

# Türkiye’de İzole Edilen *Francisella tularensis* Alt Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi

## Determination of the Subspecies of *Francisella tularensis* Isolated in Turkey by Molecular Methods

Bekir ÇELEBİ<sup>1</sup>(ID), Zekiye BAKKALOĞLU<sup>2</sup>(ID), Özlem ÜNALDI<sup>2</sup>(ID), Alper KARAGÖZ<sup>3</sup>(ID), Selçuk KILIÇ<sup>2</sup>(ID), Rıza DURMAZ<sup>4</sup>(ID)

<sup>1</sup> Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı, Ankara.

<sup>1</sup> Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Department of Zoonotic and Vector-borne Diseases, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı, Ankara.

<sup>2</sup> Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Department of Microbiology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Uşak Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uşak.

<sup>3</sup> Uşak University Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, Division of Microbiology, Uşak, Turkey.

<sup>4</sup> Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>4</sup> Yıldırım Beyazıt University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

**Makale Atfı:** Çelebi B, Bakkaloğlu Z, Ünalı Ö, Karagöz A, Kılıç S, Durmaz R. Türkiye’de izole edilen *Francisella tularensis* alt türlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2020;54(1):1-10.

### ÖZ

*Francisella tularensis*, gram-negatif, kokobasil şeklinde olan fakültatif hücre içi bakteridir. İnsanlarda zoonotik bir hastalık olan tularemeye neden olur. *F.tularensis* alt tür *tularensis*, *F.tularensis* alt tür *holarctica*, *F.tularensis* alt tür *mediasiatica* ve *F.tularensis* alt tür *novicida* olmak üzere insanlarda virülansı farklı dört alt tür içermektedir. *F.tularensis* alt tür *tularensis* virülansı en yüksek alt tür olup neden olduğu olgularda mortalite oranı yüksektir. Ülkemizde bugüne kadar bildirilmiş olan *F.tularensis* alt tür *holarctica*’nın virülansı, alt tür *tularensis*’e göre daha düşük olup tedavi edilmeyen hastalarda ölüm nadiren görülmektedir. Eritromisin direnci, glikoz-gliserol fermentasyon özelliklerine göre *F.tularensis* alt tür *holarctica*’nın biovar I, biovar II ve biovar *japonica* olmak üzere üç biovarı bulunmaktadır. *F.tularensis* alt tür *mediasiatica* yalnız Orta Asya ülkelerinin birkaçında bildirilmiş olup virülansı *F.tularensis* alt tür *holarctica*’ya benzerlik göstermektedir. *F.tularensis* alt tür *novicida* immün sistemi yeterli bireyler için avirulan olup bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde enfeksiyona neden olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, 2009-2014 yılları arasında klinik örneklerden, içme sularından ve bir kemiriciden elde edilen toplam 259 adet *F.tularensis* izolatının ve klinik örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *F.tularensis* DNA’sı pozitif bulunan 517 örneğin ait olduğu alt türün belirlenmesi amaçlanmıştır. *F.tularensis*’in RD1 (Region Difference) bölgesine özgül primerler kullanılarak konvansiyonel PCR uygulanmıştır. PCR amplifikasyon ürününün büyüklüğündeki farklılığa bağlı olarak alt türler arası ayırım yapılmıştır. Çalışmamızda 764 örneğin, 922 baz çift (bp) amplifikasyon ürünü veren *F.tularensis* alt tür *holarctica* olduğu gözlenmiştir. Örneklerimizden, bir su izolatu ve

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Bekir Çelebi, Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Daire Başkanlığı, Adnan Saygun Caddesi No: 55, 06100, Sıhhiye, Ankara, Türkiye.  
Tel (Phone): +90 312 565 6382, E-posta (E-mail): rvetbekir@yahoo.com

11 lenf aspiratından elde edilen DNA örneğinin *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*’ya ait olduğu belirlenmiştir. Su izolatinin RD1 bölgesine ait amplifikasyon ürününe yönelik DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizinden elde edilen 1136 bp dizilimi Genbank verileri ile karşılaştırıldığında, *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* (FCS075 strain-erişim numarası AF469618) ile %100 uyumlu bulunmuştur. Bu izolatin tüm genom sekansı da yapılarak GenBank’a kayıt edilmiş ve CP007148 erişim numarası alınmıştır. Çalışmamızda kullanılan örneklerin hiçbiri diğer alt türlere ait çıkmamıştır. *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* pozitif belirlenen 11 lenf aspiratı örneği merkezimize Ankara (n= 1), Kayseri (n= 1) ve Afyon (n= 9) illerinden gönderilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, ilk defa *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*’nın Afyon ilinde bir köyde tularemi salgınına neden olduğunu ve farklı iki ilde de sporadik olarak gözlemlendiğini ortaya koymuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Francisella tularensis*; alt türler; biovar *japonica*.

