouse traps were established in warehouses, barns, areas near wells, water tanks and creeks in the villages in December 2012. Traps were kept overnight and the next day the animals collected were identified at species-level. The live-captured mice were anesthetized and their heart blood samples were obtained. Subsequently, liver and spleen tissues were removed from every mouse under aseptic conditions in the class-2 safety cabinet. These tissues were cultivated in Francis medium containing 5% sheep blood, 0.1% cystein, 1% glucose and incubated for seven days in both normal atmosphere and 5% carbondioxide incubator at 37°C. Tularemia microagglutination test was performed by using the sera which were obtained from live-captured mice. Finally, DNAs were isolated from both liver and spleen tissues of mice, and real-time polymerase chain reaction (Tularemia RT-PCR; Public Health Agency of Turkey, Ankara) were performed. In our study, a total of 19 mice were captured and of these 11 were alive. Ten mice were identified as *Apodemus flavicollis*, seven were *Mus macedonicus* and two were *Mus musculus*. There were no *Francisella tularensis* isolation in the cultures of mice liver and spleen tissues. Serological tests yielded negative results for 10 mice whose serum samples could be obtained. In RT-PCR, positivity were detected in spleen tissues of two mice which were captured from Kaynarca where first tularemia cases in Turkey in 1936 were reported but has no report from then on. One of them was a live female *Mus macedonicus*, and the other was a dead male *Apodemus flavicollis*. In quantitative evaluation, number of microorganism per organ were calculated as  $4 \times 10^3$  cfu/spleen in *Mus macedonicus* and  $4 \times 10^4$  cfu/spleen in *Apodemus flavicollis*. This is the first study in Turkey indicating that the mice in natural environment harbored *F.tularensis*. In conclusion, the results of this study indicated that the agent of tularemia has been retained since 1936 in Kaynarca region and this persistence might present a potential risk for tularemia epidemics.

**Key words:** *Francisella tularensis*; tularemi; mouse; Thrace region; Turkey.

## GİRİŞ

Zoonotik bir hastalık olan tularemi, *Francisella tularensis*'in biyolojik terör ajanı kabul edilmesi, tanı konusunda yaşanan sorunlar, verilen yanlış tedaviler ve son yıllarda ülkemizde olgu sayısının giderek artması nedeniyle çok daha büyük bir önem kazanmıştır. Etkenin bulaş yolu yoğun araştırma konusu olmuş, dünyanın pek çok yerinde farklı kaynaklar suçlanmıştır. Bazı yerlerde kemiricilerle direkt temas sonucu bakteri bulaşırken, bazı bölgelerde bu hayvanların üzerinde yaşayan keneler veya bu hayvanlardan kan emen çeşitli sinekler suçlanmış, bazı kaynaklarda solunum yoluyla bulaştan söz edilmiş, bazı bölgelerde ise kontamine suların kullanımı veya içilmesi sonucu bulaş olduğu kanaatine varılmıştır<sup>1</sup>.

Türkiye'de ilk tularemi bildirimi 1936 yılında Trakya'da Kaynarca deresine yakın bir askeri birlikte olmuş, yapılan araştırmalar sonunda bölgedeki tulareminin çoğunlukla su kaynaklı olduğu düşünülmüştür<sup>2,3</sup>. Askeri garnizonun yakınındaki Kaynarca deresi ve erlerin bu dereye yıkanması, hastalığın daha çok dere çevresindeki köylerde görülmesi ve bu sularla yıkananlarda, pirinç tarlalarında çalışanlarda dikkati çekecek oranda daha sık görülmesi bu görüşü desteklemiştir. Ancak ne sulardan yapılan çalışmalardan ne de doğadan toplanan kene, tavşan gibi hayvanlardan sonuç alınamamış, bakterinin hangi hayvanlarda mevcut olduğu ve suları nasıl kirlettikleri gösterilememiştir<sup>3,4</sup>. Sonraki yıllarda meydana gelen tularemi salgınlarında, etkenin sulardaki varlığına dair kanıtlar elde edilmiş, ancak bunları kontamine eden hayvanlara veya diğer kaynaklara dair yapılan çalışmalarda olumlu bir sonuç alınamamıştır<sup>1,5,6</sup>. Bu çalışmada, ülkemizde tularemi etkeninin insanlara bulaşmasında önemli bir rol oynayan suların kontaminasyonunda farelerin potansiyel rollerinin ortaya çıkarılmasının yanı sıra tularemi açısından riskli bölgelerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma yerel etik komitenin 28.12.2011 tarih ve 2011.11.09 no'lu onayı ile gerçekleştirildi. Çalışma bölgesi olarak; Trakya Bölgesi'nde, 1936 yılında ilk tularemi olgularının bildirildiği ancak daha sonra hiç olgu bildirilmeyen Kırklareli-Kaynarca ve Tekirdağ-Sinanlı, 2005 yılında salgın görülen Edirne-Demirköy ve 2010 yılında son salgının meydana geldiği Tekirdağ-Muzruplu köyleri seçildi. Aralık 2012 tarihinde bu köylere gidilerek; sulak alanlar, dere ve kuyu kenarları, ambarlar, depolar, yemlikler ve çalı içlerine olmak üzere toplam 126 kapan (Sherman tipi canlı yakalama kapanları) yerleştirildi. Gidilen tarihte, köylerdeki hava sıcaklığı gece -5°C ile 7°C, gündüz ise 6°C ile 14°C arasında değişmekte idi.

