

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**KAYSERİ YÖRESİNDEN TOPLANMIŞ IXODID KENE VE SİVRİSİNEK
TÜRLERİNDE *FRANCISELLA TULARENSIS*'İN REAL TIME PCR İLE
ARAŞTIRILMASI VE SAPTANAN İZOLATLARIN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Proje No: TDA-2014-5172

Dış Kaynaklı ACİP

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ
ERÜ Veteriner Fakültesi/Parazitoloji Anabilim Dalı

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Abdullah İNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi/Parazitoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM
ERÜ Veteriner Fakültesi/Parazitoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Kadir Semih GÜMÜŞSOY
ERÜ Veteriner Fakültesi/Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Araştırmacılar, desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'ne teşekkür eder. Çalışma TÜBİTAK tarafından 113O202 kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
KAPAK	I
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 <i>Francisella tularensis</i> 'in Mikrobiyolojisi ve Filocoğrafisi	6
2.2 <i>Francisella tularensis</i> 'in Epidemiyolojisi.....	8
2.3 <i>Francisella tularensis</i> 'in Hayat Siklusu.....	10
2.4 <i>Francisella tularensis</i> 'in İmmunopatogenezi.	11
2.4.1 Doğal Bağışıklık.....	12
2.4.2 Kazanılmış Bağışıklık	13
2.5 Tüla remi Enfeksiyonlarında Klinik Semptomlar.	13
2.5.1 İnsanlarda Klinik Görünüm.	13
2.5.2 Hayvanlarda Klinik Görünüm.	14
2.6 Laboratuvar Teşhisleri.	16
2.6.1 <i>Francisella tularensis</i> 'in Mikrobiyolojik İdentifikasyonu.	16
2.6.2 Serolojik Yöntemler.	16
2.6.3 Moleküler Yöntemler.	17
2.7 Tedavi.	17
2.8 Aşılama.	18
2.9 Türkiye'de Tüla remi.	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 Çalışma Materyali ve Genomik DNA Havuzlarının Oluşturulması	21
3.2 DNA Ekstraksiyonu ve Konsantrasyonların Belirlenmesi	27
3.3 Real Time PCR Analizleri	27

3.4 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	28
4. BULGULAR	29
4.1 Enfeste insanlardan toplanmış ixodid kenelerin tür identifikasyonları.....	29
4.2 Real Time PCR Analiz Sonuçları.....	40
4.3 16S rRNA Gen Bölgesi Analizleri	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
6. KAYNAKLAR.....	51

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1. Türkiye’den bildirilmiş tularemi vakaları	19
Tablo 2. 2008 yılı sivrisinek sezonunda örnekleme merkezlerine göre toplanan sivrisinek türleri ve oluşturulan genomik DNA havuz sayıları.....	22
Tablo 3. 2009 yılı sivrisinek sezonunda örnekleme merkezlerine göre toplanan sivrisinek türleri ve oluşturulan genomik DNA havuz sayıları.....	24
Tablo 4. Kayseri’de sığır ve barınaklardan toplanan ergin kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında kene türlerinin dağılımı	26
Tablo 5. Kayseri yöresinde enfeste insanlardan toplanmış ergin kene türleri ve oluşturulan genomik DNA havuzları	29

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. <i>Francisella tularensis</i> ve <i>Francisella</i> -like endosymbiont'ların filocoğrafisi	8
Şekil 2. <i>Francisella tularensis</i> 'in karasal ve aquatik hayat siklusu	11
Şekil 3. Ergin dişi <i>Ixodes ricinus</i>	30
Şekil 4. Ergin dişi <i>Hyalomma dromedarii</i>	30
Şekil 5. Ergin erkek <i>Hyalomma marginatum marginatum</i>	31
Şekil 6. Ergin dişi <i>Hyalomma marginatum marginatum</i>	31
Şekil 7. Ergin erkek <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>	32
Şekil 8. Ergin dişi <i>Hyalomma anatolicum anatolicum</i>	32
Şekil 9. Ergin erkek <i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	33
Şekil 10. Ergin dişi <i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	33
Şekil 11. Ergin erkek <i>Haemaphysalis parva</i>	34
Şekil 12. Ergin dişi <i>Haemaphysalis parva</i>	34
Şekil 13. Ergin erkek <i>Haemaphysalis sulcata</i>	35
Şekil 14. Ergin dişi <i>Haemaphysalis sulcata</i>	35
Şekil 15. Ergin erkek <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) turanicus</i>	36
Şekil 16. Ergin dişi <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) turanicus</i>	36
Şekil 17. Ergin erkek <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) bursa</i>	37
Şekil 18. Ergin dişi <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) bursa</i>	37
Şekil 19. Ergin erkek <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i>	38
Şekil 20. Ergin dişi <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i>	38
Şekil 21. Ergin erkek <i>Dermacentor marginatus</i>	39
Şekil 22. Ergin dişi <i>Dermacentor marginatus</i>	39
Şekil 23. Sığır ve barınaklardan toplanmış kenelerden elde edilen DNA havuzlarında <i>Francisella tularensis</i> yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları...	40
Şekil 24. İnsanlardan temin edilmiş kenelerden elde edilen DNA havuzlarında <i>Francisella tularensis</i> yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları...	41
Şekil 25. Sivrisineklerden elde edilen DNA havuzlarında <i>Francisella tularensis</i> yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları	41
Şekil 26. Bazı örneklerin <i>Francisella tularensis</i> 16S rRNA gen bölgesi PCR analizleri sonucu jel elektroforezde görünümü	42

Kayseri Yöresinden Toplanmış Ixodid Kene ve Sivrisinek Türlerinde *Francisella tularensis*'in Real Time PCR ile Araştırılması ve Saptanan İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

ÖZET

Bu çalışma, Kayseri yöresinden toplanmış sivrisinek ile ixodid kene türlerinden ekstrakte edilerek oluşturulmuş DNA havuzlarında *Francisella tularensis*'in varlığının moleküler olarak araştırılması ve filogenisinin ortaya konması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla TaqMan prob tabanlı Real Time PCR ile Kayseri yöresinden örneklenen 6203 sivrisinekten (3202 *Aedes vexans*, 2610 *Culex pipiens*, 36 *Cx. hortensis*, 193 *Cx. theileri*, 100 *Culiseta annulata*, 62 *Anopheles maculipennis*) ekstrakte edilmiş 1198 (599 adet baş-toraks+599 adet abdomen), sığır ve barınaklardan toplanmış toplam 1115 ergin ixodid keneden (267 *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, 106 *Haemaphysalis parva*, 2 *Hae. sulcata*, 245 *Hyalomma marginatum marginatum*, 106 *H. anatolicum anatolicum*, 53 *H. a. excavatum*, 68 *Hyalomma detritum detritum*, 219 *Rh. turanicus*, 28 *Rh. bursa*, 1 *Rh. sanguineus*, 20 *Dermacentor marginatus*) izole edilmiş 38 ve enfeste insanlardan laboratuvara intikal ettirilen 362 ergin ixodid keneden (39 *Hae. parva*, 3 *Hae. sulcata*, 86 *H. m. marginatum*, 14 *H. anatolicum anatolicum*, 20 *H. a. excavatum*, 3 *H. d. detritum*, 13 *H. dromedarii*, 114 *Rhipicephalus turanicus*, 38 *Rh. bursa*, 16 *Rh. sanguineus*, 11 *D. marginatus*, 5 *Ixodes ricinus*) oluşturulan 42 olmak üzere toplam 1278 genomik DNA havuzunda *Francisella tularensis* kantitatif olarak araştırılmıştır. Real Time PCR sonuçlarına göre incelemesi yapılan sığır, barınak ve insanlardan elde edilmiş toplam 1477 ergin ixodid kene ve 6203 sivrisinekten oluşturulmuş genomik DNA havuzlarının hiçbirinde *Francisella tularensis* DNA'sına rastlanmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmayla Türkiye'de ilk kez Kayseri yöresinde potansiyel vektör sivrisinekler ve kenelerde *Francisella tularensis* moleküler olarak araştırılmıştır. Bu çalışma Türkiye'de *Francisella tularensis*'in vektör artropodlarda moleküler epidemiyolojisinin ortaya konması yönünde daha sonra yapılacak araştırmalara model olma niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: *Francisella tularensis*, ixodid kene, moleküler karakterizasyon, sivrisinek, Kayseri, Real Time PCR

Investigation of *Francisella tularensis* in Ixodid Ticks and Mosquito Species Collected from Kayseri Region by Real Time PCR and Molecular Characterization of the Isolates

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the molecular prevalence and phylogeny of *Francisella tularensis* in DNA pools which consisted from mosquito and ixodid tick species collected from Kayseri region. For this aim, *Francisella tularensis* was investigated quantitatively by TaqMan prob based Real Time PCR in totally 1278 genomic DNA pools, 1198 pools (599 head-thorax + 599 abdomen) composed from 6203 mosquito species (3202 *Aedes vexans*, 2610 *Culex pipiens*, 36 *Cx. hortensis*, 193 *Cx. theileri*, 100 *Culiseta annulata*, 62 *Anopheles maculipennis*), 38 pools consisted from totally 1115 adult ixodid ticks from cattle and barns in Kayseri region (267 *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, 106 *Haemaphysalis parva*, 2 *Hae. sulcata*, 245 *Hyalomma marginatum marginatum*, 106 *Hyalomma anatolicum anatolicum*, 53 *H. anatolicum excavatum*, 68 *H. detritum detritum*, 219 *Rh. turanicus*, 28 *Rh. bursa*, 1 *Rh. sanguineus*, 20 *Dermacentor marginatus*), and also 42 genomic DNA pools constructed from 362 adult ixodid ticks from infested people (39 *Haemaphysalis parva*, 3 *Hae. sulcata*, 86 *H. m. marginatum*, 14 *H. a. anatolicum*, 20 *Hyalomma a. excavatum*, 3 *H. d. detritum*, 13 *H. dromedarii*, 114 *Rh. turanicus*, 38 *Rhipicephalus bursa*, 16 *Rh. sanguineus*, 11 *D. marginatus*, 5 *Ixodes ricinus*). According to the results of the taqman probe based Real Time PCR, none of the DNA pools constructed from totally 1477 adult ixodid ticks which were obtained from cattle, barns and people and 6203 mosquitos were found to be infected with *Francisella tularensis* DNA.

In conclusion, *Francisella tularensis* was firstly investigated in potential vector mosquitos and ticks by molecular methods in Kayseri region of Turkey. This study also provides useful insights into the molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in Turkey and it could be a model for future studies.

Key words: *Francisella tularensis*, ixodid tick, molecular characterization, mosquito, Kayseri, Real Time PCR

1. GİRİŞ

Zoonotik bir enfeksiyon olan tulareminin bulaşma dinamikleri arasında vektör kaynaklı veya su kaynaklı bulaşma yolları oldukça önemlidir. Tulareminin etiyolojik ajanı olan *Francisella tularensis*; memeliler, kuşlar, balıklar, karada ve suda yaşayan hayvanları da içeren birçok omurgalıda bildirilmiştir. Bu hastalık ilk kez 1911 yılında George McCoy tarafından yer sincaplarında tarif edilmiştir (McCoy, 1911). Hastalık genellikle kuzey yarım kürede görülmekte olup 250’den fazla hayvan türünden rapor edilmiştir. İnsanlar için risk, daha yaygın olarak yabani memeli konaklarla ilişkilidir (Morner ve Addison, 2001). *F. tularensis* nesilleri veya bunların DNA’ları ayrıca toprak, keneler ve çeşitli dizilerdeki protozoonlarda da saptanmıştır (Keim vd., 2007). Bunun yanında tularemi için biyolojik ve mekanik vektörlerin çeşitliliği de oldukça yüksektir (>15 kene türü, >10 sivrisinek türü, tabanid sinekler, akarlar, tatarcık, tahtakurusu ve pireler) (Foley ve Nioto, 2010). Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlarda etken olarak en sık karşılaşılan *F. tularensis* alt türleri *F.tularensis* subsp. *nearctica* (tip A) ve *F.tularensis* subsp. *holarctica* (tip B)’dır. Tip A’nın virulansı daha fazladır. *F. tularensis* insanlara enfekte hayvanlarla doğrudan temas, kontamine su veya gıdaların alınması, kan emen artropodlar (sivrisinek, kene gibi) veya enfekte toz ya da aerosollerin solunması yolu ile bulaşır. Enfektivitesi yüksek bir bakteri olup biyolojik savaş ajanları içinde yer alır (Morner, 1992; Pearson, 1998; Ellis vd., 2002; Foley ve Nioto, 2010).

Dünyada tularemi vakaları daha çok enfekte hayvanlar ile temasın azalmasına bağlı olarak geçmişe nazaran daha az görülmektedir. Örneğin Amerika’da 1939 yılında 2291 vaka rapor edilmişken, 1993-2005 yılları arasında yalnızca 125 vaka bildirilmiştir (Titball ve Sjostedt, 2003). Tularemi insan vakaları önceleri enfekte tavşanlarla temasa ilgili olarak daha çok kış mevsiminde sıklıkla görülürken, son yıllarda ortaya çıkan olgular vektör artropoda ile temasa bağlı olarak daha çok yaz sonu ve sonbaharda görülmektedir (Foley ve Nioto, 2010).

Veteriner Hekimler tularemi yönünden yüksek risk grubunda olup (Liles ve Burger, 1993), enfekte köpek ve kedilerle temas halinde olunması ciddi interaksiyon riski oluşturmaktadır (Greene ve DeBay, 2006). Kedi ile ilişkin vakaların çoğu, kedi ısırıklarını takiben lokal lezyon gelişimi ve lenfadenopati ile karakterize ulceroglandular karakterdedir. Enfekte kediler genelde avcılık veya yabani hayvanlarla temas sonucu etkeni alırlar fakat çoğunlukla hastalık belirtisi göstermezler. Köpek ile temas sonucu ortaya çıkan olgular, typhoidal tularemi

tarzındadır. İnsanlardaki köpek kaynaklı pulmoner tularemi vakalarının, tavşan avına çıkan köpeklerin ıslak haldeyken silkinmelerine maruz kalan bazı avcılarda görüldüğü bildirilmiştir (Greene ve DeBay, 2006).

F. tularensis subsp. *tularensis* tarafından oluşturulan tularemi'nin bulaşmasında, Kuzey Amerika'da yaygın olan evcil (*Sylvilagus* spp.) ve yabani tavşanlar (*Lepus* spp.) önemli rol oynarlar (Keim vd., 2007). Ancak, tavşanların yaygın olarak tularemi'nin rezervuarı olarak bildirilmesine karşın asıl rezervuarların çevresel etmenler ve/veya artropod vektörlerin olduğu ortaya çıkmıştır. Bunun yanında tavşanlar sıklıkla insan enfeksiyon riski ile ilişkili görülmekte ve bir rezervuardan daha çok çoğaltıcı konak olarak nitelendirilmektedir. Keneler yaşam sikluslarının değişik evrelerinde birden fazla konak kullanmaktadırlar. Bu durum keneleri hem rezervuar hem de vektör olarak ortaya çıkarmaktadır. Özellikle 2 ve 3 konutlu kenelerin farklı omurgalı gruplarından kan emebilmeleri, bunların bu gruplar arasında çeşitli hastalık etkenlerini taşımadaki rolünü arttırmaktadır. *F. tularensis* düşük sıcaklıklarda bile çevrede (rodent yuvaları vb.) uzun süre hayatta kalabilmektedir (Morner, 1992; Kılıç, 2010). *F. tularensis* subsp. *tularensis* bu yuvalarda rodentlere adapte olmuş, buradan çeşitli yollarla tavşangillere geçmiş ve her iki grupta bulunan ektoparazitler ile özellikle de kenelerle duyarlı konaklara ulaşmışlardır. Keneler biyolojik özelliklerine göre etkeni hem transstadial hem de transovarial olarak nakledebilmektedir. Kuzey Amerika'nın güney, orta ve doğu bölgelerinde tularemi'ye vektörlük yapan ixodid kene türleri *Amblyomma americanum* ve *D. variabilis* olarak bildirilmiştir. Batı bölgelerinde ise *D. andersoni* ve *Chrysops discalis* sineği yaygın vektörler olarak kaydedilmiştir (Sonenshine, 1993). Agresif bir kene olan *A. americanum* insanlardan her dönemde (larva, nimf, ergin) kan emebilmekte olup *F. tularensis* subsp. *tularensis*'in bu kenelerle transtadial bulaşması deneysel olarak da ortaya konmuştur (Hopla, 1953). *D. variabilis* erginleri primer olarak köpeklerden beslenmektedir. Ancak larva ve nimf dönemleri başta geyik fareleri (*Peromyscus* spp.) ve tarla fareleri (*Microtus* spp.) olmak üzere birçok rodentten kan emmektedir (Furman ve Loomis, 1984). Bu kene türü arasına lagomorf, çiftlik hayvanları ve birçok farklı karnivor türünden beslenebilmekte olup bu durum kırsal ve kentsel alanlar arasında geçişi sağlamakta ve bu kene türünün erişkinlerinin neden sıklıkla insanlara tularemi'yi nakledebildiğine açıklık getirmektedir. *D. andersoni* Batı Rocky Mountain'da tularemi'nin bulaştırılmasından sorumlu olup, kanatlı hariç birçok farklı konak türünden kan emebilmekte ve konakların yoğun olduğu odalarda çok yüksek sayıda bulunabilmektedirler (Reif vd., 2011). Kaliforniya'da *C. discalis* ve tabanid sinekleri

(horseflies) insan vakaları ile ilişkilendirilmiş iken batıda yalnızca *C. discalis* kaynaklı vakalar bildirilmiştir (Sjöstedt, 2007; Petersen vd., 2009).

F. tularensis subsp. *holarctica* hem Kuzey Amerika hem de Avrupa'da bulunmakta olup, Avrupa'da tularemi'ye yol açan en önemli etkidir. "Type B" tularemisi Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak evcil ve yabani tavşanlarla ilişkili olmasına karşın, tarla faresi (*Microtus* spp.) ve zamanın çoğunu su içinde geçiren Amerikan kunduzları (*Castor canadensis*) ve misk fareleri (*Ondatra zibethicus*) başta olmak üzere diğer birçok omurgalı konakta da bulunabilmektedir (Morner ve Addison, 2001). Kahverengi yaban tavşanı (*Lepus europaeus*) Avrupa'daki en önemli konak olmasına karşın, Kuzey bölgelerde dağ yaban tavşanı (*L. timidus*) daha yaygındır ve nispeten enfeksiyona dirençlidir (Morner ve Addison, 2001). Buna ilaveten tarla fareleri (*Microtus* spp.) ve lağım fareleri (*Arvicola terrestris*) *F. tularensis* subsp. *holarctica*'nın diğer önemli konaklardır (Olsufjev ve Shlygina, 1979). *F. tularensis* protozoonlardan *Acantamoeba castellani*'yi enfekte edip ve bu protozoonda üreyebilmektedir (Abd vd., 2003). Yine protozoonlardan *Tetrahymena pyriformis* kültürlerinde *F. tularensis* intracellular olarak yerleşmekte ancak çoğalma göstermemektedir (Konstantinova vd., 2000). Birçok farklı protozoonun enfeksiyonu taşıması, *F. tularensis* subsp. *holarctica*'nın bir protozoon water-borne rezervuarı olabileceği ve bu enfekte protozoonları alan molluskalar, kerevit, kurbağalar ve su rodentlerinde çoğalabileceği hipotezini desteklemektedir. Vektör kaynaklı *F. tularensis* subsp. *holarctica* insanlarda görülebilmektedir. Ancak vektör kaynaklı enfeksiyonların, su veya enfekte tavşanlarla temas kaynaklı enfeksiyonlardan daha az önemli olduğu düşünülmektedir (Reintjes vd., 2002). Hem Kuzey Amerika hem de Avrupa'da *F. tularensis* subsp. *holarctica*'nın en yaygın vektörü ixodid kenelerdir. Bunu sırasıyla sokucu sinekler (Tabanidae) ve sivrisinekler takip eder. Avrupa'daki en önemli vektör kenelerin, *D. nuttalli*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *I. ricinus* ve *Haemaphysalis concinna* olduğu rapor edilmiştir. Orta Avrupa'da en yaygın vektör kene ise *D. reticulatus*'tur. Bu keneden *F. tularensis* subsp. *holarctica* sıklıkla izole edilmiştir. *D. reticulatus*'ta saptanan enfeksiyon oranının (%0.5-2.6) *I. ricinus*'tan (%0.1-0.2) daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. *D. reticulatus* Orta Avrupa'dan Kazakistan'a kadar bulunmakta olup kuzey enlemlerinde daha az yoğunlukta bulunmaktadır. *D. reticulatus*, sıklıkla *F. tularensis* subsp. *holarctica* ile enfekte olmasına karşın nadir olarak insanlardan beslenmekte olup daha çok vahşi küçük memelilerden kan emmektedir (Foley ve Nieto, 2010). *Ixodes ricinus*, sokucu sinekler ve sivrisinekler vektör kaynaklı insan enfeksiyonlarından sorumlu artropodlardır. İsveç ve Finlandiya'da insanlarda görülen tularemi salgınlarının enfekte rodentlerden beslenen

sivrisinekler tarafından mekanik nakil sonucu ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Eliasson vd., 2002). *Aedes*, *Culex* ve *Anopheles* soylarına bağlı 10'dan fazla türün *F. tularensis* ile enfekte olduğu kaydedilmekle birlikte, bu türlerde bakteriyel çoğalmaya ilişkin herhangi bir kanıt günümüze kadar belirlenememiştir (Petrishcheva, 1965; Triebenbach vd., 2010). Vektör yetkinliğindeki farklılıklar ve artropod türleri arasındaki dağılım, daha çok kuzey enlemlerinde sokucu sinekler ve sivrisineklerin kenelere oranla neden daha önemli vektörler olabileceğinin açıklanmasında yardımcı olmaktadır (Foley ve Nioto, 2010).

