



T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ SU ÖRNEKLERİ VE SU ÖRNEKLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *ACANTHAMOEBA* TÜRLERİNDE
FRANCISELLA TULARENSIS ARAŞTIRILMASI

MEHMET ATAŞ

DOKTORA TEZİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS-2012

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ SU ÖRNEKLERİ VE SU ÖRNEKLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *ACANTHAMOEBA* TÜRLERİNDE
FRANCISELLA TULARENSIS ARAŞTIRILMASI

MEHMET ATAŞ

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. ÖMER POYRAZ

SİVAS
2012

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Danışman)	Prof.Dr.Ömer POYRAZ	_____
Üye	Prof.Dr. Rıza DURMAZ	_____
Üye	Prof.Dr. Haldun SÜMER	_____
Üye	Prof.Dr. M.Zahir BAKICI	_____
Üye	Prof.Dr.Zeynep SÜMER	_____

ONAY

Bu tez çalışması, / /2012 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ömer POYRAZ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

ÇEŞİTLİ SU ÖRNEKLERİ VE SU ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ACANTHAMOEBA TÜRLERİNDE *FRANCISELLA TULARENSIS* ARAŞTIRILMASI

Mehmet ATAŞ

Doktora Tezi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer POYRAZ

2012, 103 Sayfa

Bu çalışmada, su örneklerinde *Francisella tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığının ve bu amiplerin *F. tularensis* taşıyıcılığındaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Sivas ilinde tularemi olgusu görülen bölgelerden 200, olgu görülmeyen bölgelerden 100 olmak üzere toplam 300 şebeke ve kaynak suyundan örnek toplanmıştır.

Su örnekleri 0.20 µm por çaplı membran filtrelerden süzölmüştür. Membran filtreler *F. tularensis* kültürü, *Acanthamoeba* kültürü ve DNA elde edilmesinde kullanılmıştır. Su örneklerinde *F. tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin ve bu amiplerin *F.tularensis* taşıyıcılığındaki rollerinin araştırılmasında kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılmıştır. Kültür çalışmalarında, *F.tularensis* için Glucose Cystein Blood Agar (GCBA), *Acanthamoeba* cinsi amiplerin üretilmesi için Besleyici Değeri Olmayan Agar (BDOA) kullanılmıştır. *Acanthamoeba* cinsi amiplerdeki *F.tularensis* taşıyıcılığının araştırılmasında, Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) besiyerinden yararlanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda *F.tularensis*'in Tul4, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin 18S rDNA gen bölgesine özgül primerler kullanılmıştır. *F.tularensis* alt tür analizinde ise RD1 gen bölgesine özgül primerler kullanılmıştır.

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 30'undan (%15) kültür yöntemi ile *F.tularensis* izolasyonu yapılırken, tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan 100 su örneğinin hiç birisinden *F.tularensis* izole edilmemiştir. Tür ve alt türe özgül primerler ile yapılan PZR deneyi sonucunda 30 *F.tularensis* izolatının tümünün *F.tularensis subsp. holarctica* olduğu bulunmuştur.

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 16'sından (%8), tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan 100 su örneğinin 12'sinden (%12) *Acanthamoeba* cinsi amip izole edilmiştir. Elde edilen toplam 28 *Acanthamoeba* izolatının hiçbirinde kültür ve PZR deneyleriyle *F.tularensis* taşıyıcılığı saptanmamıştır.

Alınan su örneklerinin tamamında konvansiyonel PZR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının varlığı araştırılmış olup, su örneklerinin hiç birisinde *F.tularensis* DNA'sının varlığı saptanmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada Sivas ilindeki şebeke ve kaynak sularında *F.tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığı saptanırken, amipler ile *F.tularensis* varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: *Francisella*, *Acanthamoeba*, PZR, Su, Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE)

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF *FRANCISELLA TULARENSIS* IN THE WATER SAMPLES AND IN *ACANTHAMOEBA* SPECIES ISOLATED FROM THE WATER SAMPLES

Mehmet ATAŞ

Doctoral Thesis, Department of Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Ömer POYRAZ

2012, 103 pages

In this study was aimed to investigation of the presence of *Francisella tularensis* and *Acanthamoeba* sp. in the water samples and the carrier role of *Acanthamoeba* sp. for *F.tularensis*. For this purpose, a total of 300 the drinking water supply and spring water 200 from tularemia appeared regions and 100 from tularemia not appeared regions were collected in Sivas.