## ABSTRACT

*Francisella tularensis* is a gram-negative, coccobacillus, facultative intracellular bacteria and causes a zoonotic disease, tularemia in humans. *F.tularensis* has four subspecies, which have different virulences for humans as *F.tularensis* subsp. *tularensis*, *F.tularensis* subsp. *holarctica*, *F.tularensis* subsp. *mediasiatica* and *F.tularensis* subsp. *novicida*. *F.tularensis* subsp. *tularensis* is the most virulent subspecies and mortality rate is high in human cases. *F.tularensis* subsp. *holarctica*, which has been reported in our country to date, has lower virulence than that of subsp. *tularensis*, and causes rare lethality among untreated patients. According to the erythromycin resistance and the properties of glucose-glycerol fermentation, *F.tularensis* subsp. *holarctica* has three biovar as biovar I, biovar II and biovar *japonica*. *F.tularensis* subsp. *mediasiatica* has been reported only in a few central asian countries and its virulence is similar to the *F.tularensis* subsp. *holarctica*. *F.tularensis* subsp. *novicida* is avirulent for immunocompetent individuals but has been observed to cause infection in immunocompromised individuals. The aim of this study was to determine the *F.tularensis* subspecies in 259 *F.tularensis* strains isolated from clinical specimens, drinking water and a rodent sample and 517 *F.tularensis* PCR-positive DNA isolated from clinical specimens between years 2009 and 2014. Conventional PCR was performed using primers specific for the RD1 (Region Difference) region of *F.tularensis*. Subspecies were differentiated depending on the difference in PCR amplification product size. In our study, *F.tularensis* subsp. *holarctica* was detected in 764 samples yielding 922 base pair (bp) amplification product. The DNA samples obtained from one water and 11 lymph aspirates were determined as *F.tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica*. The DNA sequence analysis of the amplification product of the RD1 region of the isolate from water sample was determined. The 1136 bp nucleotide sequence obtained from the DNA sequence analysis was 100% similar to *F.tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* (FCS075 strain-accession number AF469618) when compared with GenBank data. The whole genome sequence of this isolate was also determined and recorded to GenBank with accession number CP007148. None of the samples used in our study belonged to other sub-species. *F.tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* positive 11 lymph aspirate samples were sent to our center from Ankara (n= 1), Kayseri (n= 1) and Afyon (n= 9) provinces. The results of the current study revealed that *F.tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* caused a tularemia outbreak in a village in Afyon province at first time and it was observed sporadically in two other different provinces.

**Keywords:** *Francisella tularensis*; subspecies; biovar *japonica*.

## GİRİŞ

*Francisella tularensis* gram-negatif, kokobasil şeklinde, fakültatif hücre içi bakteridir. İnsanlarda farklı klinik tablolarla kendini gösteren, zoonotik hastalık olan tularemiye neden olmaktadır. Etken doğada birçok hayvanda belirlenmişken, temel rezervuarı ve vektörleri yabani tavşanlar, birçok kemirici türü, keneler ve bazı sokucu sinekler olduğu bildirilmiştir<sup>1,2</sup>. Etkenin insanlara bulaşması, enfekte hayvanlara temas veya enfekte hayvanların