Akar ve pirelerin sıklıkla tularemi'ye vektörlük yaptığı düşünülmektedir (Keim vd., 2007). Bir çok akar konak açısından tür spesifik olmasına karşın, Alaska ve Kuzey Avrupa'daki akarların deneysel olarak tularemi'yi enfekte ve sağlam vahşi rodentler arasında nakledebildiği belirlenmiştir. Pireler, önceleri tularemi ve veba arasındaki benzerliklere bağlı olarak tularemi'nin vektörü olarak öne sürülmüştür. Pirelerin vektörlük potansiyelleri tularemi açısından önemsiz olarak nitelenmektedir (Petrishcheva, 1965).

Türkiye'de her yıl insanlarda tularemi vakaları bildirilmesine karşın *F. tularensis*'in bugüne kadar vektörlerde araştırılmasına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Hayvanlarda *F. tularensis* varlığı üzerine ise yabani bir rodentten elde edilmiş (Çelebi vd., 2012) ve Trakya Bölgesi'nde de iki farede Real Time PCR ile pozitif saptanmış kayıtlar (Ünal Yılmaz vd., 2014) bulunmaktadır. Bunun yanında GenBank kayıtları incelendiğinde Ankara'nın Güdül ilçesinde doğal kaynak sularından izole edilmiş ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* olarak karakterize edilmiş bir izolat (GenBank Aksesyon No: JX436321) ile yine sudan izole edilmiş ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* olarak karakterize edilip tüm genomu kayda girilmiş (GenBank Aksesyon No: CP007148) izolat dışında Türkiye'den kayıt edilmiş herhangi bir veri bulunmamaktadır. Hastalık Türkiye'de ilk olarak 1988 yılında Marmara Bölgesi'nde bildirilmiştir. Enfeksiyon daha sonra Türkiye'nin her yerine yayılmış olup özellikle hastalığın en çok görülmeye başlandığı 2005 yılı ile 2011 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre toplam 4824 insan vakası rapor edilmiştir.

Araştırma yöresini oluşturan Kayseri'de ilk tularemi vakası 2005 yılında Sarız ilçesinde görülmüştür. Daha sonra 2006 ve 2007 yıllarında birer vaka daha rapor edilmiş olup 2007-2009 yılları arasında herhangi bir rapor mevcut değildir. 2010-2012 yılları arasında bildirilen tularemi salgınında ise toplam 110 hastada enfeksiyon rapor edilmiş olup bu hastaların çoğunun köylerde yaşadıkları bildirilmiştir. Bugüne kadar Kayseri'den bildirilen tüm

vakaların su kaynaklı olduğu ve hemen hemen tüm hastalarda hastalığın orofarenjiyal ve glandular formlarının görüldüğü rapor edilmiştir (Balci vd. 2014).

Bu araştırmada, çeşitli projeler kapsamında Kayseri'nin farklı bölgelerinden toplanmış ve tür identifikasyonları yapılarak genomik DNA havuzları oluşturulmuş ergin ixodid kene ve sivrisinek türleri ile enfeste insanlardan laboratuvara intikal ettirilen ve araştırma periyodu boyunca tür teşhisleri yapılan kene türlerinden oluşturulmuş DNA havuzlarında Türkiye için bir ilk olmak üzere *Francisella tularensis*'in varlığı spesifik TaqMan prob tabanlı Real Time PCR ile analiz edilmiş ve vektörlük potansiyelleri açısından risk faktörleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Francisella tularensis*'in Mikrobiyolojisi ve Filocoğrafisi

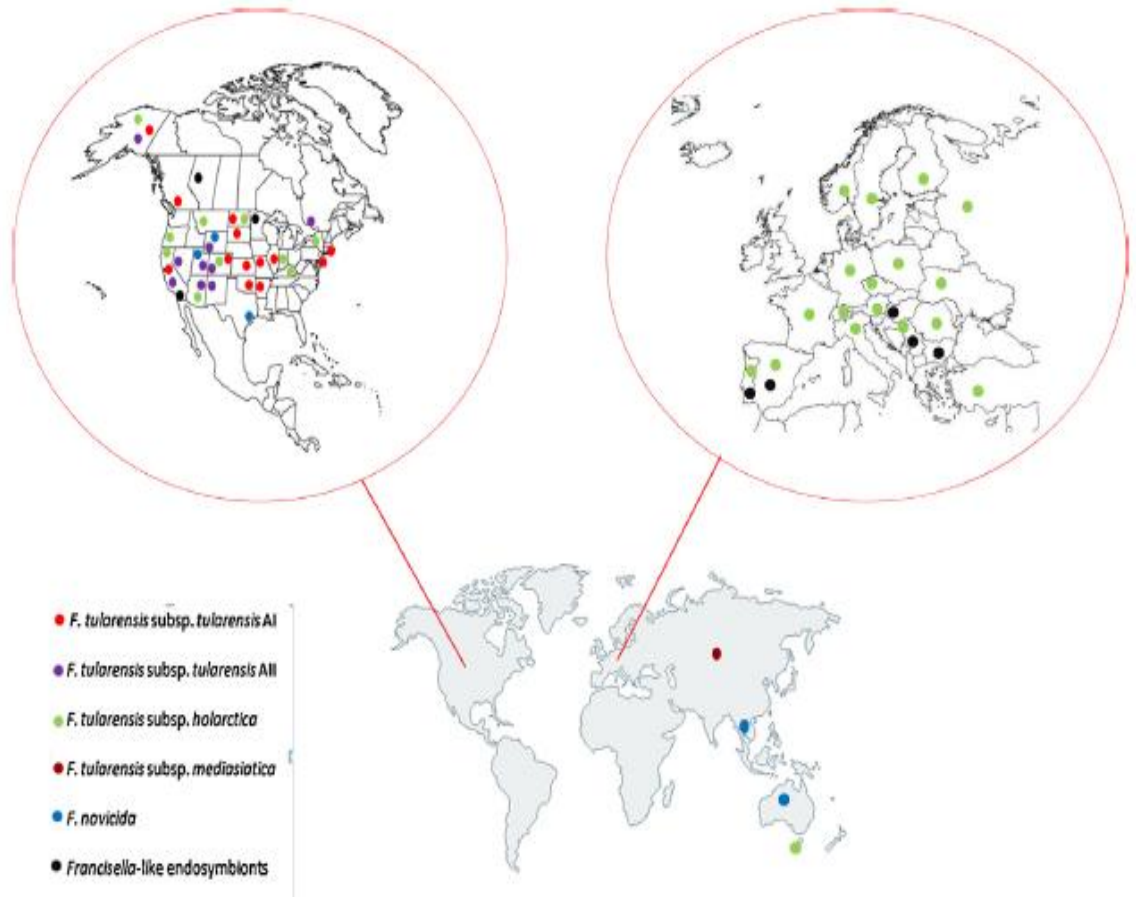
Francisella tularensis, günümüzde insan ve hayvanlarda potansiyel ölümcül hastalıklara yol açabilen en virulent birkaç mikroorganizmden birisidir (Petersen ve Schriefer, 2005; Lopes de Carvalho vd., 2009). Yüksek düzeydeki enfektivitesinden dolayı *F. tularensis*, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından biyolojik savaş ajanı olarak A sınıfı kategorisinde sınıflandırılmıştır (Carvalho vd., 2014). *F. tularensis*; makrofajlar, hepatositler ve epitelyal hücreler gibi farklı tipteki birçok hücrenin içerisinde gelişebilen hücre içi fakültatif, gram negatif, pleomorfik ve non-motile bir kokobasildir (Mandell vd., 2005; Lopes de Carvalho vd., 2009; Foley ve Nieto, 2010; Cowley ve Elkins, 2011). *F. tularensis*'in hücre duvarı eşsiz bir şekilde yüksek seviyede yağ asitleri içermekte olup yabancı suşları ne toksik ne de immunojenik özellik gösteren lipid'ten zengin bir kapsüle sahiptir (Collier vd., 1998; Mandell vd., 2005; Petersen vd., 2009).

Francisella tularensis, Francisellaceae ailesinde yer alan bir gamma-proteobakteridir (Mandell vd., 2005; Oyston, 2008). *F. tularensis* farklı patojenitelere ve coğrafik dağılımlara sahip 3 alt türe bölünmüştür: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica* ve *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. *Francisella novicida*, 1,1 Mbp'lik genom sekansında *F. tularensis* ile ortalama %99,2 nükleotid identikliği göstermesi dolayısıyla günümüzde bilim insanlarının çoğunluğu tarafından *F. tularensis*'in dördüncü alt türü olarak kabul edilmektedir (Elli s vd., 2002; Oyston, 2008; Birdsell vd., 2009; Vogler vd., 2009; Huber vd., 2010; Hansen vd., 2011; Siddaramappa vd., 2011; Brett vd., 2012). Bununla birlikte, *F. novicida*'nın *F. tularensis*'in alt türü olarak kayıt altına alınmasına, son zamanlardaki multiple genom sekans sonuçlarına göre *F. novicida* ve *F. tularensis* türlerinin birbirlerinden farklı evölüsyonlar gösterdiklerinin belirlenmesi sebebiyle ayrı türler oldukları yönünde itirazlar bulunmaktadır (Johansson vd., 2010).

Tip A olarak klasifiye edilen ve en virulent alt tür olarak bildirilen *F. tularensis* subsp. *tularensis* ağırlıklı olarak Kuzey Amerika'da görülmektedir (Whipp vd., 2003; Petersen ve Schriefer, 2005; Oyston, 2008; Lopes de Carvalho vd., 2009; Hansen vd., 2011). Bu türe ait, farklı konak, vektör ve coğrafik dağılım gösteren iki alt-populasyon (AI ve AII) identifiye edilmiştir (Petersen ve Schriefer, 2005; Fey vd., 2007; Oyston, 2008; Birdsell vd., 2009; Vogler vd., 2009; Hansen vd., 2011). AI alt populasyonu, AIa ve AIb olmak üzere iki gruba

bölünmüştür (Reese vd., 2010; Hansen vd., 2011). Tip B olarak sınıflandırılan ve daha hafif seyirli enfeksiyona yol açan *F. tularensis* subsp. *holarctica* Kuzey Hemisferi boyunca dağılım göstermektedir (Whipp vd., 2003; Birdsell vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009). *F. tularensis* subsp. *tularensis* Alb suşlarının sebep olduğu insan enfeksiyonları, A1a ve A1I suşları veya Tip B tularemisi'ne göre genellikle daha şiddetli seyretmekte ve yüksek oranda ölümlere sebep olmaktadır (Birdsell vd., 2009; Reese vd., 2010). Son yıllarda bu alt türler Tazmania ve Avusturalya gibi ülkelerden de rapor edilmiştir (Jackson vd., 2012). *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*'yla benzer virulens göstermekte olup coğrafik dağılımı Orta Asya ile sınırlıdır. *F. novicida* ise daha az virulense sahiptir ve Kuzey Amerika, Avusturalya ve Tayland'dan izole edilmiştir (Carvalho vd., 2014).

Bazı mikroorganizmler 16S rRNA gen bölgesi açısından yüksek düzeydeki benzerlik sebebiyle Francisellaceae familyasının muhtemel üyeleri olarak klasifiye edilmiş ve “*Francisella*-like endosymbionts ya da FLEs” olarak isimlendirilmişlerdir (Kugeler vd., 2005). FLEs, *F. tularensis* türlerinden farklı bir filogenetik grupta yer almaktadır (Escudero vd., 2008). FLEs'in, *F. tularensis*'in naklindeki ve vektör yetkinliğindeki etkinliği halen daha bilinmemektedir (Petersen vd., 2009). FLEs, tüm dünyada yaygınlık göstermekte olup vertikal olarak *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* ve *Ornithodoros* soylarındaki ixodid ve argasid kenelerle nakledilmektedir (Carvalho vd., 2011; Ivanov vd., 2011; Dergousoff ve Chilton, 2012). FLEs, Kuzey Amerika'da (Texas, Kaliforniya, Minnesota), Kanada'da (Alberta) ve İspanya, Portekiz, Macaristan, Sırbistan ve Bulgaristan gibi Avrupa ülkelerinde kenelerde tespit edilmiştir (Scoles, 2004; Baldrige vd., 2009; Sréter-Lancz vd., 2009; Carvalho vd., 2011; Ivanov vd., 2011; Dergousoff ve Chilton, 2012). Bunların insanlardaki patojenitesi ise henüz daha tam olarak belirlenememiştir. Son yıllarda FLEs, Avrupa'da serbest yaşayan küçük memelilerden de bildirilmiş olup bu sonuçlar FLE tiplerinin kenelerden küçük memeli hayvanlara muhtemel nakli hakkında fikir elde edilmesine olanak sağlamıştır (Scoles, 2004; Baldrige vd., 2009; Sréter-Lancz vd., 2009; Carvalho vd., 2011; Ivanov vd., 2011; Dergousoff ve Chilton, 2012). *Francisella tularensis*'in filocoğrafik dağılımı ve FLEs'in kenelerden bildirilen sonuçlar doğrultusundaki coğrafik dağılımları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. *Francisella tularensis* ve *Francisella*-like endosymbiont'ların filocoğrafisi (Carvalho vd., 2014)

2.2 *Francisella tularensis*'in Epidemiyolojisi

Francisella tularensis, birçok farklı yabani türlerde (lagomorflar, rodentler, insektivorlar, karnivorlar, toynaklılar, keseliler, kuşlar, amfibianlar, balıklar) ve omurgasızlarda tespit edilmiştir (Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009; Ellis vd., 2002; Escudero vd., 2008; Gyuranecz vd., 2010; Bandouchova vd., 2011; Kuehn vd., 2013). Lagomorflar ve rodentler *F. tularensis*'in esas rezervuarı olarak kabul edilmektedir (Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009; Gyuranecz vd., 2010). Avrupa kahverengi yaban tavşanı (*Lepus europaeus*) gibi yabani lagomorfların tulareminin yayılmasındaki en önemli konaklar olduğu düşünülmektedir (Gyuranecz vd., 2010; Bandouchova vd., 2011). Son yıllarda tilkilerin ve rakunların tulareminin biyolojik indikatörleri görevi gördüklerine dair serolojik kanıtlar da elde edilmiştir (Kuehn vd., 2013).

Farklı artropodlarda *F. tularensis* ile ilgili doğal enfeksiyonlar bildirilmiştir. Artropodlardan; *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* ve *Ornithodoros* soylarındaki keneler, *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* soylarındaki sivrisinekler, *Ochlerotatus excrucians* ve Tabanidae familyasındaki sineklerin (*Tabanus* spp., *Chrisozona* spp. ve *Chrisops* spp.) *F. tularensis*'in vektörlüğünü

yaptıkları bildirilmiştir (Ellis vd., 2002; World, 2007; Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009). Buna karşın vektör yeterliliği sadece *Dermacentor* soyundaki kenelerde gösterilmiştir (Reese vd., 2010). *F. tularensis*'in kene kaynaklı nakli genellikle sporadik vakalar şeklinde görülmektedir (Petersen vd., 2009). Mekanik vektör olarak sivrisineklerin de tulareminin tüm dünyada yaygınlık göstermesiyle alakalı olduğu ve hastalığın geçici naklinde görev alabildikleri bildirilmiştir (Petersen vd., 2009; Lundström vd., 2011). Hem keneler hem de sivrisinekler larval dönemlerinde enfekte olabilmektedirler. Kenelerde transstadial nakil bildirildiği halde sivrisineklerde transstadial naklin kanıtlarına dair bilgiler yalnızca moleküler metodlara dayanmaktadır (Reese vd., 2010; Lundström vd., 2011). *F. tularensis*'in transovaryal nakli kenelerde rapor edilmesine karşın (Mandell vd., 2005; Petersen vd., 2009; Anda vd., 2011), *Dermacentor variabilis* üzerine yapılan son bir çalışmada bunun aksi kanıtlanmıştır. Bu çalışmada ovaryumlara ve daha sonra oocystlere dağılmasına rağmen etkenin yumurtadan çıkan larvalarda bulunmadığı rapor edilmiştir (Mani vd., 2012). Tabanid sinekler de *F. tularensis*'in mekanik vektörlüğünü yapmakta olup etken bu sineklerde canlılığını uzun süre koruyamamaktadır (Petersen vd., 2009).

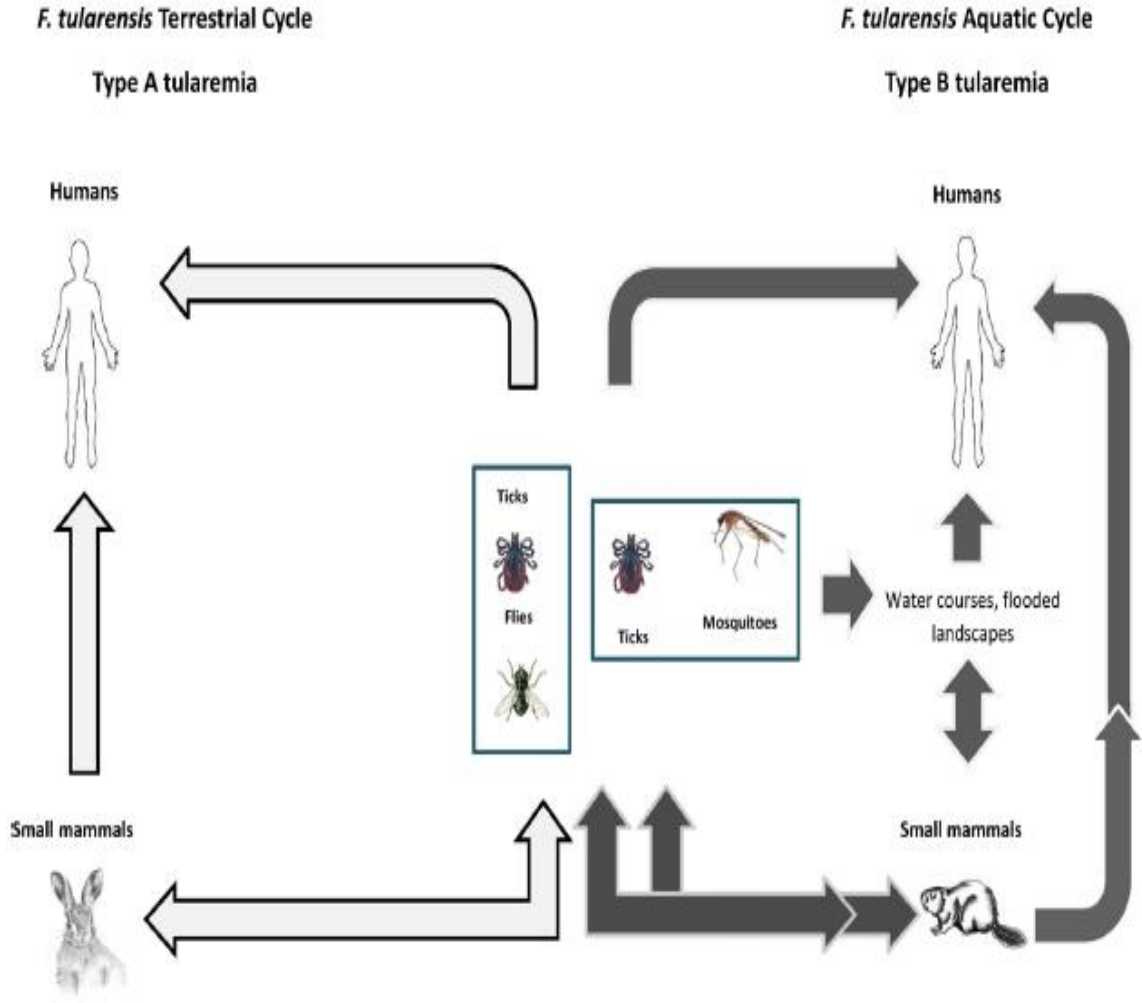
Vektör kaynaklı tulareminin epidemiyolojik karakteri kuzey hemisferi ile belirli bir coğrafik alanda gerçekleşmektedir. Bu durumun farklı vektör ve konak türlerinin fazlalığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum, Amerika Birleşik Devletleri, İsveç, Finlandiya ve Rusya'da insanlarda artropod kaynaklı tularemi vakalarının neden daha yaygın görüldüğünü ve Batı ve Orta Avrupa'da enfekte hayvanlarla temas ve kontamine su veya gıdaların alınmasıyla görülen tularemi vakalarının neden daha yaygın görüldüğünü açıklamada yardımcı olmaktadır. Enfeksiyonun nakledilmesi ile ilgili bu dinamikler ABD'de de bildirilmiş olup batı eyaletlerinde hem keneler hem de geyik sinekleri tulareminin önemli vektörleri iken doğu eyaletlerinde yalnızca kenelerin nakilden sorumlu olduğu görülmüştür. İsveç ve Finlandiya'da ise primer vektör olarak sivrisinekler identifiye edilmiştir (Petersen vd., 2009). Portekiz'de *Culex* (%63,97), *Ochlerotatus* (%35,34), *Anopheles* (%0,42), *Culiseta* (%0,14) ve az miktardaki *Aedes aegypti* (%0,12) soylarındaki 4949 sivrisinekte *F. tularensis*'in varlığı üzerine yapılan çalışmada sonuçlar negatif bulunmuştur. Vektör kaynaklı tularemi'nin epidemiyolojik karakteri ile ilgili daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olan bu bulgular Portekiz'de sivrisineklerin hastalığın naklinde rol oynamadığı izlenimi uyandırabilmektedir. Tulareminin endemik olduğu ülkelerin büyük çoğunluğunda *Francisella tularensis*'in en önemli vektörünün keneler olduğu düşünülmektedir (Carvalho vd., 2012).