Kapanlar kurulduktan sonra bir gece beklendi ve ertesi gün toplanan hayvanlar laboratuvara ulaştırıldı. Yakalanan farelerin tür tayini, ilgili uzmanlar tarafından, dış vücut ölçüleri ve renklenme durumları dikkate alınarak yapıldı. Canlı olarak yakalanan farelerden anestezi altında, steril şartlarda kalp kanları alındı ve ayrıca karaciğer ve dalak dokuları çıkartıldı. Dokular dörder eşit parçaya ayrılarak etiketlenmiş steril ependorf tüplerine koyuldu; birer parça kültür ve DNA izolasyonu için ayrıldıktan sonra kalan dokular -80°C'de saklandı.

Kültür için ayrılan doku örnekleri (her hayvan için birer adet karaciğer ve dalak doku-su), sınıf-2 güvenlik kabini içinde 0.5 ml BHI-B (Brain Heart Infusion-Broth) ile ezilerek süspansiyon edildi ve her bir örnek, %5 koyun kanı, %0.1 sistein, %1 glukoz içeren iki adet Francis besiyerine ekildi. Besiyerlerinin biri normal, diğeri %5 CO<sub>2</sub>'li etüve (37°C) kaldırıldı ve bir hafta boyunca, günlük olarak takip edildi. Şüpheli kolonilerden yapılan mikroskopik incelemede, gram-negatif boyanan ve kokobasil olduğu saptanan bakterilere katalaz ve oksidaz testleri yapıldı. Katalaz pozitif, oksidaz negatif olduğu belirlenen izolatların karbonhidratları kullanma, gaz oluşturma, fenilalanin dekarboksilaz, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, üreaz enzim varlıkları, sitratı tek karbonhidrat kaynağı olarak kullanımı, hareket ve indol özelliklerine bakıldı. Üreme kontrolü için, daha önceden iki hastanın klinik örneğinden izole edilmiş ve tanımlanmış olan *F.tularensis* suşları kullanıldı. Aynı besiyerinde ve aynı koşullarda kültürü yapılan kontrol suşlarının, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilenlerde daha belirgin olmak üzere, üçüncü günde üremeye başladığı gözlemlendi.

Serolojik tanı için, hayvanlardan alınan kanların serumları ayrıldı ve iki güne kadar buzdolabında saklandı. Tularemi mikroaglutinasyon testleri, patentli tularemi antijeni (Patent no: TPE-2008 01623 B-Şaban Gürçan) kullanılarak, daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı ve 18-24 saat sonra sonuçlar gözle değerlendirildi<sup>7</sup>.