etlerinin tüketilmesi, bu hayvanların kontamine ettiği suların kullanılması, aerosolize olmuş etkenin solunum yolu ile alınması ve vektör konumundaki kene ve sokucu sineklerle ısırılma yolu ile olmaktadır<sup>2</sup>. Ülkemizde enfeksiyon kaynağının çoğunlukla kırsal alanlardaki kontamine içme ve kullanma suları olduğu belirlenmiştir<sup>3-6</sup>. *F.tularensis*, kategori A biyoterör ajanları arasında yer almaktadır ve virülansları farklı olan *F.tularensis* alt tür *tularensis*, *F.tularensis* alt tür *holarctica*, *F.tularensis* alt tür *mediasiatica* ve *F.tularensis* alt tür *novicida* olmak üzere dört alt tür içermektedir<sup>7</sup>. *F.tularensis* alt tür *tularensis* insanlar için virülansı en yüksek alt tür olup neden olduğu tifoidal formu hastalarda %30-60 arasında değişen mortalite oranına sahiptir. İnsanlarda enfektif doz olarak 10-15 bakterinin aerosol yolla veya subkutan yolla alınmasının yeterli olduğu bildirilmiştir<sup>2</sup>. Doğada tavşanlar rezervuar, keneler ve geyik sinekleri vektör konumundadır. *F.tularensis* alt tür *holarctica* virülansı alt tür *tularensis*'e göre daha düşük olup tedavi edilmeyen hastalarda ölüm nadiren görülmektedir<sup>1,7</sup>. Eritromisin direnci, glukoz-gliserol fermentasyon özelliklerine göre *F.tularensis* alt tür *holarctica*'nın biovar I, biovar II ve biovar *japonica* olmak üzere üç biovarı bulunmaktadır<sup>2,8</sup>. Doğada bu alt tür için daha çok kemiriciler rezervuar, sivrisinek ve keneler vektör olarak bildirilmektedir. Bu alt türün insanlara bulaşmasında kontamine içme ve kullanma suları önemli rol oynamaktadır<sup>7</sup>. *F.tularensis* alt tür *mediasiatica* yalnız Orta Asya ülkelerinden bildirilmiş olup virülansı *F.tularensis* alt tür *holarctica*'ya benzerlik göstermektedir<sup>9</sup>. *F.tularensis* alt tür *novicida* immün sistemi yeterli bireyler için avirülan olup immün sistemi yetersiz bireylerde enfeksiyona neden olduğu gözlenmiştir. *F.tularensis* alt tür *novicida*'nın alt tür olarak değil de *Francisella* cinsinin bir türü olarak değerlendirilmesi tartışılmaktadır<sup>7</sup>. *F.tularensis* alt türlerinin ayrımı, önceleri biyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılırken moleküler tekniklerin geliştirilmesiyle moleküler yöntemler ile yapılmaya başlanmıştır<sup>8,10-13</sup>.

Ülkemizde tularemi ilk kez 1936 yılında tespit edilmiş olup günümüze kadar birçok tularemi salgını bildirilmiştir<sup>1,14,15</sup>. Ülkemizde son yıllarda laboratuvar tanı imkanlarının gelişmesi sonucu klinik ve çevresel örneklerden *F.tularensis*'in izolasyonuna ve moleküler yöntemlerle tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır. *F.tularensis*'in virülansı farklı olan alt türlerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalarda kısıtlı sayıda örnekten alt tür tanımlaması bildirilmiştir<sup>4,5,16-18</sup>.

Bu çalışmada, moleküler yöntemler kullanılarak, ülkemizin değişik bölgelerinden sağlanan klinik ve çevresel örneklerden elde edilen *F.tularensis* izolatlarının ve klinik örneklerde *F.tularensis* polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) pozitif DNA'ların hangi alt türe ait olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### *F.tularensis* İzolatlarının DNA İzolasyonu

Tularemi referans laboratuvarına çeşitli illerden (Resim 1) gönderilen klinik ve çevresel örnekler kültür işlemine alındı. Klinik örnekler antibiyotikli, %9 at kanlı, sistein kalp infüzyon agara direkt inoküle edilerek %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Çevresel



35 döngü ve 72°C'de 5 dakika son uzama şeklinde uygulandı. PCR amplifikasyon ürünleri %1.5 agaroz jelde yürütülerek değerlendirildi. Broekhuijsen ve arkadaşları<sup>12</sup> alt türler için, *F.tularensis* alt tür *tularensis* 1522 bp, *F.tularensis* alt tür *holarctica* 922 bp, *F.tularensis* alt tür *mediasiatica* 1453 bp, *F.tularensis* alt tür *novicida* 3322 bp ve *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* 1135 bp uzunluğunda amplifikasyon ürünü gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda *F.tularensis* alt tür *tularensis* Schu4 suşu ve *F.tularensis* alt tür *holarctica* LVS suşu (NCTC 10857) DNA'ları pozitif kontrol olarak kullanıldı. Elektroforez değerlendirilmesinde mevcut pozitif kontrollerin amplifikasyon ürünü uzunluğundan farklı amplifikasyon ürünleri gözlemlendiğinde, literatürde verilen amplifikasyon uzunluklarına göre değerlendirildi ve doğrulama için DNA dizi analizi ve tüm genom dizilemesi uygulandı.