The water samples were filtered through a 0,20 µ pore size membran filters. The membran filters were used for *F. tularensis* culture, *Acanthamoeba* culture and DNA extraction. In the study, culture and Polymerase Chain Reaction (PCR) methods were used to investigation of the presence of *F. tularensis* and *Acanthamoeba* sp. in the water and carrier role of *Acanthamoeba* sp. for *F. tularensis*. Glucose Cystein Blood Agar (GCBA) and the Non Nutrient Agar (NNA) were used for *F.tularensis* and *Acanthamoeba* sp. in the culture, respectively. On the other hand, Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) medium were used to investigate of carrier role of *Acanthamoeba* sp. for *F.tularensis*. Tul4 and 18S rDNA genes spesific primers were used for *F.tularensis* and *Acanthamoeba* sp. in the PCR, respectively. After that, RD1 gene spesific primers were used for *F.tularensis* subspecies analysing.

F.tularensis was isolated in 30 (15%) of 200 water samples which are from tularemia appeared regions, while was not been isolated in 100 water samples which are from tularemia not appeared regions with the culture method. As a result of the PCR assay with made by species and sub-species-specific primers, the all 30 isolates of *F.tularensis* were identified as *F.tularensis subsp. holarctica*.

Acanthamoeba sp. were isolated in 16 (8%) of 200 water samples from tularemia appeared regions, while 12 (12%) of 100 water samples from tularemia not appeared regions. *F.tularensis* was not detected with culture and PCR method in the *Acanthamoeba* isolates (28 isolates) obtained in the study.

All of the water samples were analyzed for the presence of *F.tularensis* with PCR method but the species was not detected in any samples.

As a result of the study, the presence of *F.tularensis* and *Acanthamoeba* sp. were detected in drinking water supply and spring water in Sivas. However, there was not a significant relationship between the presence of *F.tularensis* with *Acanthamoeba* sp.

Keywords: *Francisella*, *Acanthamoeba*, PCR, Water, Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE)

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında değerli katkılarından dolayı danışman hocam Prof.Dr.Ömer POYRAZ'a, tez konusunun belirlenmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Semra Özçelik'e, *Acanthamoeba polyphaga* suşunu temin eden Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Zübeyde AKIN POLAT'a, çalışmamızın istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Hafize SEZER'e teşekkür ederim.

Tularemi'nin laboratuvar tanısı konusunda yardımlarına başvurduğum Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ulusal Tularemi Referans Laboratuvarında görev yapan Doç.Dr.Selçuk KILIÇ ve Dr.Vet.Hek.Bekir ÇELEBİ'ye çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları yakın ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Sivas İl Sağlık Müdürlüğü Halk Sağlığı Laboratuvarı Müdürü Dr.Ahmet ALİM ve Müdür Yardımcısı Bio.Halim VURAL'a çalışmalar sırasında göstermiş oldukları sabır ve yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

Sivas İl Sağlık Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar Şubesi çalışanları; Sağlık Memuru Necmettin ÇİMEN, Sadi ŞAHİN ve Murat DALGALI'ya arazi çalışmalarında verdikleri desteklerden dolayı teşekkür ederim.

“Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından T-428 proje numarası ile desteklenmiştir”. Verdikleri destekten dolayı Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tarihçe	3
2.2 Mikrobiyolojik Özellikler	3
2.2.1 Sınıflandırma, Alt Türler ve Biyovarlar	3
2.2.2 Mikroskopik Görünüm, Boyanma ve Biyokimyasal Özellikler.....	5
2.3 Bulaş Yolları	6
2.3.1 Solunum Yolu İle Bulaşma	6
2.3.2 Sindirim Yolu ile Bulaşma	7
2.3.3 Enfekte Hayvanlarla Temas Yolu ile Bulaşma	7
2.3.4 Vektörler Aracılığı ile Bulaşma	7
2.4 Dayanıklılık	7
2.5 Klinik	8
2.5.1 Ülseroglandüler Tularemi	8
2.5.2 Glandüler Tularemi	9
2.5.3 Orofarengeal Tularemi	9
2.5.4 Oküloglandüler Tularemi	9
2.5.5 Sistemik (Tifoidal) Tularemi.....	10
2.5.6 Pnömonik Tularemi.....	10
2.5.7 Tularemi’de Cilt Döküntüleri.....	10
2.6 Tedavi ve Antibiyotiklere Direnç	10
2.7 Laboratuvar Tanısı.....	11
2.7.1 Serolojik Tanı	12
2.7.2 Kültür	14
2.7.3 Moleküler Tanı ve Tiplendirme	15
2.8 Epidemiyoloji	16
2.9 <i>Acanthamoeba</i> Cinsi Amipler.....	24
2.9.1 <i>Acanthamoeba</i> Cinsi Amipler ile Bakteri İlişkileri.....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1 Örneklerin Toplanması	29
3.2 Çalışmada Kullanılan Alet, Ekipman ve Malzemeler	30
3.3 Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	32
3.4 Su Örneklerinin Filtre Edilmesi.....	35
3.5 Su Örneklerinden <i>F.tularensis</i> İzolasyonu	35
3.6 Su Örneklerinden <i>Acanthamoeba</i> Cinsi Amiplerin İzolasyonu.....	36
3.7 <i>Acanthamoeba</i> spp. ile <i>F.tularensis</i> Arasındaki İlişkinin Araştırılması.....	37
3.8 DNA İzolasyonu	38
3.9 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	40

3.9.1 <i>F.tularensis</i> 'in PCR ile Tür Düzeyinde Tanımlanması.....	40
3.9.2 <i>F.tularensis</i> 'in PCR ile Alt Tür Düzeyinde Tanımlanması.....	42
3.9.3 <i>Acanthamoeba</i> Cinsi Amiplerin PCR ile Tanımlanması.....	43
3.10 Agaroz Jel Elektroforezi	45
3.10.1 Agaroz Jelin Hazırlanması	45
3.10.2 Elektroforez İşlemi ve Görüntüleme.....	45
3.11 İstatistik.....	45
4. BULGULAR	46
4.1 İncelenen Su Örneklerinin Değerlendirilmesi	46
4.2 İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	48
4.2.1 Kültür Bulguları	48
4.2.2 PCR Bulguları	56
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	
EK-1 Tularemi Olgusu Görülmeyen Bölgelerden Alınan Su Örnekleri.....	82
EK-2 Tularemi Olgusu Görülen Bölgelerden Alınan Su Örnekleri	85
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Dünyada tulareminin endemik olarak görüldüğü bölgeler	16
Şekil 3.1	Örneklerin alındığı bölgelerin il genelinde dağılımı.....	30
Şekil 4.1	Su örnekleri dağılım grafiği	48
Şekil 4.2	GCBA besiyerinde, membran filtre üzerinde çoğalan <i>F.tularensis</i> kolonilerinin stereo mikroskop altında görünüşleri(5.gün).....	49
Şekil 4.3	GCBA besiyerinde, membran filtre üzerinde çoğalan <i>F.tularensis</i> kolonilerinin stereo mikroskop altında görünüşleri(6.gün).....	49
Şekil 4.4	Gemerek Çiçekoğlu köyünden alınan su örneğinde üretilen <i>F. tularensis</i> 'in membran filtre ve besiyeri üzerinde üreme görünüşü(7.gün)	50
Şekil 4.5	GCBA besiyerinde <i>F.tularensis</i> 'in üreme görünüşü.....	50
Şekil 4.6	Kültür yöntemiyle <i>F.tularensis</i> izole edilen merkezlerin il haritası üzerinde dağılımı	52
Şekil 4.7	<i>Acanthamoeba</i> cinsi amip izole edilen bölgelerin il haritası üzerinde dağılımı	52
Şekil 4.8	BDOA plaklarında üretilen <i>Acanthamoeba</i> cinsi amip kistlerinin görünüşleri (10X)	53
Şekil 4.9	BDOA plaklarında üretilen <i>Acanthamoeba</i> cinsi amip trofozoitlerinin görünüşleri(10X)	53
Şekil 4.10	<i>Acanthamoeba</i> cinsi amiplerin BCYE besiyerinde üremeleri sırasında oluşturdukları izler	56
Şekil 4.11	<i>Francisella</i> cinsi bakterilerin Tul4 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	57
Şekil 4.12	<i>Francisella</i> cinsi bakterilerin RD1 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	57
Şekil 4.13	<i>Acanthamoeba</i> cinsi amiplerin 18S rDNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	<i>Francisella</i> türlerini ve alt türlerini birbirlerinden ayıran özellikler..	6
Çizelge 2.2	Erişkinlerde ve çocuklarda tularemi tedavisinde önerilen antibiyotikler, dozu ve süreleri.....	11
Çizelge 2.3	1936-2005 yılları arasında ülkemizde bildirilen tularemi salgınları..	24
Çizelge 4.1	İncelenen su örneklerinin ilçelere göre dağılımı.....	46
Çizelge 4.2	İncelenen su örneklerinin alındığı yerleşim yeri sayısına göre dağılımı	46
Çizelge 4.3	İncelenen su örneklerinin niteliğine göre dağılımı.....	47
Çizelge 4.4	İncelenen su örneklerinin aylara göre dağılımı.....	47
Çizelge 4.5	Kültür yöntemi ile <i>F.tularensis</i> izole edilen örneklerin yerleşim yerlerine göre dağılımı	51
Çizelge 4.6	Kültür yöntemi ile <i>F.tularensis</i> izole edilen örneklerin dağılımı.....	51
Çizelge 4.7	Tularemi olgusu görülen bölgelerden üretilen <i>Acanthamoeba</i> cinsi amiplerin dağılımı	54
Çizelge 4.8	Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden üretilen <i>Acanthamoeba</i> cinsi amiplerin dağılımı.....	54
Çizelge 4.9	<i>Acanthamoeba</i> cinsi amip izolasyon sonuçları	55
Çizelge 4.10	<i>F.tularensis</i> ve <i>Acanthamoeba</i> cinsi amiplerin izolasyon sonuçları..	55