Moleküler tanı için, mekanik olarak parçalanmış karaciğer ve dalak dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla, "peqGOLD Tissue DNA Mini Kit" (Peqlab, Almanya) kullanıldı ve izolasyon firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Moleküler incelemede, IS*Ftu2* genine özgül primerler ve prob içeren Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kiti (Tularemi RT TaqMan PCR) kullanıldı. PCR karışımı; 1.5 ml'lik ependorf tüpü içine her 4 örnek başına 30 µl Karışım A solüsyonu, 30 µl Karışım B solüsyonu, 30 µl Karışım C solüsyonu ve 1 µl Hot Start DNA polimeraz konularak hazırlandı. Her örnek başına 22.5 µl PCR karışımı PCR tüplerine dağıtıldı ve üzerlerine 2.5 µl doku DNA'sı eklendi. Reaksiyonlar 2.5 µl DNA içeren toplam 25 µl hacimde çalışıldı. Amplifikasyon işlemleri, Exicycler™ 96 Quantitative Real-Time PCR System (Bioneer, ABD) ile gerçekleştirildi. PCR döngüsü 95°C'de 10 dakika denatürasyon sonrasında 40 döngü 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika şeklinde uygulandı. Pozitif kontrol olarak *F.tularensis* NCTC 10857 suşunun 10 kat dilüsyonları, negatif kontrol olarak *Pseudomonas* DNA'sı kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmamızda, araziden örnek temini aşaması kış dönemine denk geldiğinden, olumsuz hava koşullarına bağlı olarak 126 kapanın sadece 19 (%15)'unda tarla faresi yakalanabilmiş; bu farelerin 11'i canlı 8'i ölü olarak ele geçmiştir. Köylerde kurulan kapan sayısı, yakalama oranları, yakalanan farelerin türleri, cinsiyetleri ve canlılık durumu Tablo I'de görülmektedir.

Farelerin doku örneklerinden yapılan kültürlerde, 13 karaciğer ve 11 dalak örneğinde üreme saptanmış, ancak bu bakterilerin tamamının *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla doku örneklerinin hiçbirisinden *F.tularensis* izolasyonu yapılamamıştır.

**Tablo 1.** Köylerde Kurulan Kapan Sayısı, Yakalanan Farelerin Köylere Göre Dağılımı, Tür ve Cinsiyetleri

| Köyler   | Kurulan kapan sayısı<br>(yakalama oranı, %) | Yakalanan fare<br>(canlı fare) sayısı | Tür (cinsiyet-sayı)                                                                                      |
|----------|---------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Demirköy | 38 (7.9)                                    | 3 (0)                                 | <i>Apodemus flavicollis</i> (E-1, D-1)<br><i>Mus macedonicus</i> (E-1)                                   |
| Kaynarca | 25 (48)                                     | 12 (10)                               | <i>Apodemus flavicollis</i> (E-2, D-3)<br><i>Mus macedonicus</i> (E-3, D-2)<br><i>Mus musculus</i> (E-2) |
| Muzruplu | 44 (4.5)                                    | 2 (1)                                 | <i>Apodemus flavicollis</i> (E-2)                                                                        |
| Sinanlı  | 19 (10.5)                                   | 2 (0)                                 | <i>Apodemus flavicollis</i> (D-1)<br><i>Mus macedonicus</i> (E-1)                                        |
| Toplam   | 126 (15)                                    | 19 (11)                               | <i>Apodemus flavicollis</i> (E-5, D-5)<br><i>Mus macedonicus</i> (E-5, D-2)<br><i>Mus musculus</i> (E-2) |

D: Dişi; E: Erkek; *Apodemus flavicollis*: Sarı boyunlu orman faresi; *Mus macedonicus*: Sarı ev faresi;  
*Mus musculus*: Ev faresi.

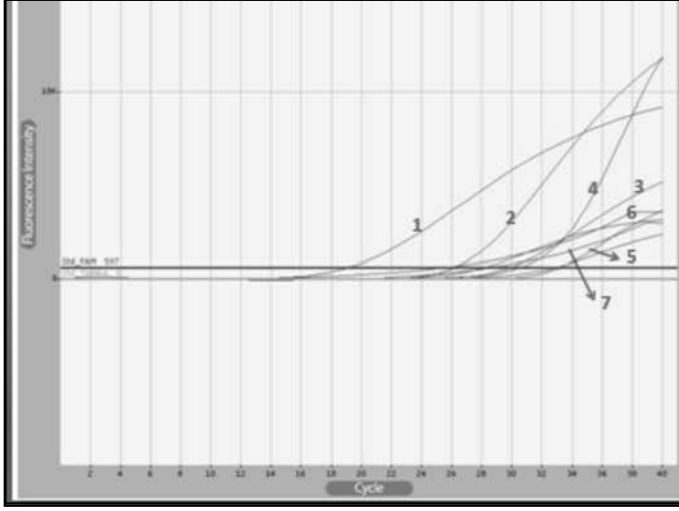
Canlı olarak yakalanan 11 farenin birisinden (Kaynarca örneği) kan alınamadığı için serolojik inceleme 10 hayvandan alınan serum örneğinde yapılabilmiş ve tularemi mik-roaglutinasyon testi ile tümünden negatif sonuç alınmıştır.