### DNA Dizi Analizi

Doğrulama için sadece su izolatına DNA dizi analizi ve tüm genom sekanslaması uygulandı. PCR amplifikasyon ürünlerini saflaştırmak için, Agencourt Ampure saflaştırma kiti (Beckman Coulter, Beverly, ABD) kullanıldı. Beckman Coulter 8000 Sanger dizileme cihazı (Beckman Coulter, Beverly, ABD) ve Dye Terminator Dizileme Kiti (Beckman Coulter, Beverly, ABD) kullanılarak çift yönlü nükleotit dizisi elde edildi. DNA dizi analizi verileri Basic Local Alignment Search Tool (Blast version 2.0) programı kullanılarak GenBank verileri ile karşılaştırıldı.

### Tüm Genom Dizileme

Genomik DNA konsantrasyonu Qubit 2.0 florometri cihazı ile Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) kiti kullanılarak ölçüldü ve yeni nesil dizileme uygulamalarında gerekli başlangıç genomik DNA miktarı 100 ng olacak şekilde ayarlandı. Yarı iletken temelli tüm genom dizileme "Ion Personal Genome Machine™ (PGM)" sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın yönergelerine göre yapıldı. Tüm genom kütüphanesi oluşturmak için gerekli enzimatik fragmentasyon ve adaptör ligasyonu "Ion Xpress Plus fragment library kit" (Life Technologies, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. 200 bp okuma yapabilmek için hedeflenen 350 bp büyüklüğündeki DNA fragmanları, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile "E-Gel® SizeSelect 2%" (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti ile belirlendi. Hazırlanan genomik kütüphane konsantrasyonu 100 pM olacak şekilde sulandırıldıktan sonra kalıp hazırlama, emülsiyon PCR ve iyon küre partikülleri (ion sphere particle-ISP)'nin zenginleştirilmesi reaksiyonlarını gerçekleştirmek için "Ion One Touch 200 Template kit v2" (Life Technologies, CA, ABD) kullanıldı. Ion PGM 200 Sequencing kit (Life Technologies, CA, ABD) kullanılarak dizileme reaksiyonu ve yürütme işlemi Ion 314 çip üzerinde üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda yapıldı. Yeni nesil dizileme verilerini analiz etmek, hizalamak ve birleştirmek için CLC Genomics Workbench 7.0 programı kullanıldı (CLC Bio, Qiagen, Aarhus, Danimarka).

### BULGULAR

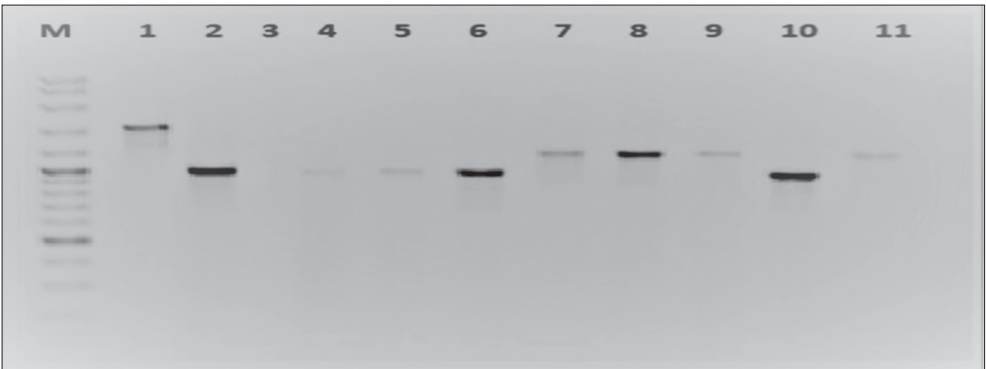
Bu çalışmada, 2009-2014 yılları arasında, klinik örneklerden, içme sularından ve *Microtus guentheri* isimli bir kemiriciden izole edilen toplam 259 *F.tularensis* izolatu ve klinik ör-

neklerde *F.tularensis* PCR pozitif 517 DNA kullanılmıştır. Kullanılan izolatların hangi klinik örnekten izole edildiği Tablo 1'de, izolatların ve klinik örneklerden elde edilen *F.tularensis* DNA'larının hangi illerden sağlandığı, hangi ile ait kaç pozitif örnek kullanıldığı, pozitif örnek yoğunluğuna bağlı olarak harita renklendirilerek Resim 1'de verilmiştir. Sayı belirtilmeyen ve renklendirilmeyen illerden moleküler çalışmalarda kullanılabilecek örnek gelmediği için boş bırakılmıştır.