Endemik bölgelerde tularemi mevsimsel özellik göstermekte olup en yüksek insidens geç ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında görülmektedir. Bununla birlikte iklimik koşullarla tularemi salgınları arasında bir ilişki olduğu henüz daha kanıtlanamamıştır (World, 2007). *F. tularensis*'in çevresel şartlara karşı çok dirençli olduğu belirlenmiş olup toprak, su ve hayvan karkaslarında düşük sıcaklıklarda haftalarca canlı kalabildikleri bildirilmiştir (Lopes de Carvalho vd., 2009).

Tulareminin insanlara nakli ya enfekte hayvanlarla direkt kontakt ya da artropod vektörlerle, kontamine su veya gıdaların alınmasıyla ve solunum yoluyla indirekt şekilde olmaktadır. İnsandan insana nakil henüz tanımlanmamıştır (Mandell vd., 2005; Splettstoesser vd., 2005; World, 2007; Lopes de Carvalho vd., 2009). Tularemi vakaları insanlarda her yaşta görülebilmekte olup özellikle erkeklerin bayanlara oranla enfeksiyona daha eğilimli oldukları ve erkeklerde daha yüksek prevalans oranlarının belirlendiği rapor edilmiştir (Mandell vd., 2005; World, 2007).

2.3 *Francisella tularensis*'in Hayat Siklusu

Birçok vektöre, konağa ve farklı çevresel şartlara adapte olabilen *F. tularensis* gibi patojen sayısı oldukça sınırlıdır. *F. tularensis* Tip A ve Tip B suşlarının, hayvan konaklarındaki ve artropod vektörlerdeki farklılıklarından dolayı yaşam siklusları farklıdır (Petersen vd., 2009). Tip A tularemi, büyük oranda hastalığın karasal siklusuyla alakalı olup bu hayat siklusunda özellikle lagomorflar ve vektör artropodlar arasında bir döngü söz konusudur (Mandell vd., 2005; Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009; Zarrella vd., 2011). Tip B tularemi ise sıklıkla aquatik siklusla alakalıdır (Mandell vd., 2005; Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009; Zarrella vd., 2011). Bu hayat siklusunda ise kunduz ve misk faresi gibi rodentler ile su kaynakları arasında döngü gerçekleşmektedir (Ellis vd., 2002; Splettstoesser vd., 2005; Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009). Kontamine sular, insanlar, sinekler ve sivrisinekler için enfeksiyon kaynağı olabilmektedir (World, 2007). İspanya'da bir insan tularemisi vakasının kaynağının çok nadiren rastlanan şekilde kontamine bir nehirdeki kerevit (*Procambarus clarkii*) türü olduğu rapor edilmiştir. Mekanik vektör olan kerevitlerin midesinde ve hepato-pankreasında *F. tularensis* tespit edilmiştir (Anda vd., 2011). *Francisella tularensis*'in karasal ve aquatik hayat sikluslarının şematize hali Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. *Francisella tularensis*'in karasal ve aquatik hayat siklusu (Carvalho vd., 2014)

2.4 *Francisella tularensis*'in İmmunopatogenezi

Francisella tularensis birçok hücre tipinde çoğalabilen nadir bakterilerden biridir (Oyston, 2008; Lopes de Carvalho vd., 2009; Foley ve Nieto, 2010; Cowley ve Elkins, 2011; Bosio, 2011). Bakterinin enfeksiyon oluşturmada primer tercih ettiği hücreler arasında makrofajlar veya dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler (APC) gelmektedir (Bosio, 2011). Bakterinin virulensi direkt olarak etkenin enfekte hücre sitosolü içerisinde çoğalabilme kapasitesi ile ilgilidir (Henry vd., 2007). *F. tularensis*, immunitiyi manüple etmede kullanabileceği çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bakteri konağa giriş noktasında gizlenebilmek amacıyla üç şekilde kendisini gizleyebilmektedir: a) Yangısal reaksiyonları tetikleyen konak hücre reseptörleriyle karşı karşıya kalmamak için hücre yüzey yapılarını modifiye eder, b) Konak hücrelerine invazyon aşamasında alarm veren reseptörlere bağlanmayı kolaylaştıran ko-reseptörlerden yoksun hücreleri hedef alır, c) Proinflammatör sitokinlerin üretimini başlatmada başarısız olan reseptörlerden faydalanır (Henry vd., 2007).

2.4.1 Doğal Bağışıklık

Francisella tularensis'in makrofajlara girişi *Francisella* türlerinin doğasında olan özel bir mekanizmayla gerçekleşmektedir (Foley ve Nieto, 2010). Bakteri, makrofajları geniş asimetrik pseudopod düğümleri üretmesi amacıyla indükler (Oyston, 2008; Cremer vd., 2011). Bakteri yüzey polisakkaritlerini içeren komplement faktör C3 ve konak hücre reseptörlerine (CR3) bağlı olan serum opsonizasyonu ile *F. tularensis*'in vücuda alınması daha da kolaylaşmaktadır (Oyston, 2008; Chong ve Celli, 2010). *F. tularensis* serum tarafından opsonize edildiğinde iC3b'yi kendine bağlar ve CR3 reseptörleri vasıtasıyla konak hücrelerine girme yeteneğini kazanır (Bosio, 2011).

Francisella tularensis subsp. *tularensis*'in lipopolisakkaritleri (LPS) kısmen yangısal olup proinflammatör sitokinlerin üretimini azaltmasını stimüle eden son derece zayıf bir toll-like reseptör (TLR) 4 agonisti gibi görev yapmaktadır (Bosio, 2011; Jones vd., 2011). *F. tularensis* ayrıca iki farklı TLR agonistine sahiptir: Tul4 ve FTT1103 lipoproteinleri (Bosio, 2011). Bunlar, TLR2 ile etkileşime girerek bakteri varlığında fagositoz amacıyla konak hücrelerini alarma geçirirler (Oyston, 2008; Bosio, 2011; Cowley ve Elkins, 2011). TLR2/ myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) sinyal yolu proinflammatör sitokinlerin üretimi için gerekli olup *Francisella* enfeksiyonlarına karşı konak direnci için kritik role sahiptir (Foley ve Nieto, 2010; Cremer vd., 2011; Jones vd., 2011; Jones ve Weiss, 2011).

Francisella novicida, yapısal olarak farklı LPS kemotiplerini ifade etmektedir. *F. novicida* fagozomlardan kaçır ve inflammasome sinyal sisteminin tanıdığı hücre sitosolünde replike olur. Inflammasome uyarımı “protease cysteine aspartate-specific caspase-1”i aktive eder ve hücre apoptozisinden sorumlu proinflammatör sitokinlerin salınmasını teşvik eder (Henry vd., 2007; Foley ve Nieto, 2010).

Francisella tularensis'in makrofajlar içerisinde hayatta kalması ve replike olması “macrophage growth locus” (mgl) A ve B ile “*Francisella* Pathogenicity Island” (FPI) genleri sayesinde olmaktadır (Foley ve Nieto, 2010). Hücre içi gelişim ve virulens için gerekli 19 geni ihtiva eden FPI, putatif tip VI sekresyon sistemini kodlar. Daha az patojen olan *F. novicida* bir FPI'ya sahip iken *F. tularensis* subsp. *tularensis* ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* 2 FPI'ya sahiptir (Oyston, 2008; Foley ve Nieto, 2010; Sjöstedt, 2011).

Polimorfonükleer hücreler (PMN) tarafından opsonize *F. tularensis*'in fagositozunu takiben, bakteri aktif olarak NADPH oksidaz yoluyla superoksid anion generation (ROS)'u inhibe eder. Böylelikle *F. tularensis* fagozomdan kurtulur ve hücre sitosolüne yerleşir.

Polimorfonükleer hücrelerin katkısı enfeksiyon bölgesindeki efektör hücreleri kuvvetlendiren sitokin ve şemokinlerin sekresyonuyla alakalıdır (Cowley ve Elkins, 2011). Bunun yanında matrix metaloproteaz-9 artışı ile nötrofillerin kuvvetlendirilmesi lökositlerin modüle edilmesinde kritik rol oynar ve *F. tularensis*'in patogeneğinde direkt rol alır (Foley ve Nieto, 2010; Cowley ve Elkins, 2011). Akciğer, karaciğer ve dalaktaki doğal katil hücreler (NK), *Francisella tularensis* enfeksiyonlarını takiben özellikle INF- α üreterek doğal bağışıklıkta kilit rol alırlar (Cowley ve Elkins, 2011).

2.4.2 Kazanılmış Bağışıklık

Francisella tularensis hücre içi bir patojen olduğu için savunma mekanizmasında hücresel bağışıklığın esas teşkil ettiğine inanılmaktadır. CD4+ ve CD8+ T hücreleri enfeksiyonun kontrolünde primer rol oynamaktadırlar. Bu hücreler, *F. tularensis* enfeksiyonlarına karşı immun yanıtta kilit role sahip INF- γ , TNF- α ve IL-2 gibi Tip Th1 sitokinlerini üretirler (Cowley ve Elkins, 2011).

Francisella tularensis enfeksiyonlarında humoral immun yanıtın daha az önemli olduğuna inanılsa da bazı çalışmalarda hiperimmun serum tedavisi almış enfekte insanlarda iyileşmenin daha çabuk olduğuna dair kanıtlar rapor edilmiştir (Bosio, 2011). Enfeksiyon spesifik IgM, IgA ve IgG antikorlarının üretimi indikatör olup bakterinin konak hücrelerini enfekte etmesini interfere edebilirler (World, 2007; Cowley ve Elkins, 2011; Bosio, 2011). İmmun yanıtta B hücrelerinin katkısının suş virulensine bağlı olduğu düşünülmektedir (Sjöstedt, 2011; Cowley ve Elkins, 2011).

2.5 Tüla remi Enfeksiyonlarında Klinik Semptomlar

2.5.1 İnsanlarda Klinik Görünüm

İnsanlarda bugüne kadar *F. tularensis* subsp. *tularensis* ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* kaynaklı tüla remi enfeksiyonları rapor edilmiştir. Tüla reminin klinik görünümünde etkenin suş bazında virulensi, enfektif dozu, enfeksiyon şekli, bireylerin immun sistemleri gibi etkenler önem arz etmektedir (Mandell vd., 2005; World, 2007; Oyston, 2008). İnkubasyon periyodu ortalama 3-5 gün arası olmakla birlikte 1-20 gün arasında değişebilmektedir. Hastalığın akut safhasında insanlarda yüksek ateş (38-40°C), titreme, yorgunluk hissi, generalize miyalji ve baş ağrısı gibi semptomlar görülmektedir (Mandell vd., 2005; World, 2007; Oyston, 2008). *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (Tip A) kaynaklı tüla remi vakalarında tedavi edilmediği takdirde insanlarda ölümler görülebilmektedir. *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Tip B) kaynaklı enfeksiyonlar daha hafif seyretmekte olup ölümlere ender

rastlanmaktadır (World, 2007). Enfeksiyon şekline bağlı olarak enfeksiyon şekillenen insanlarda tulareminin ülseroglandular, glandular, oküloglandular, orofaringeal, pnömonik, tifoidal ve septik formları gibi klinik semptomlar görülebilmektedir (World, 2007; Lopes de Carvalho vd., 2009).

Hastalığın ülseroglandular ve glandular formları en sık rastlanan formlar olup genellikle artropod kaynaklı veya enfekte hayvanlarla temas sonucu görülmektedir (Mandell vd., 2005; World, 2007; Oyston, 2008). Ülseroglandular formda inokulasyon bölgesinde ağrısız ve yumuşak bir ülser şekillenir ve yara meydana gelir (Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009). Glandular tularemide ise primer olarak ülser şekillenmez (Mandell vd., 2005; World, 2007; Petersen vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009). Kontamine ellerle gözlere temas veya solunum yoluyla oküloglandular form şekillenebilmektedir. Unilateral konjunktivit, bazı hastalarda ülser veya papüller, fotofobi ve epifora gibi klinik semptomlar bu formda en sık rastlanan semptomlardır (Mandell vd., 2005; World, 2007). Orofarenjiyal tularemi ise kontamine su veya gıdaların ağız yoluyla alınması sonucu veya aerosol yolla şekillenmektedir. Bu formda klinik olarak ülseratif ve eksudatif stomatit ve farenjit görülmektedir (World, 2007; Lopes de Carvalho vd., 2009). Kontamine havanın solunması ile pnömonik tularemi şekillenir fakat bunun yanında diğer formların yanında da pnömonik tularemi görülebilmektedir (Mandell vd., 2005; World, 2007; Lopes de Carvalho vd., 2009). Hastalığın bu formunda ateş, öksürük, plöritik göğüs ağrısı ve güç solunum görülmektedir (World, 2007; Lopes de Carvalho vd., 2009). Tifoidal tularemi ise hastalığın sistemik bir formunu oluşturmakta olup enfeksiyonun alınma şekliyle direkt alakalı değildir (Mandell vd., 2005; World, 2007). Tip A tularemide ülseroglandular formun bir komplikasyonu olarak septik tularemi şekillenmekte ve ölümler görülebilmektedir. Hastalarda spesifik olmayan nörolojik semptomlar görülmekte ve multiple organ yetmezliğine bağlı olarak septik şok meydana gelmektedir. Tip B tularemide ise sadece menenjit ve sepsisemi komplikasyonları tarif edilmiştir (World, 2007; Lopes de Carvalho vd., 2009).

2.5.2 Hayvanlarda Klinik Görünüm

Hayvanlarda tularemi vakaları genellikle hayvanların patojene karşı duyarlılığı ile alakalıdır (World, 2007). Yabani hayvanlarda enfeksiyonun klinik semptomları ile ilgili yeterli bilgi bulunmamakla birlikte post-mortem bulgularda karaciğer ve dalakta non-spesifik splenomegali ve punktal nekrotik lezyonlar tarif edilmiştir (Spletstoeser vd., 2005; World, 2007).

Kahverengi Avrupa tavşanı (*Lepus europaeus*) üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* suşunun inokulasyonunu takiben 1 gün sonra hayvanda ateş, letarji ve anoreksi gibi klinik semptomların gelişmeye başladığı görülmüştür. Beş tavşanın ikisinde inokulasyonu takiben 5-9. günlerde ölümler gözlenmiştir. Patolojik bulgulara splenomegali, diffuz dalak nekrozu ve hepatosit vakulasyonu ile birlikte fokal karaciğer nekrozları gözlenmiştir. Geri kalan diğer üç hayvan ötenazi yoluyla uyutulmuş ve nekropside herhangi bir patolojik belirtiyeye rastlanmamıştır (Gyuranecz vd., 2010). Fransa’da kahverengi tavşanlarda görülen doğal bir tularemi salgınında sekiz tavşanın hepsinde de splenomegali, birçok organda konjesyon ve hemorajik alanlar, trakeada yangı ve bronşit bildirilmiştir (Decors vd., 2011). Macaristan’da da kahverengi tavşanlarda görülen doğal enfeksiyonda benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Bandouchova vd., 2011).

Bir başka çalışmada, 20 dişi Yeni Zelanda beyaz tavşanı (*Oryctolagus cuniculus*) aerosol yolla deneysel olarak üç farklı dozda Tip A tularemiye maruz bırakılmıştır. Tavşanların 7’si ölürken diğerlerinde ateş, anoreksi ve kilo kaybı gibi semptomlar gözlenmiştir. Altı tavşanın hematolojik bulgularında lenfopeni, monositopeni ve trombositopeni saptanmıştır. Nekropsi bulgularında ise yoğun splenomegali görülmüş ve dalağın çok büyük çoğunluğunun nekroze olduğu tespit edilmiştir. Bazı tavşanların akciğerlerinde de hemorajik alanlar tarzında nodüller görülmüştür (Reed vd., 2011).

Evcil köpek ve kedilerde tularemi vakaları bildirilmiş olup bunların artropod kaynaklı veya enfekte hayvanlarla direkt temas, enfekte hayvanların yenmesi ya da aerosol yolla hayvanlara bulaşmış olabileceği düşünülmüştür (Woods vd., 1998; Meinkoth vd., 2004; Feldman, 2003; World, 2007). Enfekte kedilerde ateş, letarji, yorgunluk, kusma, anoreksi, dehidrasyon, bölgesel veya generalize lenfadenopati, splenomegali, dil veya orofarenjiyal ülserasyon ve sarılık gibi klinik belirtiler gözlenmiştir (Baldwin vd., 1991; Woods vd., 1998; World, 2007). Patolojik bulgulara ise lenf nodüllerinde, dalakta, karaciğerde ve akciğerlerde multiple nekrotik odaklar saptanmıştır. Aynı zamanda hayvanlarda nötrofillerin dejenerasyonuna bağlı olarak sıklıkla panlökopeni ve hiperbilirubinemi gözlenmiştir (Baldwin vd., 1991; Gustafson ve DeBows, 1996; Meinkoth vd., 2004). Köpekler enfeksiyon karşı kedilere göre daha dirençli olup klinik semptomlar ender görülmektedir (Meinkoth vd., 2004; Gustafson ve DeBows, 1996). Buna karşın köpekler enfeksiyonun nakledilmesinde taşıyıcı hayvan rolü üstlenmekte ve etkeni kontamine toprak veya ölü hayvanlarla temas sonucu diğer hayvanlara veya insanlara bulaştırabilmektedir. Çoğu vakada enfekte köpeklerin spontan olarak iyileştikleri görülmüştür (Feldman, 2003; Meinkoth vd., 2004; Siret vd., 2006).

2.6 Laboratuvar Teşhisleri

2.6.1 *Francisella tularensis*'in Mikrobiyolojik İdentifikasyonu

Temel biyokimyasal testler izolatların muhtemel tespitlerinde kullanılabilmekte olup bu testlerin immünolojik ve moleküler metotlarla da teyit edilmesi gerekmektedir. Glikozu veya gliserolü fermente edebilme duyarlılığındaki bazı biyokimyasal testler etkenlerin teşhisinde kullanılmaktadır (Splettstoesser vd., 2005). Glikozu fermente etme yeteneğindeki ticari Microlog MicrostationTMSsystem (Biolog Inc., Hayward, CA) testi *F. tularensis* subsp. *tularensis* ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* türlerinin birbirlerinden rahatlıkla ayrılmasını sağlamaktadır (Petersen vd., 2004; Splettstoesser vd., 2005). Ayrıca hücre duvarı yağ asitlerini analiz edebilen ticari Microbial Identification System (MIS) ve Library Generation System (LGS) (MIDI, Inc, Newark, NJ) sistemleri ile *Francisella* türlerinin soy bazında ayrımları mümkündür (Bernard vd., 1994; Splettstoesser vd., 2005). Klinik örneklerden veya kültürlerden immunoblot analizi ve immunofloresans mikroskopi gibi immün tabanlı teknikler de identifikasyonda kullanılabilmektedir (Splettstoesser vd., 2005).

2.6.2 Serolojik Yöntemler

Francisella tularensis'e karşı antikor gelişimi, enfeksiyonu takiben 10-20. günlerde saptanabilir düzeye ulaşmaktadır (World, 2007). Nekahat dönemi veya akut dönem arasındaki dört katlık titre artışı veya 1:160'lık titre teşhiste dikkate alınmaktadır (Ellis vd., 2002; Tärnvik ve Berglund, 2003; Mandell vd., 2005; Splettstoesser vd., 2005). Titreler 320-1280 arasında pik yapar ve daha sonra yavaşça düşmeye başlar (Tärnvik ve Berglund, 2003). Enfeksiyonun serolojik teşhisinde tam kan aglütinasyon testi (Widal's reaction), tüp aglütinasyon testi, mikroaglütinasyon assay, hemaglütinasyon, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ve immunoblot gibi testler kullanılmaktadır (Mandell vd., 2005; Lopes de Carvalho vd., 2009). ELISA testi farklı antikor sınıflarını (IgM, IgG ve IgA) ayrı ayrı saptayabilmesi gibi avantajları sayesinde diğer aglütinasyon testlerine oranla daha duyarlı bir testtir (Splettstoesser vd., 2005). ELISA testi ve takibinde konfirmasyon amaçlı immunoblot testlerinin birlikte kullanılması tulareminin teşhisinde tavsiye edilen iki basamaklı teşhis metodudur (Splettstoesser vd., 2005). Aynı metot hayvanlarda enfeksiyonun teşhisi amacıyla da kullanılabilmektedir. Aşırı duyarlı türlerde serolojik yöntemler sınırlı kalmaktadır. Bununla beraber, endemik bölgelerde *F. tularensis* antikorları tilki ve çakal gibi vahşi hayvanlarda sıklıkla tespit edilmektedir (Ellis vd., 2002; Bandouchova vd., 2011).