Tularemi gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) testi sonucunda, iki fareye ait dalak dokusunda pozitiflik tespit edilmiş (Şekil 1); bunların her ikisinin de Kaynarca'da yakalanan fareler olduğu belirlenmiştir. Bu farelerden birisi canlı olarak yakalanan dişi bir *Mus macedonicus*; diğeri ise ölü olarak yakalanan erkek bir *Apodemus flavicollis*'tir. Bu farelerin karaciğer dokularında ve diğer tüm hayvan dokularında ise RT-PCR ile pozitiflik tespit edilmemiştir. Negatif kontrolde de herhangi bir amplifikasyon saptanmamıştır.

Kantitasyon amacıyla, PCR testinde çalışılan standart *F.tularensis* NCTC 10857 suşu-nun 10 kat dilüsyon sonuçları ile fare dokularından izole edilen DNA sonuçları karşılaştı-rıldığında; *Mus macedonicus*'a ait dalak dokusunun  $10^3$  koloni oluşturan ünite (cfu)/ml, *Apodemus flavicollis*'e ait dalak dokusunun ise  $10^4$  cfu/ml bakteri içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Çalışmanın başında, farelerden çıkarılan karaciğer ve dalak dokuları dörde bölü-nerek, PCR için bu parçalardan sadece bir tanesi çalışmaya alındığından, yapılan hesap-lamada organ başına bakteri sayısı *Mus macedonicus* için  $4 \times 10^3$  cfu/dalak, *Apodemus flavicollis* için  $4 \times 10^4$  cfu/dalak olarak öngörülmüştür.

## TARTIŞMA

Trakya Bölgesi'nde 1936 yılında Kırklareli ve Tekirdağ'da birçok kişiyi etkileyen tulare-mi salgınlarından sonra 1945 yılında Lüleburgaz'da salgın tekrarlamıştır<sup>1</sup>. Uzun süre bu bölgeden başka olgu bildiriminin olmaması, etkenin eradikasyonu lehine bir düşünce yaratmıştır. Ancak 2006 yılında bölgede yapılan bir çalışmada, 90 köyden 1782 kişinin serumunda tularemi antikorları araştırılmış ve 5 olguda seropozitiflik saptanmıştır<sup>9</sup>. Son salgından yaklaşık 60 yıl sonra Bulgaristan sınırında bulunan Edirne-Demirköy'de 10



**Şekil 1.** Pozitif kontroller ile pozitif doku DNA'larının RT-PCR eğrileri  
(Çizgi 1:  $10^5$  cfu/ml pozitif kontrol; Çizgi 2:  $10^4$  cfu/ml pozitif kontrol; Çizgi 3:  $10^3$  cfu/ml pozitif kontrol; Çizgi 4:  $10^2$  cfu/ml pozitif kontrol; Çizgi 5:  $10^1$  cfu/ml pozitif kontrol; Çizgi 6: Birinci fare dalak doku DNA'sı; Çizgi 7: İkinci fare dalak doku DNA'sı).

kişiyi etkileyen salgın ve 2010 yılında Tekirdağ-Muzraplı'da sekiz çocuğu etkileyen diğer bir salgın, etkenin Trakya Bölgesi'nde varlığını sürdürdüğünü göstermektedir<sup>6,8</sup>. Trakya Bölgesi'nde önceki tarihlerde salgın bildirilen bu üç ilden en az bir köy olacak şekilde toplam dört köy çalışma kapsamına alınmıştır. Bu seçimin amacı, farelerden tularemi etkenini saptama ihtimalini artırmak ve etkenin varlığını gösterebilmektir.