RD1 primerleri kullanılarak uygulanan konvansiyonel PCR amplifikasyon ürünleri jel elektroforezde yürütülerek değerlendirilmiştir. Kullandığımız iki alt türe ait pozitif kontrollerimiz, *F.tularensis* alt tür *tularensis* 1522 bp, *F.tularensis* alt tür *holarctica* 922 bp uzunluğunda amplifikasyon ürünü vermiştir (Resim 2). Çalışmamızda 764 örneğin, 922 bp amplifikasyon ürünü veren *F.tularensis* alt tür *holarctica* olduğu gözlenmiştir. Örneklerimizin 12'sinde yaklaşık 1150 bp uzunluğunda amplifikasyon ürünü belirlenmiş ve bu örneklerin kaynak literatür bilgisine göre *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* olduğu düşünülmüştür. *F.tularensis* RD1 bölgesi PCR sonrasında 12 örneğin *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* olduğuna karar verilmiştir (Resim 2).

**Tablo 1.** Çalışmada Kullanılan *F.tularensis* İzolatlarının ve Pozitif DNA Örneklerinin Elde Edildiği Klinik Örnekler

| <i>F.tularensis</i> izolatlarının elde edildiği klinik örnekler (n= 259) |                 |                            |             |                |             |          | <i>F.tularensis</i><br>DNA<br>(n= 517) |
|--|-----------------|----------------------------|-------------|----------------|-------------|----------|--|
| Lenf aspiratı  | Boğaz sürüntüsü | Cöz konjunktival sürüntüsü | Kan kültürü | Yara sürüntüsü | İçme suları | Kemirici | Lenf aspiratı                          |
| 68   | 135             | 6                          | 2           | 1              | 46          | 1        | 517                                    |



**Resim 2.** *F.tularensis* RD bölgesinin PCR amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezde görüntüsü. M: Moleküler ağırlık belirteci; 1: Pozitif kontrol *F.tularensis* subsp. *tularensis* (Shcu suşu) 1522 bp; 2: Pozitif kontrol *F.tularensis* subsp. *holarctica* (LVS suş NCTC 10857) 922 bp; 3: Negatif kontrol; 4,5,6,10: *F.tularensis* subsp. *holarctica* pozitif belirlenen klinik örnek DNA'ları; 7,8,9,11: *F.tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* pozitif belirlenen klinik örnek DNA'ları.

Bu örneklerden bir tanesi su izolatından ve 11'i lenf aspiratından elde edilen DNA örnekleridir. Ankara Güdül ilçesi kırsal alanında sudan izole edilen örneğin RD1 bölgesi yaklaşık 1150 bp amplifikasyon ürününün DNA dizi analizi yapılmıştır. Çift yönlü yapılan DNA dizi analizinden elde edilen 1136 bp nükleotit diziliş Genbank verileri ile karşılaştırıldığında erişim numarası AF469618 *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* (FCS075 suşu) ile %100 uyumlu bulunmuştur. İzolatımıza ait nükleotit dizilimi GenBank'a kayıt edilerek **JX436321** erişim numarası alınmıştır. Bu izolatın tüm genom dizilemesi de yapılarak GenBank'a kayıt edilmiş ve CP007148 erişim numarası alınmıştır. Çalışmamızda kullanılan örneklerin hiçbirisi diğer alt türlere ait çıkmamıştır.

*F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* olarak belirlenen örneklerin ülkemizde lokalizasyon alanları değerlendirilmiştir. Su izolatımız Ankara Güdül ilçesinin kırsal alanında bölge halkı tarafından kısıtlı kullanımı olan fakat bir hastanın filyasyon çalışmasında içme kullanım suyu olarak kullandığını beyan ettiği bir kaynak suyundan izole edilmiştir. *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* pozitif belirlenen 11 lenf aspiratı örneği Ankara (n= 1), Kayseri (n= 1) ve Afyon (n= 9) illerinden gönderilmiştir ve iller Resim 1'de yıldız ile işaretlenmiştir. Ülkemizde *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*'nın Afyon ilinde bir köyde tularemi salgınına neden olduğu ve farklı iki ilde de sporadik olarak görüldüğü izlenmiştir.