2.6.3 Moleküler Yöntemler

Francisella izolatlarının teşhisinde, kültürün mümkün olmadığı durumlarda veya negatif olduğu durumlarda moleküler metotlar çok değerli teşhis yöntemleri olmaktadır (World, 2007; Mandell vd., 2005; Lopes de Carvalho vd., 2009). Son yıllarda PCR tabanlı metotlar yüksek sensitivite ve spesifiteleri dolayısıyla *Francisella* izolatlarının klasifikasyon ve identifikasyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Splettstoesser vd., 2005; Ahlinder vd., 2012). Bunun yanında, *Francisella* alt türlerine yakın non-patojenik türlere bağlı yanlış pozitiflikler *Francisella* tür veya alt türlerinin identifikasyonlarında zorluklar oluşturabilmektedir (Ahlinder vd., 2012).

Konvansiyonel PCR'da *F. tularensis*'in yüzey membran lipoproteinlerini kodlayan tul4 ve fopA genleri hedef alınmaktadır. Her iki gen bölgesiyle yapılan PCR analizleri de kan, doku veya aerosol örneklerde etkenin teşhisinde yüksek sensitivite ve spesifite göstermektedir (Splettstoesser vd., 2005; World, 2007 Oyston, 2008). PCR ürünlerinin spesifitesi sekanslama ile ya da reverse line blotting (RLB) veya restriction fragment-length polymorphism (RFLP) testleriyle konfirme edilmektedir (Splettstoesser vd., 2005). Son yıllarda özellikle ISFtu2, 23 kDA, tul4 ve fopA gen bölgelerini hedef alan ve spesifite ile sensitivitesi diğer PCR tabanlı testlere göre daha yüksek olan TaqMan™ (Applied Biosystems) Real Time PCR tekniği geliştirilmiştir (Splettstoesser vd., 2005; World, 2007).

Francisella türlerinin teşhisinde pulse-field gel electrophoresis (PFGE), amplified fragment-length polymorphism (AFLP), ribotyping, 16S rDNA gen sekansı, canonic insertion deletions ve paired-end sequence mapping gibi ileri teknolojik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır (Ellis vd., 2002; Fey vd., 2007; Larsson vd., 2007; Vogler vd., 2009). Ayrıca tularemi enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisinde ve alt türlerin ayrımında variable-number tandem repeats (VNTR), multiple-locus VNTR analysis (MLVA) ve short-tandem repeats (STR) gibi tiplendirme yöntemleri de kullanılmaktadır (Johansson vd., 2004; Splettstoesser vd., 2005; Larsson vd., 2007).

2.7 Tedavi

Tularemi enfeksiyonları genellikle antibiyotik tedavisine yanıt vermektedir. Geçmişten beri insanların tedavisinde aminoglikozit bileşikleri kullanılmaktadır. Bu bileşikler klinik olarak efektif olmalarının yanında ototoksisite ve nefrotoksisiteye sebep olmalarından dolayı günümüzde çok nadir kullanılmaktadır. Buna karşın pnömonik tulareminin tedavisinde gentamisin kullanılmakta ve aminoglikozitler genellikle çok ciddi vakalarda tercih

edilmektedir. Kloramfenikol oldukça efektiftir ancak hematopoietik sistem üzerindeki yan etkileri sebebiyle nadiren ilk tercih olarak kullanılmaktadır. Tetrasiklinler tedavi edilen bireylerde olumsuz sonuçlar doğurduğundan geri çekilmiş ve kullanılmamaya başlanmıştır. Siprofloksasin gibi florokinonlar özellikle komplikasyon görülmeyen tularemi vakalarının tedavisinde oldukça etkili olmakta ve sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca siprofloksasinin çocuklarda ve hamile bayanlarda tularemi enfeksiyonlarının tedavisinde etkili ve uygun olduğu kanıtlanmıştır (World, 2007; Oyston, 2008). Evcil köpeklerde terapötik opsiyon olarak gentamisin, enrofloksasin, doksisilin ve kloromfenikol gibi bileşikler tercih edilmektedir (Feldman, 2003; Meinkoth vd., 2004). Kedilerde ise enfeksiyonun erken dönemlerinde doksisilin veya enrofloksasin ve amoksisilin klavulanik asit tedavilerinin faydalı olduğuna dair raporlar bulunmaktadır (Valentine vd., 2004).

2.8 Aşılamaya

Günümüzde *F. tularensis*'e karşı halen daha lisanslı bir aşı bulunmamakta olup 1950'lili yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde attenué Tip B suşundan üretilmiş ve "Live Vaccine Strain (LVS)" olarak bilinen bir aşının askeri personeli ve laboratuvar çalışanlarını aşılama amacıyla kullanıldığı rapor edilmiştir (World, 2007; Oyston, 2008; Zvi vd., 2012; Eneslätt vd., 2012). LVS'nin pnömonik tularemiye karşı korumada başarısız olduğu ve yüksek titrelere ulaştığında insanlarda hafif tularemiye neden olarak istenmeyen yan etkilere sebep olduğu bildirilmiştir (Rockx-Brouwer vd., 2012). LVS'nin bu kısıtlı etkisinden yola çıkarak son yıllarda subunit aşı üretimi amacıyla farklı immunojenik komponentlerden oluşan canlı veya attenué suşlardan oluşan aşı formülasyonları üzerine araştırmalara ağırlık verilmiştir (Oyston, 2008; Zvi vd., 2012). Bu amaçla Tip A tularemi suşu olan SchuS4'ten attenué suşlar geliştirilmiştir. LVS ve SchuS4 suşları arasında gerçekte fonksiyonları tam olarak ortaya konmamış ve farklı protein sekanslarını kodlayan 35 gen farklılığı bulunmaktadır (Rockx-Brouwer vd., 2012). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, düşük dozda spesifik mutant *F. tularensis* SchuS4 suşunun inokulasyonu ile parenteral ve intranasal vahşi tip SchuS4 suşuna karşı koruma sağlandığı rapor edilmiştir (Eneslätt vd., 2011). Bu durum *F. tularensis*'e karşı oluşan bağışıklıkta humoral bağışıklığın yanında memory T hücre yanıtının kritik role sahip olduğunu kanıtlar niteliktedir. Bu özellik, etkin bir hücresel yanıtı sebep olan antijenik determinantların identifiye edilmesini amaçlayan aşı çalışmalarında temel teşkil etmektedir (Oyston, 2008; Zvi vd., 2012; Eneslätt vd., 2012; Rockx-Brouwer vd., 2012). Tularemiye karşı aşılama sonrası hücresel immünite 30 yıl kalıcılığını sürdürmektedir (Eneslätt vd., 2011; Eneslätt vd., 2012). Yapılan çalışmaların sonucunda periferik mononükleer kan

hücreleri tarafından INF- γ , macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β ve CD107a (lysosome-associated membrane protein 1 ya da LAMP-1) üretiminin tularemiye karşı gelişen immün yanıtın karakteristik özelliği olduğu belirlenmiştir (Eneslätt vd., 2012).

2.9 Türkiye’de Tularemi

Türkiye’nin üç farklı bölgesinde 1936 ve 1953 yılları arasında tularemi epidemileri rapor edilmiştir (Gotschlich ve Berkin,1938; Dirik, 1939; Golem, 1945; Utku, 1954). Takiben uzun bir müddet herhangi bir salgın bildirilmemiştir. Ancak 1988-2002 yılları arasında Bursa’nın farklı yörelerinden, 1988-2005 yılları arasında da Türkiye’nin farklı coğrafyalarından tularemi salgınları rapor edilmiştir (Kılıçturgay vd., 1989; Gedikoğlu vd., 1990; Gedikoğlu, 1996; Helvacı vd., 2000; Erbay vd., 2000; Şencan vd., 2000; Özyürek vd., 2001; Gürcan vd., 2004; Celebi vd., 2006; Meric vd., 2008) (Tablo 1).

Tablo 1. Türkiye’den bildirilmiş tularemi vakaları

Yıl	Bölge	Vaka sayısı	Bulaşma şekli	Klinik form	Mortalite	Kaynak
1936	Lüleburgaz Kırklareli Tekirdağ	150	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	1	Gotschlich ve Berkin,1938
1938	Van	6	Gıda kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Dirik, 1939
1945	Lüleburgaz	18	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Golem, 1945
1953	Antalya	200	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Utku, 1954
1988- 2002	Bursa	205	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Kılıçturgay vd., 1989
2000	Ayaş, Ankara	16	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Erbay vd., 2000
2004- 2005	Zonguldak Bartın Kastamonu	61	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Celebi vd., 2006
2004- 2005	Kocaeli	145	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Meric vd., 2008
2004	Samsun	43	Su kaynaklı	Orofarenjiyal-glandular	0	Leblecioğlu vd., 2008
2005	Edirne	10	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Gürcan vd.,

						2006
2004- 2005	Kars	56	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Şahin vd., 2007
2005	Gölcük, Kocaeli	5	Su kaynaklı	Orofarenjiyal	0	Karadenizli vd., 2005

Türkiye’de tularemi olgularının çoğunun su kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Türkiye’de bugüne kadar artropod kaynaklı tularemi olgusu bildirilmemiştir. 1988-2005 yılları arasında Türkiye’den bildirilmiş tularemi vakalarında salgınların bakterinin yayılışıyla mı alakalı olduğu ya da eski tularematik odaklarda enfeksiyon açısından tekrar bir alevlenme mi olduğu tam olarak netliğe kavuşturulamamıştır. 2005 yılından sonra Türkiye’de yaklaşık 5000’in üzerinde vaka bildirilmiştir. Araştırmacıların çoğuna göre Türkiye’deki tularemi salgınlarının başlıca kaynağının su kaynakları olduğu ve enfeksiyonun özellikle çiftçilerde, ev hanımlarında, çocuklarda, avcılarda ve orman işçilerinde görüldüğü rapor edilmiştir (Dedeloğlu vd., 2007; Ozdemir vd., 2007; Barut ve Cetin, 2009; Willke vd., 2009; Akalin vd., 2009; Sencan vd., 2009; Meric vd., 2010; Uyar vd., 2011; Yazgı vd., 2011; Tatman Otkun vd., 2011; Çağlı vd., 2011; Ulu Kılıç vd., 2011, 2013; Dikici vd., 2012; Bayhan-Taş vd., 2012; Mengeloglu vd., 2014; Kızıl vd., 2014; Tuncer vd., 2014; Bozkurt vd., 2014; Balcı vd., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Materyali ve Genomik DNA Havuzlarının Oluşturulması

Bu çalışmanın materyalini TÜBİTAK 107O533 kodlu ve “*Dirofilaria immitis*’in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı ve Kayseri Yöresinde Vektör Sivrisineklerin Ekolojisi” başlıklı araştırma projesi kapsamında Kayseri’nin çeşitli bölgelerinden toplanıp tür teşhisleri yapılmış ve tür ile araştırma bölgesine göre kategorize edilerek genomik DNA havuzları oluşturulmuş (1-17 örnek/havuz) ergin dişi sivrisinek (Culicidae: Diptera) örnekleri (Tablo 2-3) ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen EÜBAP VA-05-05 kodlu ve “Sığırlarda Görülen *Theileria* ve *Babesia* Türlerinin Vektör Kenelerde Moleküler Biyolojik Teşhisi” başlıklı araştırma projesi kapsamında Kayseri yöresindeki sığır ve barınaklardan toplanmış ve tür teşhisleri yapılarak genomik DNA havuzları oluşturulmuş [Çalışmada mevcut kene havuzları aynı türe ait ergin dişi ve erkek kenelerden oluşturulmuştur. Örnek sayısı 10’un üzerinde olan havuzlar bölünerek DNA ekstrakte edilmiş ve elde edilen genomik DNA ekstraktları aynı havuzda birleştirilmiştir.] ergin Ixodid kene türleri (Tablo 4) oluşturmuştur. Çalışmada ayrıca araştırma periyodu boyunca Kayseri yöresinde enfeste insanlardan laboratuvarımıza teşhis amaçlı getirilmiş ixodid kene örnekleri de analiz edilmiştir. Bu kene örneklerinin morfolojik identifikasyonları steromikroskop altında ilgili teşhis anahtarına (Estrada-Pena vd., 2004) göre yapılmış ve moleküler analizlere kadar %70 etil alkol içerisinde muhafaza edilmiştir. Moleküler analizler öncesi insanlardan elde edilen toplam 362 ergin ixodid kene örneği de türe göre kategorize edilmiş ve toplam 42 genomik DNA havuzu (3-10 örnek/havuz) oluşturulmuştur.

Tablo 2. 2008 yılı sivrisinek sezonunda örnekleme merkezlerine göre toplanan sivrisinek türleri ve oluşturulan genomik DNA havuz sayıları

Nokta	Koordinat	Bağlı olduğu merkez	Sivrisinek Türü								DNA Havuz Sayısı	
			<i>Ae. vexans</i>		<i>Cx. pipiens</i>		<i>Cx. theileri</i>		<i>Cx. hortensis</i>		Baş/Toraks	Abdomen
			Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
NKT-1	38°34.002'N 35°11.197'E	İncesu	41	4,74	21	2,43	33	3,82	19	2,20	7	7
NKT-2	38°53.041'N 35°35.455'E	Kızık	60	6,94	15	1,73	-	-	-	-	4	4
NKT-3	38°13.891'N 35°11.968'E	Yeşilhisar	-	-	15	1,73	-	-	2	0,23	2	2
NKT-4	38°12.912'N 35°17.798'E	Yeşilhisar	-	-	15	1,73	-	-	-	-	1	1
NKT-5	38°53.023'N 35°35.465'E	Kızık	9	1,04	3	0,35	-	-	-	-	2	2
NKT-6	38°53.043'N 35°35.120'E	Kızık	15	1,73	7	0,81	-	-	-	-	2	2
NKT-7	38°53.156'N 35°35.282'E	Kızık	-	-	7	0,81	-	-	-	-	1	1
NKT-8	38°53.859'N 35°37.062'E	Kızık	-	-	7	0,81	-	-	-	-	1	1
NKT-9	38°53.034'N 35°35.352'E	Kızık	40	4,62	-	-	-	-	-	-	3	3
NKT-10	38°49.726'N 35°34.014'E	Kızık	10	1,16	29	3,35	-	-	-	-	3	3
NKT-11	38°52.253'N 35°39.587'E	Gömeç	8	0,92	5	0,58	-	-	-	-	2	2
NKT-12	38°49.727'N 35°34.002'E	Akçatepe	11	1,27	13	1,50	-	-	-	-	2	2
NKT-13	38°53.042'N 35°35.217'E	Kızık	7	0,81	3	0,35	-	-	-	-	2	2
NKT-14	38°51.924'N 35°15.944'E	Yemliha	4	0,46	18	2,08	-	-	-	-	2	2

NKT-15	38 ⁰ 45.257'N 35 ⁰ 18.565'E	Boğazköprü	-	-	247	28,55	-	-	-	-	19	19
NKT-16	38 ⁰ 44.252'N 35 ⁰ 17.507'E	Saraycık	-	-	33	3,82	-	-	-	-	2	2
NKT-17	38 ⁰ 40.521'N 35 ⁰ 18.246'E	Dokuzpınar	11	1,27	117	13,53	-	-	-	-	8	8
NKT-18	38 ⁰ 22.079'N 35 ⁰ 20.305'E	Develi	-	-	24	2,77	-	-	-	-	2	2
NKT-19	38 ⁰ 20.938'N 35 ⁰ 22.124'E	Sindelhöyük	-	-	16	1,85	-	-	-	-	1	1
TOPLAM			216	24,97	595	68,77	33	3,81	21	2,43	66	66

Tablo 3. 2009 yılı sivrisinek sezonunda örnekleme merkezlerine göre toplanan sivrisinek türleri ve oluşturulan genomik DNA havuz sayıları

Nokta	Koordinat	Bağlı olduğu merkez	Sivrisinek Türü												DNA Havuz Sayısı	
			<i>Ae. vexans</i>		<i>Cx. pipiens</i>		<i>Cx. theileri</i>		<i>Cx. hortensis</i>		<i>Cu. annulata</i>		<i>An. maculipennis</i>		Baş/Toraks	Abdomen
			Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
NKT-1	38°52.459'N 35°45.166'E	Bünyan	3	0,06	7	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
NKT-2	38°16.340'N 35°16.573'E	Sultan Sazlığı	60	1,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6
NKT-3	38°49.649'N 35°34.127'E	Akçatepe	5	0,09	2	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
NKT-4	38°47.897'N 35°32.221'E	Buğdaylı	16	0,30	1	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
NKT-5	38°49.700'N 35°33.248'E	Akçatepe	204	3,82	76	1,42	-	-	-	-	-	-	-	-	27	27
NKT-6	38°53.023'N 35°35.157'E	Kızık	24	0,45	98	1,84	3	0,06	-	-	1	0,02	-	-	12	12
NKT-7	38°51.543'N 35°31.925'E	Akın	22	0,41	8	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
NKT-8	38°53.559'N 35°37.490'E	Güneşli	22	0,41	81	1,52	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10
NKT-9	38°52.243'N 35°44.968'E	Ağırnas	7	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
NKT-10	38°51.392'N 35°47.067'E	Bünyan	64	1,20	4	0,07	18	0,34	-	-	-	-	4	0,07	10	10
NKT-11	38°46.265'N 35°26.824'E	Karpuzatan	-	-	20	0,37	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
NKT-12	38°46.698'N 35°23.407'E	Oymağaç	-	-	23	0,43	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
NKT-13	38°53.042'N 35°35.217'E	Yeşilyurt	42	0,79	54	1,01	-	-	-	-	2	0,04	-	-	10	10

NKT-14	38°49.235'N 35°37.394'E	Yeşilyurt	69	1,29	150	2,81	-	-	15	0,28	9	0,17	2	0,04	25	25
NKT-15	38°46.361'N 35°33.648'E	Cırgalan	-	-	90	1,69	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
NKT-16	38°52.902'N 35°35.091'E	Kızık	229	4,29	152	2,85	-	-	-	-	-	-	19	0,36	39	39
NKT-17	38°53.023'N 35°35.150'E	Kızık	237	4,44	160	3,00	-	-	-	-	-	-	21	0,39	41	41
NKT-18	38°41.308'N 35°19.946'E	Dokuzpınar	28	0,52	19	0,36	-	-	-	-	1	0,02	11	0,21	6	6
NKT-19	38°45.274'N 35°18.781'E	Boğazköprü	6	0,11	56	1,05	-	-	-	-	3	0,06	-	-	7	7
NKT-20	38°53.012'N 35°35.456'E	Kızık	462	8,65	218	4,08	53	0,99	-	-	11	0,21	2	0,04	74	74
NKT-21	38°52.872'N 35°35.485'E	Kızık	335	6,28	159	2,98	38	0,71	-	-	8	0,15	1	0,02	54	54
NKT-22	38°23.639'N 35°55.092'E	Tomarza	3	0,06	10	0,19	-	-	-	-	10	0,19	-	-	3	3
NKT-23	38°53.006'N 35°35.161'E	Kızık	310	5,81	165	3,09	21	0,39	-	-	4	0,07	-	-	50	50
NKT-24	38°52.004'N 35°36.538'E	Salur	217	4,07	115	2,15	15	0,28	-	-	3	0,06	-	-	34	34
NKT-25	38°52.740'N 35°41.762'E	Barsama	162	3,03	115	2,15	-	-	-	-	23	0,43	-	-	29	29
NKT-26	38°53.023'N 35°35.145'E	Kızık	164	3,07	167	3,13	12	0,22	-	-	5	0,09	2	0,04	35	35
NKT-27	38°15.533'N 35°37.317'E	Develi	295	5,53	65	1,22	-	-	-	-	20	0,37	-	-	37	37
TOPLAM			2986	55,94	2015	37,75	160	2,99	15	0,28	100	1,87	62	1,16	533	533

Tablo 4. Kayseri’de sığır ve barınaklardan toplanan ergin kenelerden oluşturulmuş genomik DNA havuzlarında kene türlerinin dağılımı