KISALTMALAR DİZİNİ

ARB	Amoeba Rezistant Bacteria
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract Agar
BDOA	Besleyici Değeri Olmayan Agar
BGD	Biyogüvenlik Düzeyi
CFU	Colony Forming Unit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GCBA	Glucose Cystein Blood Agar
HCL	Hidroklorik Asit
KOH	Potasyum Hidroksit
LVS	Live Vaccine Strain
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NNA	Non Nutrient Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPYG	Proteose Pepton Yeast Extract Glucose Broth
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TSI	Triple Sugar Iron Agar
WHO	World Health Organization

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tularemi Kuzey yarım küreye özgü bakteriyel zoonoz bir hastalıktır. Hastalık Kuzey yarım kürede 30° - 71° enlemleri arasında bulunan ülkelerde görülmektedir. Hastalık etkeni fakültatif, intrasellüler, gram negatif bir bakteri olan *Francisella tularensis*'tir (Sjöstedt, 2007; WHO, 2007).

F.tularensis insanlara kene, sivrisinek gibi böceklerin ısırması, enfekte hayvanların doku ve vücut sıvılarına temas edilmesi, kontamine olmuş su ve besinlerin alınması ve enfekte aerosollerin solunması yolu ile bulaşmaktadır. Tularemi hastalığında insandan insana bulaş bildirilmemiştir (Sjöstedt, 2007; WHO, 2007).

Tularemi enfeksiyonu *F.tularensis* bakterisinin alt türüne, bakterinin virülansına ve bulaş yoluna göre değişik şekillerde ortaya çıkmaktadır. Tularemi enfeksiyonlarında ülseroglandüler, glandüler, oküloglandüler, orofarengeal, sistemik (tifoidal) ve pnömonik tularemi olarak isimlendirilen klinik şekiller gözlenmektedir (Sjöstedt, 2007).

F.tularensis subsp. tularensis Kuzey Amerika'da bulunan alt türdür. Virülansı yüksektir ve genellikle tavşan, kene ve koyunlarla ilişkilidir. *F.tularensis subsp. holarctica* ise Kuzey yarım kürenin değişik ülke ve bölgelerinden izole edilmiştir. Virülansı *F.tularensis subsp. tularensis*'e göre daha düşüktür. Akarsu, gölet, göl ve nehir gibi sucul ortamlarla ilişkilidir (Sjöstedt, 2007; WHO, 2007).