## TARTIŞMA

*F.tularensis* alt türlerinin virülans farklılıklarının yanında bulaş yolları, insanlarda ve hayvanlarda oluşturdukları klinik tabloları ve coğrafi lokalizasyonları da farklılık gösterebilmektedir. En virülan alt tür olan *F.tularensis* alt tür *tularensis*'in aerosol yolla bulaşmasıyla gelişen pnömonik tularemi formu ile kene ısırmasıyla gelişen tifoidal tularemi formunun mortalitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu özelliğinden dolayı biyoterör etkeni kategorisinde değerlendirilmektedir<sup>2,7</sup>. Enfektif doz 50 (ED<sub>50</sub>)'nin insanlar, fareler, kobaylar ve tavşanlarda 10 bakteriden az olduğu bildirilmiştir. Coğrafi lokalizasyonu Kuzey Amerika kıtası olarak bildirilmektedir<sup>2</sup>. Ancak 1998 yılında Slovakya'da pire ve akarlarda *F.tularensis* alt tür *tularensis* izolasyonu bildirilmiştir<sup>21</sup>. Daha sonra yapılan genotipik çalışmalarda bu izolatların Amerika Birleşik Devletleri'nde laboratuvarında elde edilen mutant Schu4 suşu ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların kaynağının insan eli ile bulaşma olduğu düşünülmektedir<sup>22</sup>. *F.tularensis* alt tür *holarctica* daha az virülan olup insanlara daha çok içme suları, sokucu sinekler ve keneler tarafından bulaşmaktadır<sup>2,7</sup>. İnsanlarda oluşturdukları klinik form, bulaş yolu oral yol ise orofarengeal form ve takibinde ülseroglandüler forma dönüşen bir klinik tablo, kene veya sokucu sineklerle bulaş olmuşa glandüler form şeklinde ortaya çıkmaktadır<sup>1</sup>. Ülkemizdeki olguların çoğu orofarengeal tularemi klinik tablosunda olup su kaynaklı enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir<sup>5,16,17</sup>. Nadiren kene kaynaklı glandüler tularemi klinik formu da bildirilmiştir<sup>23</sup>. *F.tularensis* alt tür *holarctica*'nın ED<sub>50</sub> değeri fare ve kobaylar için 10 bakteriden azken insanlarda 10<sup>3</sup> bakteriden az, tavşanlarda ise 10<sup>6</sup> bakteriden fazla olduğu belirlenmiştir. Coğrafi lokalizasyonu kuzey yarım kürede Avrupa ve Asya'da daha yaygınken Kuzey Amerika'da daha az bildirilmiştir<sup>2</sup>. *F.tularensis*

alt tür *mediasiatica* virülansı alt tür *holarctica* ile benzerlik göstermektedir. Orta Asya ülkelerinden Kazakistan, Türkmenistan, Özbekistan ve Rusya Federasyonu Altay bölgesinde bildirilmiş olup başka coğrafyalarda bildirimine ilişkin bilgi bulunmamaktadır<sup>9</sup>. *F.tularensis* alt tür *novicida* bildirimine ise oldukça sınırlıdır<sup>2</sup>. Ülkemizde *F.tularensis* alt türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda sınırlı sayıda örnek kullanılmıştır<sup>4,5,17,18</sup>. Gürçan ve arkadaşları<sup>18</sup> “multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)” yöntemi ile iki izolatın *F.tularensis* alt tür *holarctica* olduğunu bildirmişlerdir. Kılıç ve arkadaşları<sup>4</sup> “single nucleotide polymorphisms (SNP)” yöntemi ile 40 örnek çalışmışlar ve örneklerin *F.tularensis* alt tür *holarctica* olduğunu saptamışlardır. Söz konusu çalışmada 776 örnek konvansiyonel PCR yöntemi ile çalışılmış ve örneklerin hepsinin *F.tularensis* alt tür *holarctica* olduğu belirlenmiştir.

*F.tularensis* alt tür *holarctica*’nın biovar I (E<sup>S</sup>-Eritromisin duyarlı), biovar II (E<sup>R</sup> Eritromisin dirençli) ve biovar *japonica* (E<sup>S</sup>) olmak üzere üç biovarı bulunmaktadır. Biovarlar eritromisin dirençlerine, glukoz ve gliserol fermentasyon özelliklerine göre ayrılmaktadır. Virülans farkları gözlenmemiştir. Coğrafi lokalizasyonlarına göre biovar I ve II kuzey yarım kürede dağılım gösterirken, biovar *japonica*’nın sadece bir ada ülkesi olan Japonya’da görüldüğü bildirilmektedir<sup>2,7,10</sup>. Bu çalışmanın başlangıcı ile 2011 yılında kaynak suyundan izole ettiğimiz **PHIT-FT049 Güdül** suşunun *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* olduğu, 2012 yılında X. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresinde Çelebi ve arkadaşları<sup>24</sup> tarafından sunulmuş ve böylece *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*’nın Japonya ile sınırlı olmadığı ilk defa bildirilmiştir. Kılıç ve arkadaşları<sup>25</sup> 2013 yılında *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica* **PHIT-FT049 Güdül** suşunun antibiyotik duyarlılık testlerini çalışarak eritromisin duyarlılığını belirlemişlerdir. Wang ve arkadaşları<sup>26</sup> 2014 yılında SNP yöntemi ile *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*’nın Çin’de de varlığını üç izolatla göstermişlerdir. Kılıç ve arkadaşları<sup>4</sup> 2015 yılında SNP ve multilokus varyant analizi (MLVA) yöntemleri ile **PHIT-FT049 Güdül** suşunun Japonya izolatlarıyla benzerliğini ortaya koymuşlar ve filogenetik değerlendirmede Japonya izolatlarının Asya orijinli olma ihtimalini bildirmişlerdir. En son Eden ve arkadaşları<sup>27</sup> 2017 yılında Avustralya’da bir izolasyon ile *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*’nın varlığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada, *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*’nın ülkemizde Ankara, Kayseri ve Afyon illerinde toplam 12 örnekte tespit edilirken, insanlarda tularemi salgınına da neden olduğu gözlenmiştir.