Havuzlar	Alındığı Yer	Kene Türü	Kene Sayısı
1	Dadaloğlu/Tomarza	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	26
2	Kadılı/Pınarbaşı	<i>H. m. marginatum</i>	66
3	Kadılı/Pınarbaşı	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	66
4	Kadılı/Pınarbaşı	<i>Hae. parva</i>	96
5	Kadılı/Pınarbaşı	<i>D. marginatus</i>	20
6	Tekmen/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	33
7	Tekmen/Gemerek	<i>Rh. turanicus</i>	88
8	Tekmen/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	59
9	Burhan/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	35
10	Burhan/Gemerek	<i>Rh. turanicus</i>	71
11	Burhan/Gemerek	<i>H. d. detritum</i>	1
12	Burhan/Gemerek	<i>Rh. bursa</i>	3
13	Burhan/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	2
14	Yeniçubuk/Gemerek	<i>H. m. marginatum</i>	4
15	Yeniçubuk/Gemerek	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	78
16	Büyükkünye/Develi	<i>H. m. marginatum</i>	66
17	Büyükkünye/Develi	<i>Rh. turanicus</i>	42
18	Çamrak/Yeşilhisar	<i>H. a. excavatum</i>	50
19	Çamrak/Yeşilhisar	<i>Rh. turanicus</i>	15
20	Çamrak/Yeşilhisar	<i>H. a. anatolicum</i>	76
21	Bakırdağı/Develi	<i>H. m. marginatum</i>	1
22	Bakırdağı/Develi	<i>Rh. turanicus</i>	2
23	Yaylacı/Sarız	<i>H. m. marginatum</i>	6
24	Kurtini/Sarız	<i>H. m. marginatum</i>	30
25	Kurtini/Sarız	<i>Rh. bursa</i>	20
26	Kurtini/Sarız	<i>Hae. sulcata</i>	2
27	Kurtini/Sarız	<i>Hae. parva</i>	10
28	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	5
29	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. sanguineus</i>	1
30	Palas/Sarioğlu	<i>H. a. excavatum</i>	3
31	Palas/Sarioğlu	<i>H. m. marginatum</i>	4
32	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. turanicus</i>	1
33	Palas/Sarioğlu	<i>Rh. bursa</i>	5
34	Şeyhşaban/İncesu	<i>H. a. anatolicum</i>	24
35	Şeyhşaban/İncesu	<i>H. d. detritum</i>	66
36	Dokuzpınar/İncesu	<i>H. a. anatolicum</i>	5
37	Dokuzpınar/İncesu	<i>H. d. detritum</i>	2
38	Dokuzpınar/İncesu	<i>Rh. (Boophilus) annulatus</i>	31
TOPLAM			1115

3.2 DNA Ekstraksiyonu ve Konsantrasyonların Belirlenmesi

Daha önce ilgili projeler kapsamında kene ve sivrisinek örneklerinden hali hazırda oluşturulmuş havuzlardan elde edilmiş olan genomik DNA ekstraktları nanodrop spektrofotometrik ölçümlerden sonra moleküler analizlerde kullanılmıştır. Bunun yanında enfeste insanlardan temin edilen 362 ergin kene örneğinden oluşturulmuş havuzlardan ise genomik DNA izolasyonu tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazı (ExiPrep-16, Bioneer) ve AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kiti (AP-MN-MS-GDNA-250, Axygen Biosciences, USA) kullanılarak yapılmıştır. Havuzlardan elde edilen genomik DNA ekstraktlarının konsantrasyonları ASP-3700 (ACT Gene) nanodrop spektrofotometrede belirlenmiştir. Real Time PCR ve standart PCR aşamalarından önce saptanan genomik DNA konsantrasyonlarına göre örnekler için en uygun sulandırma hazırlanmıştır. Elde edilen DNA'lar kullanılabilecek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3 Real Time PCR Analizleri

Kene ve sivrisinek türlerinden elde edilen genomik DNA havuzlarında *Francisella tularensis*-spesifik *lpxA* geni TaqMan prob bazlı Real Time PCR kullanılarak araştırılmıştır. *lpxA* geninin amplifikasyonu amacıyla iQFt1F (5'-CGCAGGTTTAGCGAGCTGTT-3') ve iQFt1R (5'-GCAG CTTGCTCAGTAGTAGCTGTCT-3') primerleri, floresan prob olarak ise iQFt1 Prob (5'-FAM-CATCATCAGAGCCACCTAACCCTA-BHQ1-3') kullanılmıştır. Her bir reaksiyon 50ng template DNA, 2XTaqMan qPCR master miks, 20µM iQFt1F ve iQFt1R primerleri, 5µM iQFt1 Prob içerecek şekilde steril PCR grade deiyonize su ile total hacim 25µl'ye tamamlanmıştır (Thelais vd., 2009; Broman vd., 2011). Herbir örnek ikili olarak çalışılmıştır.

Real Time PCR analizleri Stratagene Mx 3005P (Stratagene, Agilent Technologies, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan termal profil aşağıda gösterilmiştir (Thelais vd., 2009).

I.	50 °C 2dk	1 siklus
II.	95 °C 10dk	1 siklus
III.	95 °C 15s	40 siklus
IV.	60 °C 60s	

lpaA genini hedef alan TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizlerinin geçerliliği açısından her reaksiyonda pozitif kontrol olarak Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden temin edilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* (NCTC 10857 kod nolu) izolatından elde edilmiş genomik DNA, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır.

3.4 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Çalışmada olası pozitif örneklerle ait izolatların moleküler genotiplendirmesi için hedef gen bölgesi olarak 16S rRNA belirlenmiştir. Real Time PCR analizleri yapılan her bir örnek yine ikili olarak 16S rRNA gen bölgesinin yaklaşık 1150 bp bölgesini parsiyel olarak amplifiye eden *Francisella*-specific Fr153F0.1 (5'-GCCCATTTGAGGGGGATAACC-3') ve Fr1281R0.1 (5'-GGACTAAGAGTACCTTTTTTGAGT-3') primerleri ile PCR analizine tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı 25µl final konsantrasyonda; 2,5 µl 10XPCR buffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 µM her bir primer, 200 mM her bir dNTP ve 1U Taq DNA polymerase ve 50ng template DNA olarak hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 94°C'de 4 dk; 40 siklus, denaturation: 94°C'de 30s, annealing: 60°C'de 45s, extension: 72°C'de 1dk; final siklus: 60°C'de 45s ve 72°C'de 20 dk olacak şekilde programlanmıştır (Broman vd., 2011). PCR analizlerinin geçerliliği açısından her reaksiyonda pozitif kontrol olarak Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden temin edilen *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* (NCTC 10857 kod nolu) izolatından elde edilmiş genomik DNA, negatif kontrol olarak ise steril deiyonize su kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Enfeste insanlardan toplanmış ixodid kenelerin tür identifikasyonları

Kayseri yöresinde enfeste insanlardan laboratuvarımıza teşhis amaçlı getirilmiş ve ilgili teşhis anahtarlarına göre tür identifikasyonları yapılmış olan ixodid kene türleri ve bunlardan oluşturulan genomik DNA havuz sayıları Tablo 5’de verilmiştir. Tür identifikasyonları yapılan bazı örnekler Şekil 3-22’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Kayseri yöresinde enfeste insanlardan toplanmış ergin kene türleri ve oluşturulan genomik DNA havuzları

Kene Türü	Kene Sayısı	Oluşturulan Havuz Sayısı
<i>I. ricinus</i>	5	1
<i>Hae.parva</i>	39	4
<i>Hae.sulcata</i>	3	1
<i>H.m.marginatum</i>	86	9
<i>H.a.anatolicum</i>	14	2
<i>H.a.excavatum</i>	20	2
<i>H.d.detrutum</i>	3	1
<i>H. dromedarii</i>	13	2
<i>Rh.turanicus</i>	114	12
<i>Rh.bursa</i>	38	4
<i>Rh.sanguineus</i>	16	2
<i>D.marginatus</i>	11	2
TOPLAM	362	42



Şekil 3. Ergin dişi *Ixodes ricinus*



Şekil 4. Ergin dişi *Hyalomma dromedarii*



Şekil 5. Ergin erkek *Hyalomma marginatum marginatum*



Şekil 6. Ergin dişi *Hyalomma marginatum marginatum*



Şekil 7. Ergin erkek *Hyalomma anatolicum anatolicum*



Şekil 8. Ergin dişi *Hyalomma anatolicum anatolicum*



Şekil 9. Ergin erkek *Hyalomma anatolicum excavatum*



Şekil 10. Ergin dişi *Hyalomma anatolicum excavatum*



Şekil 11. Ergin erkek *Haemaphysalis parva*



Şekil 12. Ergin dişi *Haemaphysalis parva*



Şekil 13. Ergin erkek *Haemaphysalis sulcata*



Şekil 14. Ergin dişi *Haemaphysalis sulcata*



Şekil 15. Ergin erkek *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus*) *turanicus*



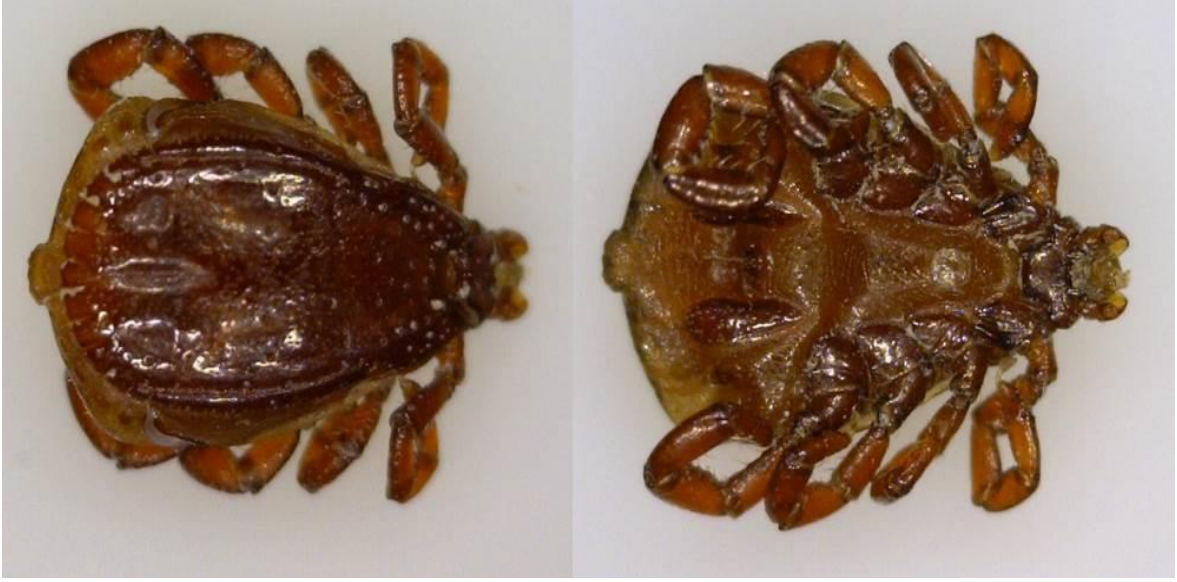
Şekil 16. Ergin dişi *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus*) *turanicus*



Şekil 17. Ergin erkek *Rhipicephalus (Rhipicephalus) bursa*



Şekil 18. Ergin dişi *Rhipicephalus (Rhipicephalus) bursa*



Şekil 19. Ergin erkek *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus*



Şekil 20. Ergin dişi *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus*



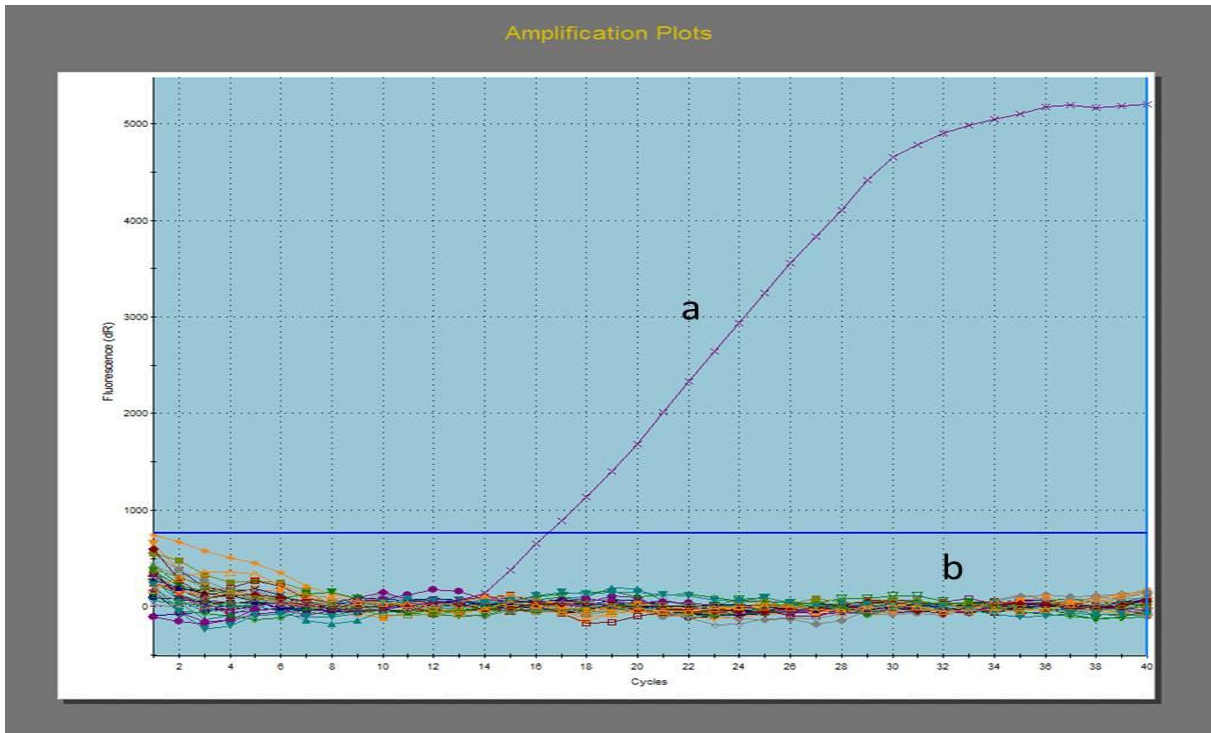
Şekil 21. Ergin erkek *Dermacentor marginatus*



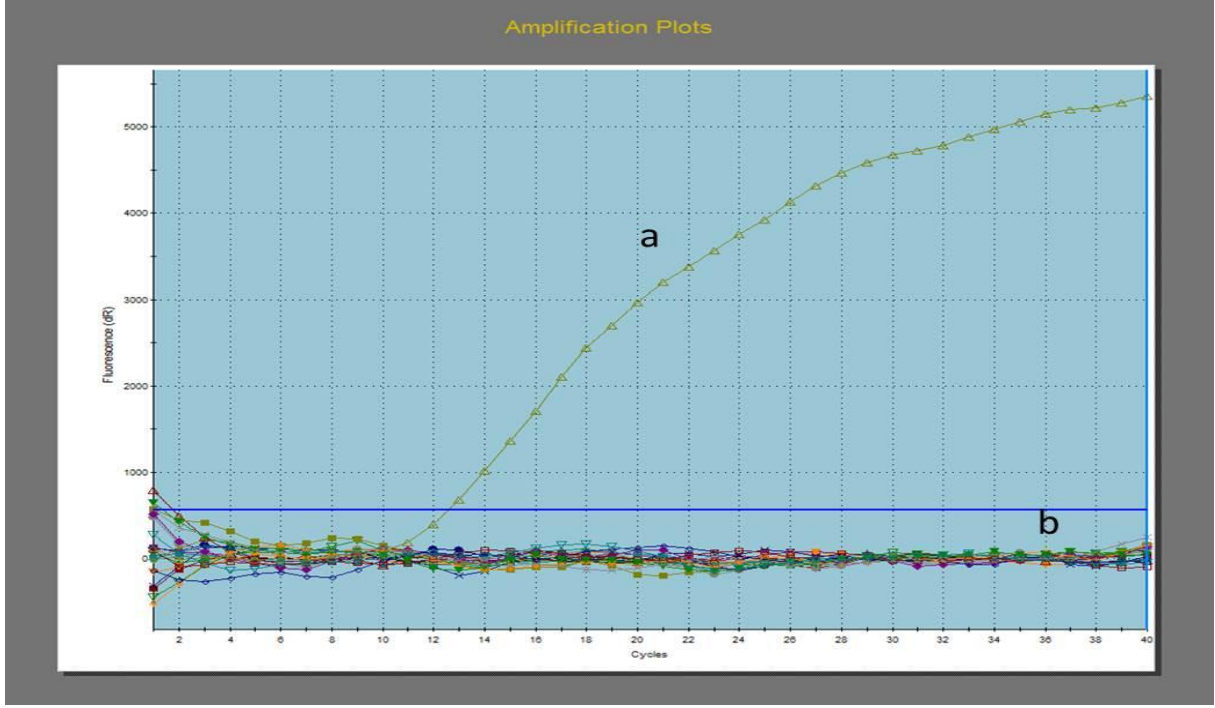
Şekil 22. Ergin dişi *Dermacentor marginatus*

4.2 Real Time PCR Analiz Sonuçları

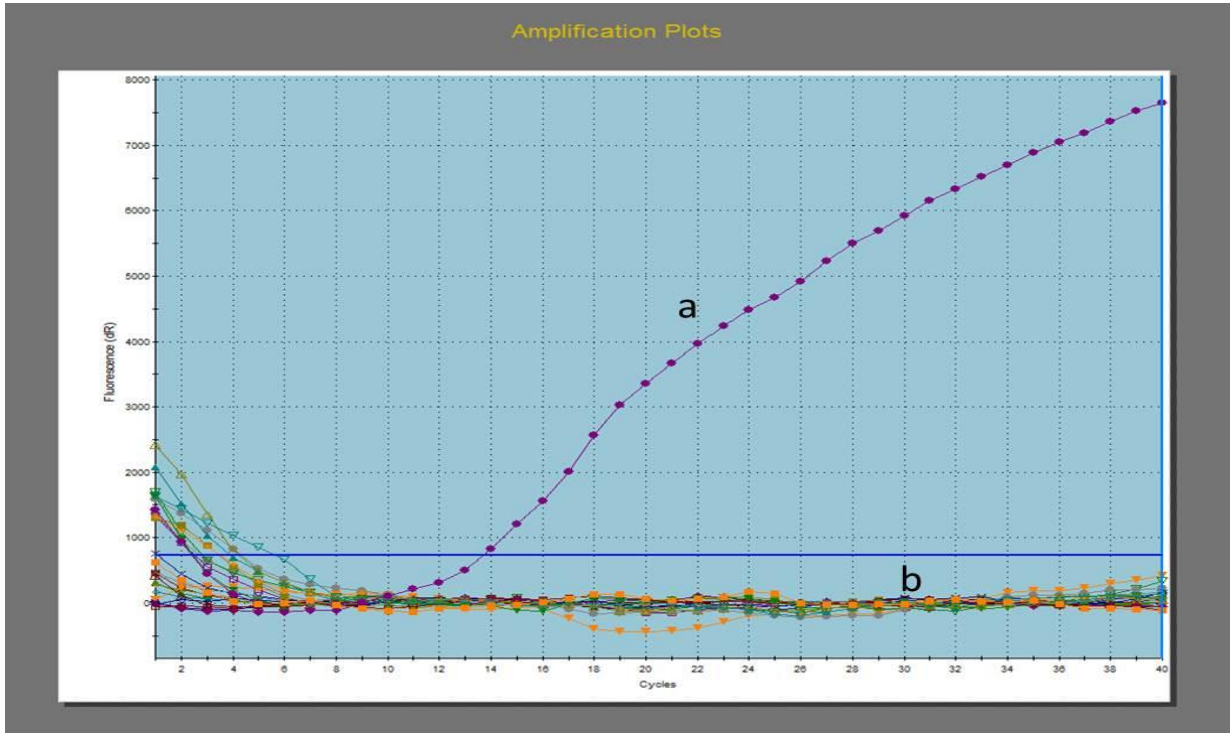
TaqMan prob tabanlı Real Time PCR sonuçlarına göre incelemesi yapılan sığır, barınak ve insanlardan elde edilmiş toplam 1477 ergin ixodid kene ve 6203 sivrisinekten oluşturulmuş genomik DNA havuzlarının hiçbirinde *Francisella tularensis* DNA'sına rastlanmamıştır. TaqMan prob tabanlı Real Time PCR'da *Francisella tularensis* için *lpaA* gen bölgesini amplifiye eden spesifik primer ve problarla örneklerin analiz sonuçları Şekil 23-25'de verilmiştir.