*F.tularensis*; tavşan, fare, sincap, kunduz, sıçan, gelincik, tilki, vizon, koyun, kedi, köpek, at, domuz ve daha birçok memeli hayvanı; 25'ten fazla kanatlı, birçok soğukkanlı hayvanı ve balık türlerini etkilemektedir. Ancak epidemiyolojik verilere göre en önemli rezervuar, kemiriciler (fare, sıçan, sincap) ve tavşanlar olup, tularemili insan olgu sayısı ile enfekte hayvan sayısı arasında zamansal paralellik dikkat çekicidir<sup>10,11</sup>. İskandinav ülkelerinde ve Rusya'da fare, tavşan ve yer sincabı gibi kemiricilerin sayısında ki artış ile tularemi olgusu görülme sıklığı arasında yakın ilişki saptanmıştır<sup>1,11,12</sup>. Her ne kadar bilimsel sayılarla ortaya konamasa da, benzer bir durum ülkemizde de görülmüştür. 1930-1936 yılları arasında Kırklareli'nin köyleri ile ilçesi olan Lüleburgaz'da çok sayıda su sıçanı ve diğer kemiricilerin öldüğü izlenmiş; salgınlarla ilgili yapılan gözlemlerde tularemi ile fareler arasında kuvvetli ilişki olduğuna dair bilgilere ulaşılmıştır<sup>4</sup>.

Türkiye'de tulareminin kaynağı olabilecek hayvanlarla ilgili araştırmalar az sayıdadır ve salgınlarda en çok suçlanan hayvan farelerdir<sup>1</sup>. 1998 yılında Bursa Karacabey'de, 2005'te Edirne Demirköy'de ve 2010'da Kırşehir'de meydana gelen salgınlarda, salgından önceki dönemde bölgedeki fare sayısında dikkati çekecek derecede artış olduğu gözlemlenmiştir<sup>6,10,13,14</sup>. Buna karşın yapılan araştırmalarda, bu bölgelerde yakalanan farelerin karaciğer ve dalak örneklerinde kültür ve moleküler yöntemlerle etkeni saptamak mümkün

olamamıştır<sup>6,14</sup>. Dolayısıyla ülkemizde, fareler ile tularemi olguları arasında bir ilişkinin olduğu düşünülmesine rağmen, bugüne kadar bu tez kesin olarak ispat edilememiştir. Sunulan bu çalışmada, farelerin tularemi etkenini taşıdığı ve tularemi için bir potansiyel tehlike oluşturduğu Türkiye’de ilk kez kesin olarak gösterilmiştir.

Trakya Bölgesi’nde 1936 ve 1945 yıllarında iki tularemi salgını tespit edildikten sonra bölgede 60 yıl boyunca başka tularemi olgusu bildirilmemiş olup, bu durumun, etkenin doğadan eradikasyonuna mı yoksa insanların hijyen alışkanlıklarındaki iyileşmeye mi bağlı olduğu açık değildir. Çalışmamızda, Kaynarca deresinin başlangıç noktasındaki Kaynarca beldesinde yakalanan farelerin ikisinde *F.tularensis* DNA varlığının saptanması, farelerin tularemi için kaynak olabileceğini ve etkenin Trakya Bölgesi’nde halen varlığını sürdürdüğünü vurgulamaktadır. Çalışmamızın sonuçları, risk bölgesinden sorumlu yetkili valiliğe ve belde belediye başkanlığına resmi yazıyla bildirilmiş, halkın ve sağlık kuruluşlarının hastalıkla ilgili bilgilendirilmesi istenmiş, gerekli çevresel ve hijyenik önlemlerin planlanması konusunda uyarılar iletilmiştir. Türkiye’de bugüne kadar tularemi salgın bölgelerinde olası kaynaklarla ilgili gerekli araştırmalar ancak bir olgu saptandıktan sonra yapılagelmiştir. Diğer bir deyişle araştırmalar hep salgını takip etmiş ve salgının sonlanması için gerekli önlemler salgın sonrasında gündeme gelmiştir. Bu çalışmada ise, ilk kez bir tularemi salgını ortaya çıkmadan riskli bölge ve olası salgın kaynakları tespit edilmiş; salgın çıkmadan gerekli önlemlerin alınma olanağı elde edilmiştir.