Tularemi hastalığının epidemiyolojisinde karasal döngü ve su döngüsü olmak üzere iki farklı döngü tanımlanmaktadır. Karasal döngüde başlıca vektörleri yabani tavşanlar, keneler ve bazı sinek türleri oluştururken hastalığın su döngüsünde kunduz, misk sıçanı ve diğer sıçan türleri rol oynamaktadır. İnsan ise bu döngülerde organizma ile temas ederek organizmayı kazanan konak olarak tanımlanmaktadır. (Mörner, 1992; Nigroviç ve Wingerter, 2008).

Doğada toprak, hava ve su gibi çevrelerde özgür olarak yaşayan çeşitli amip cins ve türleri bulunmaktadır. İstemli ya da fırsatçı patojen olarak tanımlanan bu amipler insanlarda başlıca merkezi sinir sistemi ve göz enfeksiyonları oluşturmaktadırlar (Martinez ve Visvesvara, 1997; John, 1998; Visvesvara ve ark., 2007).

Amipler yaşadıkları ortamda bulunan bakteri, alg ve mantarlarla beslenmektedirler. Fagositozla hücre içerisine alınan bakteriler fagozom lizozom birleşmesinden sonra oluşan fagolizozom içerisinde sindirilmektedirler. Amoeba Rezistant Bacteria (ARB) olarak adlandırılan *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli O157*,

Francisella tularensis, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae* ve *Mycobacterium avium* gibi bakteriler ise özgür yaşayan amipler içerisinde canlı kalarak yaşamlarını devam ettirebilmektedirler (Greub ve Raoult, 2004).

F.tularensis hücre içi bir bakteri olup diğer bir çok bakteri gibi suda serbest yaşayan protozoonlar dahil bir çok canlıda yaşayabilmektedir. *F.tularensis*'in deneysel şartlarda protozoonlar içerisinde çoğalabildiği gösterilmiştir. Bu durumun bakteri için kısa süreli üreme ortamı oluşturabileceği ve protozoonların *F.tularensis* için doğal rezervuar olabileceği düşünülmektedir (Berdal ve ark., 2000; Abd ve ark., 2003).

F. tularensis dış ortam koşullarına oldukça dayanıklı olup, özellikle sudaki serbest yaşayan amipler (*Acanthamoeba castellanii*) içinde yaşamını sürdürebilmesinin, su kaynaklı epidemiler ve hastalığın bölgesel devamlılığı açısından önemli olduğu kabul edilmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2011).

Dünyada enfekte hayvanlarla ve kene ile temas, en sık gözlenen bulaşma yolu iken, ülkemizde klorlanmamış içme suyu veya kaynak suyu tüketilmesi ana bulaş yolunu oluşturmaktadır (Kılıç, 2010; Sağlık Bakanlığı, 2011).

Bu çalışmada Sivas ilindeki şebeke ve kaynak sularında *F.tularensis* bakterisinin ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığı ile *Acanthamoeba* cinsi amiplerdeki *F.tularensis* taşıyıcılığının kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile belirlenerek tularemi hastalığının epidemiyolojisine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Tularemi dünyanın farklı yerlerinde; su sıçanı avcı hastalığı (Rusya), Ohara hastalığı ve yabani tavşan ateşi yato-byo (Japonya), veba benzeri hastalık (California), geyik sineği ateşi (Utah), glandular kene ateşi (Idaho ve Montana), Pazarcı hastalığı (Washington) ve tavşan ateşi (Orta Amerika) hastalığı olarak adlandırılmaktadır (Ellis ve ark., 2002; Penn, 2005; Wilke, 2006; Gürcan, 2007). Ülkemizde top hastalığı, şiş hastalığı veya pirinç hastalığı olarak halk arasında isimlendirilmiştir (Özel, 1938).

McCoy ve Chapin 1911 yılında ABD'nin California eyaletinin Tulare bölgesinde yakalanan sincaplardan hastalık etkeni bakteriyi izole etmişler ve etkene *Bacterium tularense* adını vermişlerdir. Tularemi hastalığı etkeni olan *Francisella tularensis*'in insandan ilk izolasyonu ise Lamb ve arkadaşları tarafından 1914 yılında gerçekleştirilmiştir (Ellis ve ark., 2002; Nigroviç ve Wingerter, 2008).

Edward Francis 1919 yılında hastalığın geyik sinekleri ile bulaşabildiğini deneysel enfeksiyonla göstermiş ve hastalığa “ Geyik yangısı” adını vermiştir. Edward Francis 1921 yılında kan emen böceklerin ısırması ile kemirgenlerden insana bulaşın meydana geldiğini bildirmiş ve hastalığın adının tularemi olmasını önermiştir (Francis, 1921).