Şekil 23. Sığır ve barınaklardan toplanmış kenelerden elde edilen DNA havuzlarında *Francisella tularensis* yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları, a: Pozitif kontrol, b: Negatif örnekler



Şekil 24. İnsanlardan temin edilmiş kenelerden elde edilen DNA havuzlarında *Francisella tularensis* yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları, a: Pozitif kontrol, b: Negatif örnekler



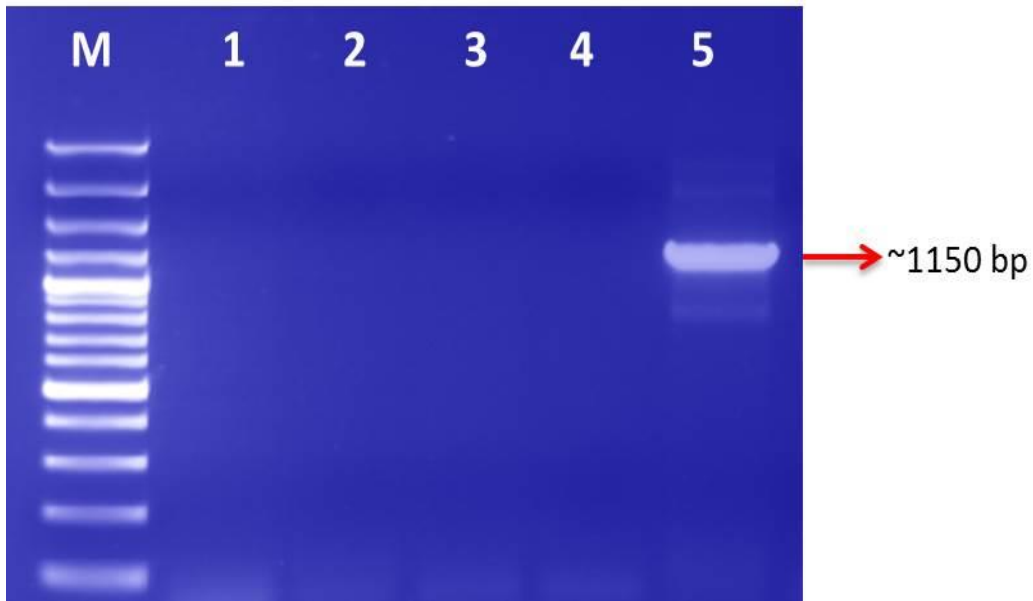
Şekil 25. Sivrisineklerden elde edilen DNA havuzlarında *Francisella tularensis* yönünden TaqMan prob bazlı Real Time PCR analiz sonuçları, a: Pozitif kontrol, b: Negatif örnekler

Şekil 23-25’de de görüldüğü üzere Real Time PCR ile analiz edilen kene ve sivrisinek örneklerinin hiçbirinde Ct (dR) (Eşik değer siklusu) değeri saptanamamışken, pozitif kontrol

olarak kullanılan *F. tularensis* subsp. *holarctica* (NCTC 10857 kod nolu) izolatından elde edilmiş genomik DNA'da Ct (dR) değerinin yaklaşık $14 \pm 2,0$ olduğu belirlenmiştir.

4.3 16S rRNA Gen Bölgesi Analizleri

TaqMan prob tabanlı Real Time PCR analizleri gerçekleştirilen tüm örneklerin aynı zamanda spesifitenin kontrolü amacıyla 16S rRNA gen bölgesi yönünden PCR analizleri gerçekleştirilmiş ve örneklerde pozitifliğe rastlanmamıştır. Buna karşın pozitif kontrol olarak Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezinden temin edilen *F. tularensis* subsp. *holarctica* (NCTC 10857 kod nolu) izolatından elde edilmiş genomik DNA ekstraktının PCR analizlerinde agaroz jel üzerinde spesifik olarak yaklaşık 1150 bp büyüklüğünde ampikon belirlenmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. Bazı örneklerin *Francisella tularensis* 16S rRNA gen bölgesi PCR analizleri sonucu jel elektroforezde görünümü, M: Marker; 1-2: Negatif kene DNA örnekleri, 3-4: Negatif sivrisinek DNA örnekleri, 5: Pozitif kontrol

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde insan ve hayvanlarda potansiyel ölümcül hastalıklara yol açabilen en virulent birkaç mikroorganizmden biri olan *F. tularensis* (Petersen ve Schriefer, 2005; Lopes de Carvalho vd., 2009) farklı patojenitelere ve coğrafik dağılımlara sahip 3 alt türe ayrılmıştır (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica* ve *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*). *Francisella novicida*, genom sekansında *F. tularensis* ile ortalama %99,2 nükleotid identikliği göstermesi dolayısıyla günümüzde bilim insanlarının çoğunluğu tarafından *F. tularensis*'in dördüncü alt türü olarak kabul edilmektedir (Ellis vd., 2002; Oyston, 2008; Birdsell vd., 2009; Vogler vd., 2009; Huber vd., 2010; Hansen vd., 2011; Siddaramappa vd., 2011; Brett vd., 2012). Tip A olarak klasifiye edilen ve en virulent alt tür olarak bildirilen *F. tularensis* subsp. *tularensis* ağırlıklı olarak Kuzey Amerika'da görülmektedir (Whipp vd., 2003; Petersen ve Schriefer, 2005; Oyston, 2008; Lopes de Carvalho vd., 2009; Hansen vd., 2011). Tip B olarak sınıflandırılan ve daha hafif seyirli enfeksiyona yol açan *F. tularensis* subsp. *holarctica* Kuzey Hemisferi boyunca dağılım göstermektedir (Whipp vd., 2003; Birdsell vd., 2009; Lopes de Carvalho vd., 2009). *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*'yla benzer virulens göstermekte olup coğrafik dağılımı Orta Asya ile sınırlıdır. *F. novicida* ise daha az virulense sahip olup Kuzey Amerika, Avusturalya ve Tayland'da izole edilmiştir (Carvalho vd., 2014).

F. tularensis insanlara enfekte hayvanlarla doğrudan temas, kontamine su veya gıdaların alınması, kan emen artropodlar (sivrisinek, kene gibi) veya enfekte toz veya aerosollerin solunması yolu ile bulaşır. *F. tularensis*, enfektivitesi yüksek bir bakteri olup biyolojik savaş ajanları içinde yer alır (Morner, 1992; Pearson, 1998; Ellis vd., 2002; Foley ve Nioto, 2010). *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* tarafından oluşturulan tularemi'nin naklinde, Kuzey Amerika'da yaygın olan evcil (*Sylvilagus* spp.) ve yabani tavşanlar (*Lepus* spp.) önemli rol oynarlar (Keim vd., 2007). Ancak, tavşanların yaygın olarak tularemi'nin rezervuarı olarak bildirilmesine karşın asıl rezervuarların çevresel fomitler ve/veya artropod vektörlerin olduğu ortaya çıkmıştır. Kuzey Amerika'nın güney, orta ve doğu bölgelerinde tularemi'ye vektörlük yapan ixodid kene türleri *Amblyomma americanum* ve *D. variabilis* olarak bildirilmiştir (Sonenshine, 1993). Keneler yaşam sikluslarının değişik evrelerinde birden fazla konak kullanmaktadırlar. Bu durum keneleri hem rezervuar hem de vektör olarak ortaya çıkarmaktadır. Özellikle 2 ve 3 konutlu kenelerin farklı canlı gruplarından kan emebilmeleri, bunların bu canlı grupları arasında çeşitli hastalık etkenlerini taşımadaki rolünü arttırmaktadır.

Keneler biyolojik özelliklerine bağlı olmak üzere etkeni hem transstadial hem de transovarial olarak nakledebilmektedir (Hopla, 1953; Sonenshine, 1993). “Type B” tularemi etkeni *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* hem Kuzey Amerika hem de Avrupa’da bulunmakta olup, Avrupa’da tularemi’ye yol açan en önemli etkenlerden biridir. Kuzey Amerika ve Avrupa’da *F. tularensis* subsp. *holarctica*’nın en yaygın vektörü ixodid kenelerdir. Bunu sırasıyla sokucu sinekler (Tabanidae) ve sivrisinekler takip eder. Avrupa’daki en önemli vektör kenelerin, *D. nuttalli*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *I. ricinus* ve *Hae. concinna* olduğu bildirilmiştir (Gurycova vd., 1995). Orta Avrupa’da en yaygın vektör kene *D. reticulatus*’tur. Bu keneden *F. tularensis* subsp. *holarctica* sıklıkla izole edilmiştir. *D. reticulatus*’ta saptanan enfeksiyon oranının (%0.5-2.6) *I. ricinus*’tan (%0.1-0.2) daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. *D. reticulatus* Orta Avrupa’dan Kazakistan’a kadar bulunmakta olup kuzey enlemlerinde daha az yoğunlukta bulunmaktadır (Foley ve Nieto, 2010).

Günümüzde tularemi’nin teşhisinde mikrobiyolojik identifikasyon testleri (Bernard vd., 1994; Petersen vd., 2004; Splettstoesser vd., 2005) ve serolojik teşhis yöntemleri (Splettstoesser vd., 2005; Mandell vd., 2005; Lopes de Carvalho vd., 2009) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda *Francisella* izolatlarının teşhisinde, kültürün mümkün olmadığı durumlarda veya negatif olduğu durumlarda PCR tabanlı metotlar yüksek sensitivite ve spesifiteleri dolayısıyla *Francisella* izolatlarının klasifikasyon ve identifikasyonlarında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Splettstoesser vd., 2005; Mandell vd., 2005; World, 2007; Lopes de Carvalho vd., 2009; Ahlinder vd., 2012). Konvansiyonel PCR’da *F. tularensis*’in yüzey membran lipoproteinlerini kodlayan tul4 ve fopA genleri hedef alınmaktadır. Her iki gen bölgesiyle yapılan PCR analizleri de kan, doku veya aerosol örneklerde etkenin teşhisinde yüksek sensitivite ve spesifite göstermektedir (Splettstoesser vd., 2005; World, 2007 Oyston, 2008). Son yıllarda özellikle tulareminin teşhisinde IpnA, ISFtu2, 23 kDA, tul4 ve fopA gen bölgelerini hedef alan ve spesifite ile sensitivitesi diğer PCR tabanlı testlere göre daha yüksek olan TaqMan™ (Applied Biosystems) Real Time PCR tekniği geliştirilmiştir (Splettstoesser vd., 2005; World, 2007). Real-time PCR tekniği, hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan tekniklerin başında gelmektedir. Ayrıca söz konusu teknik ile mutasyon analizleri ve gen ekspresyonları da hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (Splettstoesser vd., 2005; World, 2007). Kayseri yöresinde yapılan mevcut çalışmamızda da sivrisineklerden ve kenelerden oluşturulan DNA havuzlarında *F.*

tularensis'in belirlenebilmesi amacıyla Taqman prob bazlı Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

Dünyada sivrisinek kaynaklı tularemi üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmektedir. İsveç ve Finlandiya'da primer vektör olarak sivrisineklerin identifiye edildiği rapor edilmiştir (Petersen vd., 2009). İsveç'in tularemi endemik Orebro kentinde 2008 yılında *Aedes communis*, *Ae. intrudens*, *Ae. punctor*, *Ae. cinereus*, *Ae. sticticus*, *Ae. vexans*, *Culex pipiens/torrentium*, *Culiseta alaskaensis* ve *Cs. annulata* türleri üzerinde yapılan bir çalışmada, IpnA gen bölgesine özgü Sybr Green tabanlı Real Time PCR ile toplam 178 dişi sivrisinekten oluşan 28 DNA havuzunun 8'inde ve toplam 156 erkek sivrisinekten oluşan 20 DNA havuzunun 6'sında *F. tularensis* pozitifliği rapor edilmiştir (Lundstrom vd., 2011). İskandinavya'da Alaska sivrisinekleri üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise fopA gen bölgesine özgü TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri ile *Ochlerotatus communis*, *O. punctor*, *O. diantaeus*, *O. excrucians*, *O. canadiensis*, *O. intrudens*, *Cs. alaskaensis*, *Cs. impatiens* ve *Ae. vexans* türlerinden oluşan toplam 2610 üzerinde sivrisinek türünden ekstrakte edilen DNA havuzlarının (her bir havuz 10 sivrisinekten oluşturulmuş) %30,0'unun *Francisella tularensis* pozitif bulunduğu bildirilmiştir (Triebenbach vd., 2010). Portekiz'de (Carvalho vd., 2012) *Culex* (%63,97), *Ochlerotatus* (%35,34), *Anopheles* (%0,42), *Culiseta* (%0,14) ve *Aedes aegypti* (%0,12) soylarındaki 4949 sivrisinekten oluşan DNA havuzlarının hepsi Nested PCR analizi ile *F. tularensis* negatif bulunmuştur. Vektör kaynaklı tularemi'nin epidemiyolojik karakteri ile ilgili daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olan bu bulgular, Portekiz'de sivrisineklerin hastalığın naklinde rol oynamadığı izlenimi uyandırabilecek şekilde rapor edilmiştir (Carvalho vd., 2012). Kayseri yöresinde yapılan mevcut çalışmamızda örneklenen 6203 sivrisinekten (3202 *Aedes vexans*, 2610 *Culex pipiens*, 36 *Cx. hortensis*, 193 *Cx. theileri*, 100 *Culiseta annulata*, 62 *Anopheles maculipennis*) ekstrakte edilmiş olan toplam 1198 genomik DNA havuzunun Taq Man prob bazlı Real Time PCR ile yapılan analizlerinde hiçbir sivrisinek DNA havuzunda *F. tularensis* pozitifliği saptanamamıştır. Elde edilen bu sonuçların Portekiz'de yapılan çalışma (Carvalho vd., 2012) sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Bazı mikroorganizmler 16S rRNA gen bölgesi açısından yüksek düzeydeki benzerlik sebebiyle Francisellaceae familyasının muhtemel üyeleri olarak klasifiye edilmiş ve "Francisella-like endosymbionts ya da FLEs" olarak isimlendirilmişlerdir (Kugeler vd., 2005). FLEs, *F. tularensis* türlerinden farklı bir filogenetik grupta yer almaktadır (Escudero

vd., 2008). FLEs, tüm dünyada yaygınlık göstermekte olup vertikal olarak *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* ve *Ornithodoros* soylarındaki ixodid ve argasid kenelerde bulunmaktadır (Carvalho vd., 2011; Ivanov vd., 2011; Dergousoff ve Chilton, 2012). FLEs, Kuzey Amerika’da (Texas, Kaliforniya, Minnesota), Kanada’da (Alberta) ve İspanya, Portekiz, Macaristan, Sırbistan ve Bulgaristan gibi Avrupa ülkelerinde kenelerde tespit edilmiştir (Scoles, 2004; Baldrige vd., 2009; Sréter-Lancz vd., 2009; Carvalho vd., 2011; Ivanov vd., 2011; Dergousoff ve Chilton, 2012). Bunların insanlardaki patojenitesi henüz daha belirlenememiştir. Son yıllarda FLEs Avrupa’da serbest yaşayan küçük memelilerden de bildirilmiş olup bu sonuçlar FLE tiplerinin kenelerden küçük memeli hayvanlara muhtemel nakli hakkında fikir elde edilmesine olanak sağlamıştır (Scoles, 2004; Baldrige vd., 2009; Sréter-Lancz vd., 2009; Carvalho vd., 2011; Ivanov vd., 2011; Dergousoff ve Chilton, 2012).

Dünya’da kene kaynaklı tulaireminin epidemiyolojisi ve moleküler karakterizasyonları üzerine yapılan çalışmalar da sınırlı sayıda olmakla birlikte sivrisinek kaynaklı tulairemi çalışmalarına nazaran daha fazla olduğu görülmektedir. Almanya’nın güneybatısında yapılan bir çalışmada (Gehring vd., 2013) 16S rRNA gen bölgesine spesifik Real Time PCR analiziyle toplam 916 *I. ricinus* ve 211 *D. marginatus* kenelerinden oluşan DNA havuzları incelenmiş ve bu havuzlardan *I. ricinus* için 95 DNA havuzunun 8’inin (%8,4), *D. marginatus* için ise bireysel olarak seçilen 35 keneden 20’sinin (%57,1) *F. tularensis* pozitif olduğu rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada (Gehring vd., 2013) elde edilen pozitiflerin *IpnA* gen bölgesi sekanslanmış ve sekans analizleri sonucu bu izolatların *F. tularensis* subsp. *holarctica* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *I. ricinus*’tan elde edilen tüm pozitif izolatların filogenetik ağaçta *F. tularensis* grubunda, *D. marginatus*’tan elde edilen izolatların ise FLEs grubunda yer aldıkları bildirilmiştir. İsviçre’de toplam 6071 *I. ricinus* kenesinden oluşturulmuş DNA havuzları üzerine yapılmış bir çalışmada (Wicki vd., 2000) TaqMan prob bazlı Real Time PCR analizleri sonucu 607 DNA havuzunun 7’sinin (%0,12) *F. tularensis* pozitif olduğu bildirilmiştir. Bonnet vd. (2013)’nin Fransa’da yaptıkları çalışmada, *D. marginatus* (n=377), *D. reticulatus* (n= 74) ve *I. ricinus* (n=45) türlerindeki toplam 496 kenede Real Time PCR analizi sonucu hiçbir örnekte *F. tularensis* pozitifliği belirlenemezken *D. reticulatus* örneklerinde %18,9 *F. philomiragia* pozitifliği bildirilmiştir. İtalya’da Toma vd. (2014)’nin yaptığı bir çalışmada 2010-2011 yılları arasında göçmen kuşlardan toplanmış *H. m. marginatum* (n = 38; %27,7), *H. m. rufipes* (n = 71; %51,8), *Hyalomma* spp. (n = 17; %12,4), *Amblyomma* spp. (n = 5; %3,6), *I. ricinus* (n = 1; %0,7) ve *Ixodes* spp. (n = 5; %3,6) türlerindeki toplam 137 kenede Real Time PCR analizleri sonucu *F. tularensis* pozitifliği

saptayamadıklarını rapor etmişlerdir. Çin’de yapılan bir çalışmada (Zhang vd., 2008) 1670 kenede nested PCR analizi ile *F. tularensis* yönünden inceleme yapılmış ve *I. persulatus* ve *D. silvarum* türü kenelerde pozitiflik oranı %1,98 olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen pozitif izolatların sekans analizleri sonucu *F. tularensis* subsp. *holarctica* olduğu saptanmıştır. Brezilya’da *Amblyomma dubitatum*, *A. cajennense*, *D. nitens* ve *Rh. microplus* türündeki toplam 295 kene üzerinde yapılan bir çalışmada (Machado-Ferreira vd., 2009) PCR analizleri sonucu *A. dubitatum*, *D. nitens* ve *Rh. microplus* türlerinden birer örneğin *Francisella* pozitif bulunduğu, pozitif izolatların sekans analizleri sonucu her üç izolatın da filogenetik olarak FLEs grubunda yer aldığı belirtilmiştir. Benzer şekilde Amerika Birleşik Devletleri’nin San Diego eyaletinde yapılan bir çalışmada (Kugeler vd., 2005) *D. variabilis*, *D. occidentalis* ve türü belirlenememiş keneler dahil toplam 3202 keneden oluşturulmuş DNA havuzlarında (332 *D. occidentalis* DNA havuzu, 32 *D. variabilis* havuzu, 5 türü belirlenememiş kenelerden oluşan havuz) 16S rRNA gen bölgesine göre PCR analizleri ile 2 *D. occidentalis* havuzu, 14 *D. variabilis* havuzu ve türü belirlenememiş kenelerden oluşan 5 havuzda *Francisella* pozitifliği belirlenmiş ve sekans analizleri sonucu tüm pozitif izolatların FLEs olduğu rapor edilmiştir. Ivanov vd., (2011)’nin Bulgaristan’da yaptığı çalışmada, *Rh. sanguineus* (%31,4; n 148), *D. marginatus*, (%29,5; n 139), *I. ricinus* (%25,4; n 120), *H. m. marginatum* (%5,9; n 28), *D. reticulatus* (%3,6; n 17), *Rh. bursa* (%3,4; n 16), *Rh. turanicus* (%0,6; n 3) ve *H. aegyptium* (%0,2; n 1) türlerindeki toplam 472 kenenin 16S rRNA gen bölgesinin PCR’ı ve sekanslanması sonucu 16 *H. m. marginatum*, 1 *H. aegyptium*, 2 *Rh. sanguineus* ve 3 *D. reticulatus* kenesinde FLEs tespit edildiği bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nin Massachusetts eyaletinde yapılan çalışmada (Goethert ve Telford, 2009) 2004-2007 yılları arasında her yıl en az 1500 *D. variabilis* kenesi PCR ile *Francisella tularensis* yönünden incelenmiş ve pozitiflik oranlarının %2,7-4,3 arasında değiştiği, ortalama pozitiflik oranının %3,4 olduğu belirtilmiştir. Reye vd. (2010) Lüksemburg’da tularemi pozitifliği yönünden toplam 1394 *I. ricinus* kenesinde PCR ile inceleme yapmış ve incelenen kenelerin hiçbirinde *Francisella tularensis* pozitifliği saptayamamışlardır. Benzer şekilde Sréter-Lancz vd. (2009) Macaristan’da 245 *D. reticulatus*, 211 *I. ricinus* ve 194 *Hae. concinna* kenesinde 16S rRNA tabanlı PCR analizleri sonucu *I. ricinus* ve *Hae. concinna* türlerinde *Francisella* pozitifliği saptayamazken, *D. reticulatus* türünde %1,2 pozitiflik bildirmişler ve bu pozitif izolatların filogenetik olarak FLEs grubuna yakın olduğunu rapor etmişlerdir. Yine Macaristan’da yapılan bir başka çalışmada (Kreizinger vd., 2013), *I. ricinus*, *I. acuminatus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Hae. inermis*, *Hae. concinna*, *Hae. punctata* türündeki toplam 5402 keneden

oluşturulan DNA havuzlarında konvansiyonel PCR ve sekans analizleri sonucu 2 *Hae. concinna* ve 1 *D. reticulatus* havuzunda *F. tularensis* subsp. *holarctica* pozitifliği bildirilirken, 11 *D. reticulatus* havuzunda ise FLEs rapor edilmiştir. Portekiz’de yapılan bir çalışmada (Carvalho vd., 2011), 62 *D. reticulatus*, 4 *I. hexagonus*, 2 *I. ricinus*, 2 *I. frontalis* ve 5 *D. marginatus* türünde olmak üzere toplam 75 kene örneğinde PCR ve sekans analizleri sonucu sadece *D. reticulatus* türünde %39 oranında *F. tularensis* pozitifliği belirlendiği ve filogenetik analizlerde bu izolatların FLEs grubunda yer aldığı bildirilmiştir. Çalışmamızda Kayseri yöresindeki sığır ve barınaklardan toplanmış toplam 1115 ergin ixodid keneden (267 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus*, 106 *Haemaphysalis parva*, 2 *Hae. sulcata*, 245 *Hyalomma marginatum marginatum*, 106 *H. anatolicum anatolicum*, 53 *H. anatolicum excavatum*, 68 *H. detritum detritum*, 219 *Rh. turanicus*, 28 *Rh. bursa*, 1 *Rh. Sanguineus*, 20 *Dermacentor marginatus*) ekstrakte edilmiş 38 genomik DNA havuzunda ve enfeste insanlardan toplanmış toplam 362 ergin ixodid keneden (39 *Hae. parva*, 3 *Hae. sulcata*, 86 *H. m. marginatum*, 14 *H. a. anatolicum*, 20 *H. a. excavatum*, 3 *H. d. detritum*, 13 *H. dromedarii*, 114 *Rh. turanicus*, 38 *Rh. bursa*, 16 *Rh. sanguineus*, 11 *D. marginatus*, 5 *Ixodes ricinus*) oluşturulan 42 genomik DNA havuzunda *F. tularensis* varlığı Taqman prob bazlı Real Time PCR ve 16S rRNA gen bölgesinin PCR analizleri ile incelenmiş ve örneklerin hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır. Elde edilen bu sonuçların, dünyada kene kaynaklı tularemi üzerine yapılan çalışma sonuçlarıyla kıyaslandığında Fransa (Bonnet vd., 2013), İtalya (Toma vd., 2014) ve Lüksemburg’da (Reye vd., 2010) yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür. Dünyada kene kaynaklı tularemi çalışmalarında elde edilen sonuçlara genel olarak bakıldığında *F. tularensis*’in tüm ixodid kene türlerinde görülebildiği, bununla birlikte genellikle *Ixodes* ve *Dermacentor* soyundaki kenelerde daha sık görüldüğü ve özellikle *Dermacentor* soyundaki kenelerden elde edilen izolatların büyük çoğunluğunun *F. tularensis*’ten ziyade daha çok FLEs grubunda yer aldıkları görülmektedir.