Türkiye’deki tularemi salgınlarının, fare sayılarındaki anormal artış dönemlerinden sonra oluşması, tularemi salgınlarının önceden tahmin edilmesinde önemli olabilir. Sunulan çalışmada, her ne kadar fare popülasyon değerleri araştırılmamış olsa da, popülasyonla ilgili bazı öngörülere ışık tutabilir. Örneğin çalışmamızda en yüksek fare yakalama oranının Kaynarca’da olması, bu bölgedeki fare sayısının daha yüksek olduğunu düşündürmektedir (Tablo I). Tularemi etkeninin yine Kaynarca’daki farelerde saptanmış olması, bu bölgede hijyenik kurallara uyulmadığında yakın bir zamanda tularemi salgınının başlayabileceğinin delili sayılabilir.

Tularemi etkeni ile karşılaşan hayvanlarda, klinik bulgular farklılık göstermekle birlikte, enfeksiyon rodentlerde genellikle ölümle sonlanmaktadır<sup>15-17</sup>. Çalışmamızda, ölü olarak yakalanan sekiz farenin birinde *F.tularensis* DNA’sının ( $4 \times 10^4$  cfu/dalak) tespit edilmesi, bu farenin tularemi nedeniyle ölmüş olabileceğini akla getirmektedir. Buna karşın ölü olarak yakalanan diğer farelerde ne kültür ne de PCR ile tularemi etkeninin tespit edilememesi, ölümlerin tularemiden ziyade, başta soğuk hava koşulları olmak üzere diğer nedenlere de bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, canlı olarak yakalanan farelerin birinde *F.tularensis* DNA’sının saptanması ( $4 \times 10^3$  cfu/dalak), bu hayvandaki bakteri düzeyinin öldürücü olmadığını düşündürmüştür. Nitekim yapılan çalışmalarda, enfeksiyonun bulaşma dozunun düşük ( $10^2$ - $10^3$  cfu/ml) olmasına rağmen, letal dozunun oldukça yüksek ( $10^9$ - $10^{10}$  cfu/organ) olduğu belirtilmektedir<sup>18,19</sup>. Buna göre, PCR ile tularemi etkenini saptadığımız iki farede, etkenin henüz öldürücü dozlara ulaşmadığı ve ölü olarak yakalanan farede, ölümün başka nedenlerle olduğu kanısına varılmıştır.

Tularemi bulaşı ile ilgili olarak dikkati çeken fare türleri arasında; *Arvicola terrestris* (su sıçanı), *Rattus cinsi* sıçanlar, *Apodemus agrarius* (çizgili tarla faresi), *Apodemus flavicollis* (sarı boyunlu orman faresi), *Mus musculus* (ev faresi) ve *Mus macedonicus* (sarı ev faresi) sayılabilir<sup>15</sup>. Ülkemize yakın coğrafyada bulunan bölgelerde yapılan çalışmalarda, Bulgaristan'da 169 tarla faresinden 37'sinin (32 *Rattus rattus*, 5 *Mus musculus*), Kosova'da ise 64 kemiriciden yedisinin (5 *Apodemus agrarius*, 2 *Rattus rattus*) *F.tularensis* ile enfekte olduğu saptanmıştır<sup>10,20</sup>. Türkiye'de hangi fare türlerinin, etkenin bulaşında rol oynadığına dair yapılmış bir çalışma yoktur. Genelde akademik yayınlarda "tarla fareleri" şeklinde geçen ifadeler yer verilmekte, bu nedenle de hangi türlerin tularemi açısından risk taşıdığı tam olarak bilinmemektedir. Sunulan çalışmada *Apodemus flavicollis*, *Mus macedonicus* ve *Mus musculus* türlerine rastlanmıştır ki, bu türlerin tularemi açısından önem taşıdığı bilinmektedir<sup>15</sup>. Etkenin saptandığı iki farenin biri *Apodemus flavicollis*, diğeri ise *Mus macedonicus*'tur.