Tularemi hastalığı Japonya'da 1925, Rusya'da 1928, Norveç'te 1931, Avusturya'da 1935 ve Çekoslovakya'da 1936 yıllarında tanımlanmıştır (ONUL, 1980).

Tularemi hastalığı ülkemizde ilk kez 1936 yılında Çorlu Askeri Hastanesi doktorlarından Ömer Bican, İrfan Titiz, Mustafa Fevzi Kurtaran ile Gülhane Hastanesi doktorlarından Hüseyin Kemal tarafından bildirilmiştir. Hüseyin Kemal tarafından hastalardan *F.tularensis* bakterisi izole edilmiştir (Gotschlich ve Berkin, 1938; Tokgöz ve Golem, 1938).

2.2 Mikrobiyolojik Özellikler

2.2.1 Sınıflandırma, Alt Türler ve Biyovarlar

Francisella cinsi içerisinde bulunan bakteriler ilk yıllarda *Brucella* ve *Pasteurella* türleri ile birlikte *Bacterium* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Yapılan genetik, fenotipik ve hücre duvarı analizleri sonucunda 1960'lı yıllarda yeni bir cins olarak

kabul edilmiştir. *Francisella* cinsi Bergey's Manuel'in 2000 yılı baskısında *Thiotrichales* alt sınıfında, *Proteobacteria* γ alt bölümünde, *Francisellaceae* ailesinin tek cinsi olarak yer almaktadır (Winn ve ark., 2006).

Francisella cinsi içerisinde iki tür bulunmakta olup bunlar; *F.tularensis* ve *F.philomiragia*'dır. *F.tularensis* insanlarda ve tavşanlardaki virülansına, 16S dizilimine, biyokimyasal reaksiyonlarına ve epidemiyolojik özelliklerine göre dört alt türe ayrılmaktadır. Bu tür ve alt türlerin sınıflandırılması aşağıda görüldüğü gibidir.

1. *Francisella tularensis*

a. *F.tularensis subsp. tularensis*

(*F.tularensis subsp. nearctica* veya biyovar tip A)

b. *F.tularensis subsp. holarctica*

(*F.tularensis subsp. palaeartica* veya biyovar tip B)

c. *F.tularensis subsp. mediaasiatica*

d. *F.tularensis subsp. novicida*

2. *Francisella philomiragia*

F.tularensis subsp. tularensis, insanlar ve tavşanlar için en virulan suştur. Solunum yolu ile vücuda alınan 10 bakteri enfeksiyon gelişimi için yeterlidir. Kuzey Amerika'da yaygın olarak görülürken Avrupa'da yaygın değildir (Ellis ve ark., 2002; Tarnvik ve Berglund, 2003; Penn, 2005; WHO, 2007).

F.tularensis subsp. holarctica Avrupa, Asya, Japonya ve Kuzey Amerika'da, *F.tularensis subsp. holarctica biovar japonica* Japonya'da izole edilmiştir. İnsanlarda orta düzeyde virulan iken tavşanlardaki virülansı düşüktür (Ellis ve ark., 2002; Tarnvik ve Berglund, 2003; Penn, 2005; WHO, 2007).

F.tularensis subsp. mediaasiatica Kazakistan ve Türkmenistan'da izole edilmiştir ve orta derecede virulandır. İnsan ve tavşanlarda hafif seyirli bir hastalık yapar (Ellis ve ark., 2002; Tarnvik ve Berglund., 2003; Penn, 2005; WHO, 2007).

F.tularensis subsp. novicida ölü misk fareleri ile kontamine sulardan ve nadir insan olgularından izole edilmiştir. Kuzey Amerika'da ve Avustralya'da görülür. İnsanlarda nadiren (sadece immün baskılanmış olgularda) enfeksiyon oluşturur. İnsandan insana bulaştığı gösterilmediğinden hasta ile temas edilmesi veya aynı ortamda bulunulmasının riskli olmadığı kabul edilmektedir (Ellis ve ark., 2002; Tarnvik ve Berglund, 2003; Penn, 2005; WHO, 2007).