Türkiye’de 1936 ve 1953 yılları arasında tularemi epidemileri rapor edilmiş olup (Gotschlich ve Berkin, 1938; Dirik, 1939; Golem, 1945; Utku, 1954) bu süreyi takiben uzun bir müddet herhangi bir salgın bildirilmemiştir. 1988-2002 yılları arasında Bursa’nın farklı yörelerinden, 1988-2005 yılları arasında da Türkiye’nin farklı coğrafyalarından tularemi salgınları rapor edilmiştir (Kılıçturgay vd., 1989; Gedikoğlu vd., 1990; Gedikoğlu, 1996; Helvacı vd., 2000; Erbay vd., 2000; Şencan vd., 2000; Özyürek vd., 2001; Gürcan vd., 2004; Celebi vd., 2006; Meric vd., 2008). 1988-2005 yılları arasında Türkiye’den bildirilmiş tularemi vakalarında salgınların bakterinin yayılışıyla mı alakalı olduğu ya da eski tularemik odaklarda enfeksiyon

açısından tekrar bir alevlenme mi olduğu tam olarak netliğe kavuşturulamamıştır. 2005 yılından sonra Türkiye’de yaklaşık 5000’in üzerinde vaka bildirilmiştir. Araştırmacıların çoğuna göre Türkiye’deki tularemi salgınlarının başlıca kaynağının su kaynakları olduğu ve enfeksiyonun özellikle çiftçilerde, ev hanımlarında, çocuklarda, avcılarda ve orman işçilerinde görüldüğü rapor edilmiştir (Dedeloğlu vd., 2007; Ozdemir vd., 2007; Barut ve Cetin, 2009; Willke vd., 2009; Akalin vd., 2009; Sencan vd., 2009; Meric vd., 2010; Uyar vd., 2011; Yazgı vd., 2011; Tatman Otkun vd., 2011; Çağlı vd., 2011; Ulu Kılıç vd., 2011, 2013; Dikici vd., 2012; Bayhan-Taş vd., 2012; Mengeloglu vd., 2014; Kızıl vd., 2014; Tuncer vd., 2014; Bozkurt vd., 2014; Balcı vd., 2014).

Çalışmamızda araştırma yöresini oluşturan Kayseri’de ilk tularemi vakası 2005 yılında Sarız ilçesinde görülmüştür. Daha sonra 2006 ve 2007 yıllarında birer vaka daha rapor edilmiş olup 2007-2009 yılları arasında herhangi bir rapor mevcut değildir. Takiben 2010-2012 yılları arasında bildirilen tularemi salgınında ise toplam 110 hastada enfeksiyon rapor edilmiş olup bu hastaların çoğunun köylerde yaşadıkları bildirilmiştir. Bugüne kadar Kayseri’den bildirilen tüm vakaların su kaynaklı olduğu ve hemen hemen tüm hastalarda hastalığın orofarenjiyal ve glandular formlarının görüldüğü rapor edilmiştir (Balcı vd. 2014). Türkiye’de hemen hemen her yıl insanlarda tularemi vakaları bildirilmesine karşın *F. tularensis*’in bugüne kadar vektörlerde araştırılmasına yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Hayvanlarda *Francisella tularensis* varlığı üzerine ise yabani bir rodentten elde edilmiş (Çelebi vd., 2012) ve Trakya Bölgesi’nde de iki farede Real Time PCR ile pozitif saptanmış kayıtlar (Ünal Yılmaz vd., 2014) bulunmaktadır. Bunun yanında GenBank kayıtları incelendiğinde Ankara’nın Gündül ilçesinde doğal kaynak sularından izole edilmiş ve *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* olarak karakterize edilmiş bir izolat (GenBank Aksesyon No: JX436321) ile yine sudan izole edilmiş ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica* olarak karakterize edilip tüm genomu kayda girilmiş (GenBank Aksesyon No: CP007148) izolat dışında Türkiye’den kayıt edilmiş herhangi bir veri bulunmamaktadır. Öte yandan 2011 yılında Yozgat’ta kene kaynaklı olabileceği varsayılan iki tularemi vakası rapor edilmiştir (Yeşilyurt vd., 2011). Ancak aynı çalışmada (Yeşilyurt vd., 2011) söz konusu kenelerde *F. tularensis* pozitifliği araştırılmamıştır. Türkiye’de bugüne kadar görülen tularemi vakalarının çoğu bakteriyolojik bakı, serolojik ve moleküler yöntemlerle teşhis edilmiş olup, bu çalışmada kullandığımız Real Time PCR yöntemiyle çeşitli kaynaklardan elde edilmiş izolatlar üzerine çalışma sayısının yöntem açısından oldukça sınırlı olduğu görülmüştür (Simşek vd., 2012; Çelebi vd., 2014; Ünal Yılmaz vd., 2014). Araştırma yöresi Kayseri’de insan vakalarının

görülmesine paralel olarak, sığırlardan, barınaklardan ve insanlardan toplanan vektör kenelerde ve sivrisineklerde Real Time PCR ile *F. tularensis*'in tespit edilebileceği hipotezinden yola çıkılarak gerçekleştirilen bu projede vektör kaynaklı tularemi tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak bu çalışmayla Türkiye'de ilk kez Kayseri yöresinde vektör sivrisinekler ve kenelerde *Francisella tularensis* moleküler olarak araştırılmıştır. Araştırma sonucunda sivrisinek ve kene örneklerinde *F. tularensis* pozitifliği saptanamamıştır. Bu durum hastalığın yörede olmadığı anlamına gelmemektedir. Dolayısıyla su kaynaklı enfeksiyon odaklarının bulunduğu yörelerde, toplanacak sivrisinek örneklerinde, insan ve hayvanlardan toplanacak kene örneklerinde daha kapsamlı araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu araştırma model bir çalışma niteliğinde olup Türkiye'nin diğer yörelerinde hastalığın vektör-kaynaklı karakterine uygun moleküler epidemiyolojik verilerin elde edilmesi amacıyla yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte bakterinin zoonotik karakterinden ötürü halk sağlığı açısından beşeri ve veteriner hekimler, epidemiyologlar ve halk sağlığı uzmanlarının iş birliğinde risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve etkin kontrol ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesi gerekliliği aşikârdır.

6. KAYNAKLAR

1. Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G., Forsman, M. 2003. "Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*" Appl Environ Microbiol, 69, 600-6.
2. Ahlinder, J., Ohrman, C., Svensson, K., Lindgren, P., Johansson, A., Forsman, M., Larsson, P., Sjödin, A. 2012. "Increased knowledge of *Francisella* genus diversity highlights the benefits of optimized DNA-based assays" BMC Microbiol, 12(1), 220.
3. Akalin, H., Helvacı, S., Gedikoğlu, S. 2009. "Re-emergence of tularemia in Turkey", Int J Infect Dis, 13, 547-51.
4. Anda, P., Segura del Pozo, J., Díaz García, J.M., Escudero, R., Gar-cía Peñna, F.J., López Velasco, M.C., Sellek, R.E., Jiménez Chillarón, M.R., Sánchez Serrano, L.P., Martínez Navarro, J.F. 2011. "Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing" Emerg Infect Dis, 7, 575-82.
5. Balci, E., Borlu, A., Kilic, A.U., Demiraslan, H., Oksuzkaya, A., Doganay, M. 2014. "Tularemia outbreaks in Kayseri, Turkey: an evaluation of the effect of climate change and climate variability on tularemia outbreaks", J Infect Public Health, 7(2), 125-32.
6. Baldridge, G.D., Scoles, G.A., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G. 2009. "Transovarial transmission of *Francisella*-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae)", J Med Entomol, 46(3), 625-32.
7. Baldwin, C.J., Panciera, R.J., Morton, R.J., Cowell, A.K., Waurzyniak, B.J. 1991. "Acute tularemia in three domestic cats", J Am Vet Med Assoc, 199(11), 1602-5.
8. Bandouchova, H., Pohanka, M., Vlckova, K., Damkova, V., Peckova, L., Sedlackova, J., Treml, F., Vitula, F., Pikula, J. 2011. "Biochemical responses and oxidative stress in *Francisella tularensis* infection: a European brown hare model", Acta Vet Scand, 53, 2.
9. Barut, S., Cetin, I. 2009. "A tularemia outbreak in an extended family in Tokat Province, Turkey: observing the attack rate of tularemia", Int J Infect Dis, 13(6), 745-8.
10. Bayhan-Taş, G.I., Tanir, G., Celebi, B. 2012. "Two cases of glandular tularemia from Turkey", Turk J Pediatr, 54(2), 203-6.

11. Bernard, K., Tessier, S., Winstanley, J., Chang, D., Borczyk, A. 1994. "Early recognition of atypical *Francisella tularensis* strains lacking a cysteine requirement", J Clin Microbiol, 32(2), 551-3.
12. Birdsell, D.N., Stewart, T., Vogler, A.J., Lawaczech, E., Diggs, A., Sylvester, T.L., Buchhagen, J.L., Auerbach, R.K., Keim, P., Wagner, D.M. 2009. "*Francisella tularensis* subsp. *novicida* isolated from a human in Arizona", BMC Res Notes, 2, 223.
13. Bonnet, S., de la Fuente, J., Nicollet, P., Liu, X., Madani, N., Blanchard, B., Maingourd, C., Alongi, A., Torina, A., Fernández de Mera, I.G., Vicente, J., George, J.C., Vayssier-Taussat, M., Joncour, G. 2013. "Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. ticks from nine collection sites in France", Vector Borne Zoonotic Dis, 13(4), 226-36.
14. Bosio, C.M. 2007. "The subversion of the immune system by *Francisella tularensis*", Front Microbiol, 2, 9.
15. Bozkurt, I., Kilic, S. 2014. "Tularemi Türkiye'nin Kuzeyinden Güneyine Doğru Yayılıyor: Kahramanmaraş'da Küçük Bir Salgın", Mikrobiyol Bul, 48(3), 413-9.
16. Brett, M., Doppalapudi, A., Respcio-Kingry, L.B., Myers, D., Husband, B., Pollard, K., Mead, P., Petersen, J.M., Whitener, C.J. 2012. "*Francisella novicida* bacteremia after a near-drowning accident", J Clin Microbiol, 50(8), 2826-9.
17. Broman, T., Thelaus, J., Andersson, A.C., Bäckman, S., Wikström, P., Larsson, E., Granberg, M., Karlsson, L., Bäck, E., Eliasson, H., Mattsson, R., Sjöstedt, A., Forsman, M. 2011. "Molecular Detection of Persistent *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Natural Waters", Int J Microbiol, 2011, 851946.
18. Çağlı, S., Vural, A., Sönmez, O., Yüce, I., Güney, E. 2011. "Tularemia: a rare cause of neck mass, evaluation of 33 patients", Eur Arch Otorhinolaryngol, 268(12), 1699-704.
19. Carvalho, I.L., Santos, N., Soares, T., Zé-Zé, L., Nuncio, M.S. 2011. "*Francisella*-like endosymbiont in *Dermacentor reticulatus* collected in Portugal", Vector Borne Zoonotic Dis, 11(2), 185-8.
20. Carvalho, C.L., Zé-Zé, L., Duarte, E.L., Nuncio, M.S., de Carvalho, I.L. 2012. "Screening of mosquitoes as vectors of *F. tularensis* in Portugal". In: 7th International Conference on tularemia.
21. Carvalho, C.L., Lopes de Carvalhoc, I., Zé-Zéb, L., Nunciob, M.S., Duarte, E.L., 2014. "Tularaemia: A challenging zoonosis" Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 37, 85-96.

22. Celebi, G., Baruönü, F., Ayoğlu, F., Cinar, F., Karadenizli, A., Uğur, M.B., Gedikoğlu, S. 2006. "Tularemia, a reemerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses", *Jpn J Infect Dis*, 59, 229-34.
23. Chong, A., Celli, J. 2010. "The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation", *Front Microbiol*, 1, 138.
24. Collier, L., Barlows, A., Sussman, M. 1998. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, vol. 2, p. 1347-9.
25. Cowley, S.C., Elkins, K.L. 2011. "Immunity to *Francisella*", *Front Microbiol*, 2, 26.
26. Cremer, T.J., Butchar, J.P., Tridandapani, S.. 2011. "*Francisella* subverts innate immune signaling: focus on PI3k/Akt", *Front Microbiol*, 5,13.
27. Çelebi, B., Kılıç, S., Yeşilyurt, M., Acar, B. 2014. "*Francisella tularensis*'in Moleküler Tanısında Yeni Geliştirilen Kullanıma Hazır Ticari PCR Kitinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi", *Mikrobiyol Bul*, 48(1), 135-42.
28. Çelebi, B., Kiliç, S., Karagöz, A., Durmaz, R. 2012. "Ülkemizde izole edilen *Francisella tularensis* suşlarının alt türlerinin belirlenmesi", X. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 24-27 Eylül, Kuşadası/Aydın, Türkiye, pp. 36-7.
29. Decors, Lesage, C., Jourdain, E., Giraud, P., Houbbron, P., Vanhem, P., Madani, N. 2011. "Outbreak of tularemia in brown hares (*Lepus europaeus*) in France, January to March 2011", *Euro Surveill*, 16(28), 19913.
30. Dedeoğlu Kilinc, G., Gürcan, S., Eskiocak, M., Kiliç, H., Kunduracılar, H. 2007. "Investigation of tularemia seroprevalence in the rural area of Thrace region in Turkey", *Mikrobiyol Bul*, 41, 411-8.
31. Dergousoff, S.J., Chilton, N.B. 2012. "Association of different genetic types of *Francisella*-like organisms with the rocky mountain wood tick (*Dermacentor andersoni*) and the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in localities near their northern distributional limits", *Appl Environ Microbiol*, 78(4), 965-71.
32. Dikici, N., Ural, O., Sümer, S., Oztürk, K., Albayrak Yiğit, O., Katlanır, E., Keleş, B. 2012. "Tularemia in Konya region", *Turkey Mikrobiyol Bul*, 46, 225-35.
33. Dirik, K. 1939. "Van Gölü Havzasında Tularemi", *Türk Hij Tec Biol Der*, 2, 193-4.
34. Eliasson, H., Lindback, J., Nuorti, J.P., Arneborn, M., Giesecke, J., Tegnell, A. 2002. "The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden", *Emerg Infect Dis*, 8, 956-60.

35. Ellis, J., Oyston, P.C.F., Green, M., Titball, R.W., 2002. "Tularemia", Clin Microbiol Rev, 15, 629-46.
36. Eneslätt, K., Normark, M., Björk, R., Rietz, C., Zingmark, C., Wolfrain, L.A., Stöven, S., Sjöstedt, A. 2012. "Signatures of T cells as correlates of immunity to *Francisella tularensis*", PLoS ONE, 7(3), e32367.
37. Eneslätt, K., Rietz, C., Rydén, P., Stöven, S., House, R.V., Wolfrain, L.A., et al. 2011. persistence of cell mediated immunity three decades after vaccination with the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. Eur J Immunol, 41(4):974-80.
38. Erbay, A., Dokuzoğuz, B., Baykam, N., Güvener, E., Diker, S., Yıldırım, T. 2000. "Ankara yöresinde Tularemi", Turkish J Infect, 14, 453-8.
39. Escudero, R., Toledo, A., Gil, H., Kováčsová, K., Rodrigues-Vargas, M., Jado, I., García-Amil, C., Lobo, B., Bhide, M., Anda, P. 2008. "Molecular method for discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts", J Clin Microbiol, 46(9), 3139-43.
40. Estrada-Pena, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R. 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region, 1th ed. University of Zaragoza, Spain.
41. Feldman, K.A. 2003. "Tularemia", J Am Vet Med Assoc, 31(6), 725-30.
42. Fey, P.D., Dempsey, M.M., Olson, M.E., Chrustowski, M.S., Engle, J.L., Jay, J.J., Dobson, M.E., Kalasinsky, K.S., Shea, A.A., Iwen, P.C., Wickert, R.C., Francesconi, S.C., Crawford, R.M., Hinrichs, S.H. 2007. "Molecular analysis of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *holarctica*", Am J Clin Pathol, 128(6), 926-35.
43. Foley, J.E., Nieto, N.C. 2010. "Tularemia", Vet Microbiol, 140(3-4), 332-8.
44. Furman, D.P., Loomis, E.C. 1984. "The Ticks of California (Acari: Ixodida)", Vol. 25. University of California Press, Berkeley, CA, p. 239.
45. Gedikoğlu, S., Göral, G., Helvacı, S. 1990. "Bursa'daki Tularemi epidemisinin özellikleri", Turkish J Infect, 4, 9-15.
46. Gedikoğlu, S. 1996. "*Francisella tularensis* isolation from various clinical specimens", Clin Microbiol Infect, 2, 233-5.
47. Gehringer, H., Schacht, E., Maylaender, N., Zeman, E., Kaysser, P., Oehme, R., Pluta, S., Splettstoesser, W.D. 2013. "Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis holarctica* in *Ixodes ricinus* ticks from south-western Germany", Ticks Tick Borne Dis, 4(1-2), 93-100.

48. Greene, C., Debay, B. 2006. "Tularemia. In: Greene, C. (Ed.), Infectious Diseases of the Dog and Cat", Elsevier, St. Louis, MO, pp. 446-51.
49. Goethert, H.K., Telford, S.R. 2009. "Nonrandom distribution of vector ticks (*Dermacentor variabilis*) infected by *Francisella tularensis*", PLoS Pathog, 5(2), e1000319.
50. Golem, S.B. 1945. "Lüleburgaz'da yeni bir Tularemi epidemisi", Tük Hij Tec Biol Der, 5, 28-40.
51. Gotschlich, E., Berkin, T. 1938. "1936 yılında Trakya'da Tularemiye ait yapılan epidemiyolojik ve bakteriyolojik araştırmalar", Tük Hij Tec Biol Der, 1, 115-23.
52. Gurycova, D., Kocianova, E., Vyrostekova, V., Rehacek, J. 1995. "Prevalence of ticks infected with *Francisella tularensis* in natural foci of tularemia in western Slovakia", Eur J Epidemiol, 11, 469-74.
53. Gustafson, B.W., DeBows, L.J. 1996. "Tularemia in a dog", J Am Anim Hosp Assoc, 32(4), 339-41.
54. Gürcan, Ş., Tatman-Otkun, M., Oktun, M., Arıkan, O.K., Özer, B. 2004. "An outbreak of tularemia in western Black Sea region of Turkey", Yonsei Med J, 45, 17-22.
55. Gürcan, S., Eskiocak, M., Varol, G., Uzun, C., Tatman-Otkun, M., Sakru, N., Karadenizli, A., Karagöl, C., Otkun, M. 2006. "Tularemia re-emerging in European part of Turkey after 60 years", Jpn J Infect Dis, 59, 391-3.
56. Gyuranecz, M., Szeredj, L., Makrai, L., Fodor, L., Mészáros, A.R., Szépe, B., Füleki, M., Erdélyi, K. 2010. "Tularemia of Brown European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological and immunohistochemical study", Vet Pathol, 47(5), 958-63.
57. Hansen, C.M., Vogler, A.J., Keim, P., Wagner, D.M., Hueffer, K. 2011. "Tularemia in Alaska, 1938-2010", Acta Vet Scand, 18(53), 61.
58. Helvacı, S., Gedikoğlu, S., Akalın, H., Oral, B. 2000. "Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years", Eur J Epidemiol, 16, 271-6.
59. Henry, T., Brotcke, A., Weiss, D.S., Thompson, L.J., Monack, D.M. "Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection", J Exp Med, 204(5), 987-94.
60. Hopla, C.E. 1953. "Experimental studies on tick transmission of tularemia organisms". Am J Hyg, 58, 101-18.