Tulareminin tanısında altın standart yöntem bakterinin kültürde üretilmesidir; ancak bu yöntemin duyarlılığı düşük (%25) olup, klinik örneklerden *F.tularensis* izolasyon oranı çeşitli çalışmalarda %0 ile %12.5 arasında bildirilmektedir<sup>1,6,21-25</sup>. Bizim çalışmamızda da, yakalanan 19 adet tarla faresinin hiçbirinde *F.tularensis* üretilmemiştir. Kültürlerde üreyen ve *Enterobacteriaceae* türleri olarak tanımlanan bakterilerin ise, gerek kapan içinde doğal ölüm anından sonra işleme alınincaya kadar geçen sürede, gerekse işlemler sırasında oluşan kontaminasyonlardan kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kültür yönteminin uygulanmasındaki sıkıntılar nedeniyle, tularemi tanısında serolojik testler tercih edilmektedir<sup>1</sup>. Ancak henüz antikorların oluşmadığı veya düşük düzeyde olduğu hastalığın ilk haftasında ya da konağa (immün süpresyon gibi) ve yöntem (antijenik farklılıklar gibi) bağlı bazı faktörler varlığında seronegatif sonuç alınabileceği akılda tutulmalıdır<sup>12,26</sup>. Benzer olarak, *F.tularensis*'in kültürde üretildiği ve/veya moleküler yöntemlerle DNA'sının gösterildiği olgularda, serolojik testlerle negatif sonuç elde edildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur<sup>23,27</sup>. Çalışmamızda da, PCR pozitif fare dahil, mikroaglutinasyon testi çalışılan toplam 10 canlı fare serumunun hiçbirinde tularemi için seropozitiflik tespit edilememiştir.

Son zamanlarda *F.tularensis*'in gösterilmesinde, hem kültüre göre daha hızlı sonuçlanan, hem özgüllük ve duyarlılığı daha yüksek olan, hem de laboratuvar personeli için enfeksiyon riski oluşturmeyen moleküler yöntemler kullanılmaktadır<sup>28,29</sup>. Şimşek ve arkadaşlarının<sup>30</sup> yaptığı çalışmada, 154 su örneğinden 17'sinde PCR ile tularemi etkeninin gösterilebilmesine rağmen, bunların sadece dördünde kültürden *F.tularensis* izole edilebilmiştir. Bu araştırmacılar, kültür pozitif tüm örneklerin PCR ile de pozitif bulunduğunu, ayrıca izolasyon başarısızlığı olan diğer örneklerde PCR ile etkenin saptanabildiğini vurgulamışlardır<sup>30</sup>. Benzer şekilde, 2005'teki Demirköy salgınında, kültürden izolasyonun yapılamadığı bir su örneği ile bir olguya ait lenf bezi aspirat örneğinde, PCR ile etkenin gösterilmesi mümkün olmuştur<sup>6</sup>. Sunulan bu çalışmada da, kültür ve serolojik yöntem ile negatif sonuç veren fare örneklerinde etkenin varlığı sadece moleküler yöntemle gösterilebilmiştir. Bu sonuçlar, moleküler testlerin değerinin vurgulanması açısından önemlidir.