*F.tularensis* alt türlerinin virülans farklılıklarına bağlı farklı klinik tablolar göstermeleri ve biyoterör etkeni de olmalarına bağlı olarak laboratuvar tanıları önemlidir. Laboratuvar tanısında antijenik yapılarının benzer olmasından dolayı serolojik olarak ayrılamamaktadırlar. Kültür işlemlerinde etkenin geç ve güç üremesinden dolayı her zaman izolasyon mümkün olmayabilir. İzolatların alt tür olarak tanımlanmalarında biyokimyasal testler ve deney hayvanı inokülasyonları yöntemleri kullanılmıştır<sup>2,7</sup>. Bu yöntemlerin uygulanması için donanımlı laboratuvar ve tecrübeli laboratuvar çalışanı gereksiniminin yanında bu yöntemlerin zaman alıcı süreçlerinin olması dezavantajları olarak ortaya çıkmaktadır. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, MLVA, SNP ve konvansiyonel PCR gibi moleküler yöntem-



lerle daha hızlı alt tür tanımlamaları geliştirilmiştir. MLVA ve SNP yöntemleri izolatların genotipik özelliklerini moleküler epidemiyolojik verileriyle ortaya koyan yöntemlerdir<sup>7,22,28</sup>. Bu yöntemler maliyetli olup aynı zamanda biyoinformatik bilgisi ve teknik donanım ihtiyacı gerektirmektedir. *F.tularensis* alt türlerinin belirlenmesinde basit ve kolay bir yöntem olan konvansiyonel PCR yöntemi günümüzde birçok laboratuvarında kullanılabilir bir yöntemdir. Bu çalışmada *F.tularensis*'in RD1 bölgesinin alt tür ayırımı özelliğinden yararlanılarak konvansiyonel PCR yöntemi ile ülkemizdeki *F.tularensis* alt türlerinin belirlenmesine yönelik geniş kapsamlı bir çalışma yapılmıştır.

Ülkemizde belirlenen *F.tularensis* alt tür *holarctica* biovar *japonica*'nın bu coğrafyada gözlenmesinin nedeni üzerine yapılabilecek yorumların, bugünkü veriler ışığında ihtimal düzeyinde olacağı düşünülmektedir. Küreselleşen dünyada, ticari faaliyetler, insan hareketleri, bunların paralelinde etkenin doğal rezervuarları olan kemiricilerin hareketleri etkenin yayılımına etki edebildiği gibi kasıtlı olarak insan eli ile salınımlar da söz konusu olabilir. Önemli bir patojen olan *F.tularensis*'in ülkemizdeki biyolojik döngüsünün, biyolojik ve genotipik özelliklerinin belirlenmesiyle neden olduğu hastalığa yönelik alınabilecek kontrol ve eliminasyon programlarına katkı sağlayabilmesi için bu konudaki çalışmaların devamının önemli olduğu düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Kılıç AU, Doğanay M. Tularemia: a re-emerging disease. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2013;60:275-80.
2. Gürçan S. Epidemiology of tularemia. Balkan Med J 2014;31(1):3-10.
3. Aktas D, Celebi B, Isik ME, Tutus C, Ozturk H, Temel F, et al. Oropharyngeal tularemia outbreak associated with drinking contaminated tap water, Turkey, July-September 2013. Emerg Infect Dis 2015;21(12):2194-6.
4. Kılıç S, Birdsell DN, Karagöz A, Çelebi B, Bakkaloğlu Z, Arikan M, et al. Water as source of *Francisella tularensis* infection in humans, Turkey. Emerg Infect Dis 2015;21(12):2213-6.
5. Kılıç AU, Kılıç S, Sencan I, Sentürk GÇ, Gürüz Y, Tütüncü EE, et al. İç Anadolu Bölgesinde *Francisella tularensis* alt tür *holarctica*'ya bağlı su kaynaklı bir tularemi salgını. Mikrobiyol Bul 2011;45(2):234-47.
6. Boz A, Aktuna G, Özgülcü Ş, Sezgin B, Temel F, Çelebi B. Afyonkarahisar ili Dinar ilçesinde 2015 yılı Ocak ayında görülen tularemi vakaları. Turk Hij Den Biyol Derg 2016;73(3):233-44.
7. Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. Ann N Y Acad Sci 2007;1105:30-66.
8. Sandström G, Sjöstedt A, Forsman M, Pavlovich NV, Mishankin BN. Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the Central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. J Clin Microbiol 1992;30(1):172-5.
9. Timofeev V, Bakhteeva I, Titareva G, Kopylov P, Christy D, Mokrievich A, et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. PLoS One 2017;5;12(9):e0183714.
10. Olsufjev NG, Meshcheryakova IS. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. Int J Syst Bacteriol 1983;33(4):872-4.
11. Marchette NJ, Nicholes PS. Virulence and citrulline ureidase activity of *Pasteurella tularensis*. J Bacteriol 1961;82:26-32.

12. Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, Byström M, Eriksson U, Larsson E, et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F.tularensis* subsp. *tularensis*. J Clin Microbiol 2003;41(7):2924-31.
13. Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M, et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J Bacteriol 2004;186(17):5808-18.
14. Gotschlich E, Berkin T. 1936 yılında Trakya'da tularemiye ait yapılan epidemiyolojik ve bakteriyolojik araştırmalar. Türk Hij Den Biyol Derg 2007;64(1):71-5.
15. Celebi G, Baruönü F, Ayoğlu F, Cinar F, Karadenizli A, Uğur MB, 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.
16. Uyar M, Cengiz B, Ünlü M, Çelebi B, Kılıç S, Eryılmaz A. Orta Anadolu Bölgesi illerinden hastanemize başvuran orofaringeal tularemi olgularının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2011;45(1):58-66.
17. Akıncı E, Ülgen F, Kılıç S, Alırcavcı D, Çelebi B, Eren SS, et al. Orta Anadolu kaynaklı tularemi olgularının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2011;45(4):762-4.
18. Gurcan S, Karabay O, Karadenizli A, Karagol C, Kantardjiev T, Ivanov IN. Characteristics of the Turkish isolates of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis 2008;61(3):223-5.
19. Petersen JM, Carlson J, Yockey B, Pillai S, Kuske C, Garbalena G, et al. Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. Lett Appl Microbiol 2009;48(6):663-7.
20. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. J Clin Microbiol 1997;35(5):1045-8.
21. Gurycová D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. Eur J Epidemiol 1998;14(8):797-802.
22. Chaudhuri RR, Ren CP, Desmond L, Vincent GA, Silman NJ, Brehm JK, et al. Genome sequencing shows that European isolates of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are almost identical to US laboratory strain Schu S4. PLoS One 2007;4;2(4):e352.
23. Yesilyurt M, Kılıç S, Çağasar Ö, Çelebi B, Gül S. Yozgat ilinde kene kaynaklı iki tularemi olgusu. Mikrobiyol Bul 2011;45(4):746-54.
24. Çelebi B, Kılıç S, Karagöz A, Durmaz R. Ülkemizde izole edilen *Francisella tularensis* izolatların alt türlerinin belirlenmesi. X. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 24-27 Eylül 2012, Kuşadası/Aydın. Kongre Kitabı, s: 36-37, sözlü sunum 12.
25. Kılıç S, Çelebi B, Acar B, Atas M. In vitro susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* from Turkey. Scand J Infect Dis 2013;45(5):337-41.
26. Wang Y, Peng Y, Hai R, Xia L, Li H, Zhang Z, et al. Diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* lineages, China. Emerg Infect Dis 2014;20(7):1191-4.
27. Eden JS, Rose K, Ng J, Shi M, Wang Q, Sintchenko V, et al. *Francisella tularensis* spp. *holarctica* in ringtail possums, Australia. Emerg Infect Dis 2017;23(7):1198-201.
28. Vogler AJ, Birdsell D, Price LB, Bowers JR, Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. J Bacteriol 2009;191(8):2474-84.