61. Huber, B., Escudero, R., Busse, H.J., Seibold, E., Scholz, H.C., Anda, P., Kämpfer, P., Splettsstoesser, W.D. 2010. "Description of *Francisella hispaniensis* sp.nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al., 1955) Olsufiev et al., 1959 as *Francisella tularensis* subspecies *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*", IntJ Syst Evol Microbiol, 60, 1887-96.
62. Ivanov, I.N., Mitkova, N., Reye, A.L., Hübschen, J.M., Vatcheva-Dobrevska, R.S., Dobрева, E.G., Kantardjiev, T.V., Muller, C.P. 2011. "Detection of new *Francisella*-like endosymbionts in *Hyalomma* spp and *Rhipicephalus* spp. (Acari: Ixodidae) from Bulgaria", Appl Environ Microbiol, 77(15), 5562-5.
63. Jackson, J., McGregor, A., Cooley, L., Ng, J., Brown, M., Ong, C.W., Darcy, C., Sintchenko, V. 2012. "*Francisella tularensis* subspecies *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011", Emerg Infect Dis, 18(9), 1484-6.
64. Johansson, A., Celli, J., Conland, W., Elkins, K.L., Forsman, M., Keim, P.S., Larsson, P., Manoil, C., Nano, F.E., Petersen, J.M., Sjöstedt, A. 2010. "Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*", Int J Syst Evol Microbiol, 60, 1717-8.
65. Johansson, A., Farlow, J., Larsson, P., Dukerich, M., Chambers, E., Byström, M., Fox, J., Chu, M., Forsman, M., Sjöstedt, A., Keim, P. 2004. "Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis", J Bacteriol, 186 (17), 5808-18.
66. Jones, C.L., Weiss, D.S. 2011. "TLR2 signaling contributes to rapid inflammasome activation during *F. novicida* infection", PLoS ONE; 6(6): e20609.
67. Jones, J.W., Broz, P., Monack, D.M. 2011. "Innate immune recognition of *Francisella tularensis*: activation of type-I interferons and the inflammasome", Front Microbiol, 2, 16.
68. Karadenizli, A., Gürcan, Ş., Kolaylı, F., Vahaboğlu, H. 2005. "Outbreak of tularaemia in Golcuk, Turkey in 2005: report of 5 cases and an overview of the literature from Turkey", Scand J Infect Dis, 37, 712-6.
69. Keim, P., Johansson, A., Wagner, D.M., 2007. "Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*", Ann NY Acad Sci, 1105, 30-66.
70. Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Gedikoğlu, S., Helvacı, S., Töre, O., Tolunay, Ş. 1989. "Bursa'da Tularemi epidemisi", Turkish J Infect, 3, 149-56.

71. Kızıl, Y., Aydil, U. 2014. "Tularemia: a re-emerging condition in Turkey which may be related with contaminated spring water in rural areas", *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 271(1), 205-6.
72. Kiliç, S. 2010. "*Francisella tularensis* ve Türkiye’de tularemi epidemiyolojisine genel bir bakış", *Flora*, 15(2), 37-58.
73. Konstantinova, N.D., Kormilitsyna, M.I., Didenko, L.V., Meshcheriakova, I.A. 2000. "The ultrastructural characteristics of *Francisella tularensis* interaction with *Tetrahymena pyriformis*", *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1, 10-5.
74. Kreizinger, Z., Hornok, S., Dán, A., Hresko, S., Makrai, L., Magyar, T., Bhide, M., Erdélyi, K., Hofmann-Lehmann, R., Gyuranecz, M. 2013. "Prevalence of *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in the tick population of Hungary and the genetic variability of *Francisella*-like agents", *Vector Borne Zoonotic Dis*, 13(3), 160-3.
75. Kuehn, A., Shulze, C., Kutzer, P., Probst, C., Hlinak, A., Ochs, A., Grunow, R. 2013. "Tularaemia seroprevalence of captured and wild animals in Germany: the fox (*Vulpes vulpes*) as a biological indicator", *Epidemiol Infect*, 141(4), 833-40.
76. Kugeler, K.J., Gurfield, N., Creek, J.G., Mahoney, K.S., Versage, J.L., Petersen, J.M. 2005. "Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR", *Appl Environ Microbiol*, 71(11), 7594-7.
77. Larsson, P., Svensson, K., Karlsson, L., Guala, D., Granberg, M., Forsman, M., Johansson, A. 2007. "Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*", *Emerg Infect Dis*, 13(11), 1725-32.
78. Leblebicioğlu, H., Esen, S., Turan, D., Tanyeri, Y., Karadenizli, A., Ziyagil, F., Goral, G. 2008. "Outbreak of tularemia: a case-control study and environmental investigation in Turkey", *Int J Infect Dis*, 12, 265-9.
79. Liles, W.C., Burger, R.J. 1993. "Tularemia from domestic cats", *West J Med*, 158, 619-22.
80. Lopes de Carvalho, I., Nuncio, M.S., David de Moraes, J. 2009. "Tularémia", *Acta Med Port*, 3, 281-90.
81. Lundström, J.O., Andersson, A.C., Bäckman, S., Schäfer, M.L., Forsman, M., Thelaus, J. 2011. "Transstadial transmission of *Francisella tularensis holarctica* in mosquitos, Sweden" *Emerg Infect Dis*, 17(5), 794-9.

82. Machado-Ferreira, E., Piesman, J., Zeidner, N.S., Soares, C.A. 2009. “*Francisella*-like endosymbiont DNA and *Francisella tularensis* virulence-related genes in Brazilian ticks (Acari: Ixodidae)”, J Med Entomol, 46(2), 369-74.
83. Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin R. 2005. Mandell, Douglas, and Bennet’s principles and practice of infectious diseases, vol. 2. Elsevier, Churchill Livingstone, 2674-83.
84. Mani, R.J., Reichard, M.V., Morton, R.J., Kocan, K.M., 2012. “Clickenbeard KD. Biology of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* live vaccine strain in the tick vector *Dermacentor variabilis*”, PLoS ONE, 7(4), e35441.
85. McCoy, G.W. 1911. “A plague-like disease of rodents”, Publ Health Bull, 45, 53-71.
86. Meinkoth, K.R., Morton, R.J., Meinkoth, J.H. 2004. “Naturally occurring tularemia in a dog”, J Am Vet Med Assoc, 225(4), 545-7.
87. Mengeloglu, Z., Duran, A., Hakyemez, I.N., Ocak, T., Küçükbayrak, A., Karadag, M., Tas, T., Akdeniz, H. 2014. “Evaluation of patients with Tularemia in Bolu province in northwestern Anatolia, Turkey”, J Infect Dev Ctries, 8(3), 315-9.
88. Meric, M., Willke, A., Finke, E.J., Grunow, R., Sayan, M., Erdogan, S., Gedikoglu, S. 2008. “Evaluation of clinical, laboratory, and therapeutic features of 145 tularemia cases: the role of quinolones in oropharyngeal tularemia”, APMIS, 116, 66-73.
89. Meric, M., Sayan, M., Dunder, D., Willke, A. 2010. “Tularaemia outbreaks in Sakarya, Turkey: case-control and environmental studies”, Singapore Med J, 51(8), 655-9.
90. Morner, T. 1992. “The ecology of tularemia”, Rev Sci Tech, 11, 1123-30.
91. Morner, T., Addison, E. 2001. Tularemia. In: Williams, E.S., Barker, I.K. (Eds.), Infectious Diseases of Wild Mammals. Iowa State Press, Ames, Iowa.
92. Olsufjev, N.G., Shlygina, K.N. 1979. “Role of cannibalism in the development of tularemia with nonlethal outcome in common voles highly sensitive to tularemia”, Zoologicheskii Zhurnal, 58, 933-6.
93. Oyston, P.C. 2008. “*Francisella tularensis*: unraveling the secrets of an intracellular pathogen”, J Med Microbiol, 57, 921-30.
94. Ozdemir, D., Sencan, I., Annakkaya, A.N., Karadenizli, A., Guclu, E., Sert, E., Emeksiz, M., Kafali, A. 2007. “Comparison of the 2000 and 2005 outbreaks of tularemia in the Düzce region of Turkey”, Jpn J Infect Dis, 60, 51-2.
95. Özyürek, H., Şencan, İ., Öksüz, Ş., Kaya, D., Kocabay, K. 2001. “Orofaringeal Tularemili bir olgu sunumu”, Türk Pediatri Arşivi, 36, 94-6.

96. Pearson, A.P. 1998. "Tularemia. In: Palmer SR, Lord Soulsby, Simpson DIH (eds). Zoonoses: biology, clinical practice, and public health control", Oxford: Oxford University Press, 267-80.
97. Petersen, J.M., Mead, P.S., Schriefer, M.E. 2009. "*Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen", Vet Res, 40(2), 1-9.
98. Petersen, J.M., Schriefer, M.E. 2005. "Tularemia: emergence/re-emergence", Vet Res, 36(3), 455-67.
99. Petersen, J.M., Schriefer, M.E., Carter, L.G., Zhou ,Y., Sealy, T., Bawiec, D., Yockey, B., Urich, S., Zeidner, N.S., Avashia, S., Kool, J.L., Buck, J., Lindley, C., Celeda, L., Monteneiri, J.A., Gage, K.L., Chu, M.C. 2004. "Laboratory analysis of tularemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002", Emerg Infect Dis, 10(3), 419-25.
100. Petrisheva, P. 1965. Vectors of Diseases of Natural Foci. I.P.f.S. Translations, Jerusalem.
101. Reed, D.S., Smith, L., Dunsmore, T., Trichel, A., Ortiz, L.A., Cole, K.S., Barry E. 2011. "Pneumonic tularemia in rabbits resembles the human disease as illustrated by radiographic and hematological changes after infection", PLoS One, 6(9), e24654.
102. Reese, S.M., Dietrich, G., Dolan, M.C., Sheldon, S.W., Piesman, J., Petersen, J.M., Eisen, R.J. 2010. "Transmission dynamics of *Francisella tularensis* subspecies and clades by nymphal *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae)", AmJ Trop Med Hyg, 83(3), 645-52.
103. Reif, K.E., Palmer, G.H., Ueti, M.W., Scoles, G.A., Margolis, J.J., Monack, D.M., Noh, S.M. 2011. "*Dermacentor andersoni* transmission of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* reflects bacterial colonization, dissemination, and replication coordinated with tick feeding", Infect Immun, 79(12), 4941-6.
104. Reintjes, R., Dedushaj, I., Gjini, A., Jorgensen, T.R., Cotter, B., Lieftucht, A., D'ancona, F., Dennis, D.T., Kosoy, M.A., Mulliqi-Osmani, G., Grunow, R., Kalaveshi, A., Gashi, L., Humolli, I. 2002. "Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies", Emerg Infect Dis, 8, 69-73.
105. Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A., Muller, C.P. 2010. "Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg", Appl Environ Microbiol, 76, 2923-31.

106. Rockx-Brouwer, D., Chong, A., Wehrly, T.D., Child, R., Crane, D.D., Celli, J., Bosio, C.M. 2012. "Low dose vaccination with attenuated *Francisella tularensis* strain SchuS4 mutants protects against tularemia independent of the route of vaccination", PLoS ONE, 7(5), e37752.
107. Scoles, G.A. 2004. "Phylogenetic analysis of the *Francisella*-like endosymbionts of *Dermacentor* ticks", J Med Entomol, 41(3), 277-86.
108. Sencan, I., Sahin, I., Kaya, D., Oksuz, S., Ozdemir, D., Karabay, O. 2009. "An outbreak of oropharyngeal tularemia with cervical adenopathy predominantly in the left side", Yonsei Med J, 50, 50-4.
109. Siddaramappa, S., Challacombe, J.F., Petersen, J.M., Pillai, S., Hogg, G., Kuske, C.R. 2011. "Common ancestry and novel genetic traits of *Francisella novicida*-like isolates from North America and Australia as revealed by comparative genomic analysis", Appl Environ Microbiol, 77(15), 5110-22.
110. Simşek, H., Taner, M., Karadenizli, A., Ertek, M., Vahaboğlu, H. 2012. "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, 31(9), 2353-7.
111. Siret, V., Barataud, D., Prat, M., Vaillant, V., Ansart, S., Le Coustumier, A., Vaissaire, J., Raffi, F., Garre, M., Capek, I. 2006. "An outbreak of airborne tularemia in France, August 2004", Euro Surveill, 11, 58-60.
112. Sjöstedt, A. 2007. "Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations", Ann N Y Acad Sci, 1105, 1-29.
113. Sjöstedt, A. 2011. "Special Topic on *Francisella tularensis* and tularemia", Front Microbiol, 2, 86.
114. Sonenshine, D.E. 1993. "Biology of Ticks". Oxford University Press, New York.
115. Splettstoesser, W.D., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Neubauer, H., Schuff-Werner, P. 2005. "Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques", J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 52(6), 249-61.
116. Sréter-Lancz, Z., Széll, Z., Sréter, T., Márialigeti, K. 2009. "Detection of a novel *Francisella* in *Dermacentor reticulatus*: a need for careful evaluation of PCR-based identification of *Francisella tularensis* in Eurasian ticks", Vector Borne Zoonotic Dis, 9(1), 123-6.

117. Şahin, M., Atabay, H.İ., Bıçakçı, Z., Ünver, A., Otlı, S. 2007. "Outbreaks of tularemia in Turkey", Kobe J Med Sci, 53, 37-42.
118. Şencan, İ., Kaya, D., Öksüz, Ş. 2000. "Salmonelloz ön tanısı ile izlenen bir tifoidal tularemi olgusu", KLİMİK Dergisi, 13, 113-6.
119. Tärnvik, A., Berglund, L. 2003. "Tularemia", Eur Respir J, 21(2), 361-73.
120. Tatman Otkun, M., Akçalı, A., Karadenizli, A., Ozbey, N., Gazel, D., Sener, A., Güçlü, O., Tanrıöver, A., Otkun, M. 2011. "Epidemiological evaluation of a rapidly-prevented tularemia outbreak in Canakkale province", Turkey Mikrobiyol Bul, 45, 48-57.
121. Thelaus, J., Andersson, A., Mathisen, P., Forslund, A.L., Noppa, L., Forsman, M. 2009. "Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water", FEMS Microbiol Ecol, 67(1), 69-80.
122. Titball, R.W., Sjøstedt, A., 2003. "*Francisella tularensis*: an overview", ASM News, 69, 558-63.
123. Toma, L., Mancini, F., Di Luca, M., Cecere, J.G., Bianchi, R., Khoury, C., Quarchioni, E., Manzia, F., Rezza, G., Ciervo, A. 2014. "Detection of microbial agents in ticks collected from migratory birds in central Italy", Vector Borne Zoonotic Dis, 14(3), 199-205.
124. Triebenbach, A.N., Vogl, S.J., Lotspeich-COLE, L., Sikes, D.S., Happ, G.M., Hueffer, K. 2010. "Detection of *Francisella tularensis* in Alaskan mosquitoes (Diptera: Culicidae) and assessment of a laboratory model for transmission" J Med Entomol, 47(4), 639-48.
125. Tuncer, E., Onal, B., Simsek, G., Elagoz, S., Sahpaz, A., Kilic, S., Altuntas, E.E., Ulu Kilic, A. 2014. "Tularemia: potential role of cytopathology in differential diagnosis of cervical lymphadenitis: multicenter experience in 53 cases and literature review", APMIS, 122(3), 236-42.
126. Ulu Kılıç, A., Kılıç, S., Sencan, I., Çiçek Şentürk, G., Gürbüz, Y., Tütüncü, E.E., Celebi, B., Kıcıman, Ö., Ergönül, Ö. 2011. "A water-borne tularemia outbreak caused by *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* in Central Anatolia region", Mikrobiyol Bul, 45, 234-47.
127. Ulu Kılıç, A., Gulen, G., Sezen, F., Kilic, S., Sencan, I. 2013. "Tularemia in central Anatolia", Infection, 41, 391-9.
128. Utku, I.F. 1954. "Antalya'da Tularemi epidemisi ve hususiyetleri", Türk Hij Tec Biol Der, 14, 288-91.

129. Uyar, M., Cengiz, B., Unlü, M., Celebi, B., Kılıç, S., Eryılmaz, A. 2011. "Evaluation of the oropharyngeal tularemia cases admitted to our hospital from the provinces of Central Anatolia", *Mikrobiyol Bul*, 45, 58-66.
130. Ünal Yılmaz, G., Gürcan, S., Özkan, B., Karadenizli, A. 2014. "Trakya Bölgesi'nde Farelerde Kültür, Seroloji ve Moleküler Yöntemlerle *Francisella tularensis* Varlığının Aranması", *Mikrobiyol Bul*, 48(2), 213-22.
131. Valentine, B.A., DeBey, B.M., Sonn, R.J., Stauffer, L.R., Pielstick, L.G.. 2004. "Localized cutaneous infection with *Francisella tularensis* resembling ulceroglandular tularemia in a cat", *J Vet Diagn Invest*, 16(1), 83-5.
132. Vogler, A.J., Birdsell, D., Price, L.B., Bowers, J.R., Beckstrom-Sternberg, S.M., Auerbach, R.K., Beckstrom-Sternberg, J.S., Johansson, A., Clare, A., Buchhagen, J.L., Petersen, J.M., Pearson, T., Vaissaire, J., Dempsey, M.P., Foxall, P., Engelthaler, D.M., Wagner, D.M., Keim, P. 2009. "Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone" *J Bacteriol*, 191(8), 2474-84.
133. Whipp, M.J., Davis, J.M., Lum, G., de Boer, J., Zhou, Y., Bearden, S.W., Petersen, J.M., Chu, M.C., Hogg, G. 2003. "Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia", *J Med Microbiol*, 52, 893-942.
134. Wicki, R., Sauter, P., Mettler, C., Natsch, A.,ENZLER, T., Pusterla, N., Kuhnert, P., Egli, G., Bernasconi, M., Lienhard, R., Lutz, H., Leutenegger, C.M. 2000. "Swiss Army Survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19, 427-32.
135. Willke, A., Meric, M., Grunow, R., Sayan, M., Finke, E.J., Splettstösser, W., Seibold, E., Erdogan, S., Ergonul, O., Yumuk, Z., Gedikoglu, S. 2009. "An outbreak of oropharyngeal tularaemia linked to natural spring water", *J Med Microbiol*, 58, 112-6.
136. Woods, J.P., Crystal, M.A., Morton, R.J., Panciera, R.J. 1998. "Tularemia in two cats", *J Am Vet Med Assoc*, 212(1), 81-3.
137. Woods, J.P., Panciera, R.J., Morton, R.J., Lehenbauer, T.W. 1998. Feline tularemia, Vol. 20. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, p. 442-57.
138. World Health Organization working group on Tularaemia. 2007. WHO Guidelines on Tularaemia, p. 115.

139. Yazgı, H., Uyanık, M.H., Ertek, M., Kılıç, S., Kireççi, E., Ozden, K., Ayyıldız, A. 2011. “Tularemia seroprevalence in the risky population living in both rural and urban areas of Erzurum”, *Mikrobiyol Bul*, 45, 67-74.
140. Yeşilyurt, M., Kılıç, S., Çağışar, O., Çelebi, B., Gül, S. 2011. “Yozgat İlinde Kene Kaynaklı İki Tularemi Olgusu”, *Mikrobiyol Bul*, 45(4), 746-54.
141. Zarrella, T.M., Singh, A., Bitsaktsis, C., Rahman, T., Sahay, B., Feustel, P.J., Gosselin, E.J., Sellati, T.J., Hazlett, K.R. 2011. “Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity”, *PLoS ONE*, 6(7), e22335.
142. Zhang, F., Liu, W., Wu, X.M., Xin, Z.T., Zhao, Q.M., Yang, H., Cao, W.C. 2008. “Detection of *Francisella tularensis* in ticks and identification of their genotypes using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis” *BMC Microbiol*, 8, 152.
143. Zvi, A., Rotem, S., Cohen, O., Shafferman, A. 2012. “Clusters versus affinity-based approaches in *F. tularensis* whole genome search of CTLepitopes”, *PLoS ONE*, 7(5), e36440.