Sonuç olarak çalışmamızda, 1936 yılında ilk tularemi olgularının bildirildiği Kaynarca beldesinde yakalanan farelerde etkenin saptanmış olması, bölgede yaşayanlar için ris-kin halen devam ettiğini düşündürmektedir. Bu sebeple, içme ve kullanma sularının klorlanması, su depolarının korunaklı yapılması, kemiricilerin içme ve kullanma sularıyla olan temasının önlenmesi, meyve ve sebzelerin yıkanmadan yenmemesi, doğada ölü bulunan hayvanlara çıplak elle dokunulmaması, doğadan yakalanan hayvanların etlerine direkt temas edilmemesi gibi pek çok hijyenik önlemin alınması gerekli hale gelmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Gürcan Ş. *Francisella tularensis* ve Türkiye’de tularemi. Mikrobiyol Bul 2007; 41(4): 621-36.
2. Plevnelioğlu KH. Memleketimizde tularemi. Tedavi Kliniği ve Laboratuvarı Derg 1936; 6(23): 119-35.
3. Gotschlich E, Berkin T. 1936 yılında Trakya’da tularemiye ait yapılan epidemiyolojik ve bakteriyolojik araştırmalar. Turk Hij Tecr Biyol Derg 1938; 1(1): 115-23.
4. Özel TV. Dr. Talat Vasfi Özel’in 1937 yılı yazında Trakya tularemi tetkikatı. Türk Hij Tecr Biyol Derg 1938; 1(1): 1-30.
5. Kılıç S. A general overview of *Francisella tularensis* and the epidemiology of tularemia in Turkey. Flora 2010; 15(2): 37-58.
6. Gürcan Ş, Eskiocak M, Varol G, et al. Tularemia re-emerging in European part of Turkey after 60 years. Jpn J Infect Dis 2006; 59 (6): 391-3.
7. Gedikoğlu S, Göral G, Helvacı S. Bursa’daki tularemi epidemisinin özellikleri. İnfeksiyon Derg 1990; 4(1): 9-15.
8. Gürcan Ş, Varol Saraçoğlu G, Karadenizli A, et al. Tularemia as a result of outdoor activities for children in the countryside. Turk J Med Sci 2012; 42(6): 1044-9.
9. Dedeoğlu-Kılınç G, Gürcan Ş, Eskiocak M, Kılıç H, Kunduracılar H. Trakya Bölgesinin köylerinde tularemi seroprevalansının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2007; 41(3): 411-8.
10. Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. Emerg Infect Dis 2002; 8(1): 69-73.
11. Mörner T. The ecology of tularemia. Rev Sci Tech 1992; 11(4): 1123-30.
12. Ellis J, Oyston PC, Green M, et al. Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002; 15(4): 631-46.
13. Kılıçturgay K, Gökırmak F, Gedikoğlu S ve ark. Bursa’da tularemi epidemisi. İnfeksiyon Derg 1989; 3(2): 149-56.
14. Kaygusuz S, Arikan O, Azkur K, et al. Epidemia of tularemia in Central Anatolia. J Anim Vet Adv 2010; 9(12): 1702-6.
15. Şahin M. *Francisella tularensis*’in vektörleri ve doğal rezervuarları, s: 139-60. Gürcan Ş (ed), *Francisella tularensis* ve Tularemi. 2009. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
16. Otlu S. Hayvanlarda tularemi araştırmaları ve dünyada durum, s: 161-8. Gürcan Ş (ed), *Francisella tularensis* ve Tularemi. 2009. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
17. Ünver A. Hayvanlarda tularemi, s: 181-4. Gürcan Ş (ed), *Francisella tularensis* ve Tularemi. 2009. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
18. Telford SR 3<sup>rd</sup>, Goethert HK. Toward an understanding of the perpetuation of the agent of tularemia. Front Microbiol 2011; 1: 150.
19. Chen W, Shen H, Webb A, KuoLee R, Conlan JW. Tularemia in BALB/c and C57BL/6 mice vaccinated with *Francisella tularensis* LVS and challenged intradermally, or by aerosol with virulent isolates of the pathogen:

protection varies depending on pathogen virulence, route of exposure, and host genetic background. Vaccine 2003; 21(25-26): 3690-700.

20. Christova I, Gladnishka T. Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. Ann Agric Environ Med 2005; 12(1): 149-52.
21. Evans ME, Gregory DW, Svhafter W, et al. Tularemia: a 30 years experience with 88 cases. Medicine 1985; 64(4): 251-69.
22. Bevanger L, Maeland JA, Naess AI. Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. J Clin Mikrobiol 1988; 26(3): 433-7.
23. Helvacı S, Gedikoglu S, Akalin H, Oral HB. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. Eur J Epidemiol 2000; 16(3): 271-6.
24. Celebi G, Barüñ F, Ayoğlu F, et al. Tularemia, a reemerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses. Jpn J Infect Dis 2006; 59(4): 229-34.
25. Gurcan S, Karabay O, Karadenizli A, et al. Characteristics of the Turkish isolates of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis 2008; 61(3): 223-5.
26. Schmitt P, Splettstößer W, Porsch Özcürümez M, et al. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. Epidemiol Infect 2005; 133(4): 759-66.
27. Clarridge JE, Raich TJ, Sjostedt A, et al. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. J Clin Microbiol 1996; 34(8): 1995-2000.
28. Lamps LW, Havens JM, Sjostedt A, Page DL, Scott MA. Histologic and molecular diagnosis of tularemia: a potential bioterrorism agent endemic to North America. Mod Pathol 2004; 17(5): 489-95.
29. Junhui Z, Ruifu Y, Jianchun L, et al. Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol 1996; 45(6): 477-82.
30. Şimşek H, Taner M, Karadenizli A, Ertek M, Vahaboğlu H. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(9): 2353-7.