Tularemi hastalığının inkübasyon süresi suşun virülansına, enfektif doza ve konağa giriş yoluna göre 1-14 gün arasında değişir, ancak çoğu olguda semptomlar 3-5 gün içinde gelişmektedir (Ellis ve ark., 2002; Tarnvik ve Berglund, 2003; Penn, 2005; Winn ve ark., 2006; WHO, 2007).

Hayvanlardan ve sularından izole edilen *F.philomiragia* türü, *F.tularensis*'e göre daha düşük virülanslıdır. Çoğunlukla immün yetersizliği olan veya yakın temasla oluşan yaralanmalara sahip hastalarda nekrotizan pnömoni, bakteriyemi ve menenjit yapabildiği gösterilmiştir (Forbes ve ark., 2007).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda Atlantik Morinalarından izole edilen *F.philomiragia subsp. noatunensis* alt türü ile yine Atlantik Morinalarında ölümcül hastalıklar yapabilen *F.piscicida* türleri tanımlanmıştır (Mikalsen ve ark., 2007; Ottem ve ark., 2007).

2.2.2 Mikroskopik Görünüm, Boyanma ve Biyokimyasal Özellikler

Francisella cinsi bakteriler gram negatif, kokobasil görünümünde, hareketsiz, sporsuz, fakültatif intrasellüler bakterilerdir. *F.tularensis* 0.2x0.2-0.7 µm, *F.novicida* ise 0.7-1.7 µm boyutlarındadır. Boyutları küçük olduğundan Gram boyası ile soluk boyanırlar. Gram veya Giemsa boyası ile boyandıklarında bipolar boyanma gösterirler ve kok görünümü verirler (Penn, 2005; Winn ve ark., 2006).

F.tularensis oksidaz ve üreaz negatif olup, katalaz testinde zayıf pozitif özellik göstermektedir (WHO, 2007).

F.tularensis vahşi suşları ve *F.tularensis subsp. holarctica*'dan üretilen canlı aşı suşu (mutant live vaccine strain-LVS) yüzeylerinde eksopolisakkarit bir kapsüle sahiptir. Kapsülün bakteriyi serum kompleman etkisinden koruduğu bilinmektedir. Kapsülü uzaklaştırılmış bakterilerin farelerde ve kobaylarda hastalık oluşturamaması kapsülün virülanstaki rolünü göstermektedir (McLendon ve ark., 2006).

Francisella'nın lipopolisakkariti kendine özgü yapıdadır. *F.tularensis subsp. tularensis* ve *F.tularensis subsp. holarctica* lipopolisakkaritlerindeki O antijenleri aynıdır fakat *F.tularensis subsp. novicida* O antijeni farklıdır (McLendon ve ark., 2006).

Francisella türlerini ve alt türlerini birbirlerinden ayıran özellikler Çizelge 2.1'de görülmektedir (WHO, 2007).

Çizelge 2.1 *Francisella* türlerini ve alt türlerini birbirlerinden ayıran özellikler

Özellik	<i>F.tularensis</i> alt tür				
	<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediaasiatica</i>	<i>novicida</i>	<i>F.philomiragia</i>
Sistin, Sistein ihtiyacı	+	+	+	-	-
Karbonhidrat fermentasyonu					
Maltoz	+	+	-	zayıf	-
Sukroz	-	-	-	+	+
D-Glukoz	+	+	-	+	zayıf
Gliserol	+	-	+	zayıf	-
Sitrülin üreidaz üretimi	+	-	+	+	Test edilmedi
Oksidaz üretimi*	-	-	-	-	+
TSI'da** H ₂ S üretimi	+				
Hücre büyüklüğü	0.2–0.7x0.2	0.2–0.7x0.2	0.2–0.7x0.2	0.7x1.7	0.7x1.7

* Kovak's ayırıcı ile

** Triple Sugar Iron Agar

2.3 Bulaş Yolları

F.tularensis doğal olarak enfektif aerosollerin solunması, kontamine su ve gıdaların alınması, enfeksiyöz sıvı ve hayvan dokuları ile temas edilmesi veya içilmesi, nadiren de kene ve bazı sineklerin ısırması ile bulaşabilmektedir (Ellis ve ark., 2002; Tarnvik ve Berglund, 2003).

Kuzey Amerika ve Japonya'da genellikle avcılarda direkt temasla, av hayvanlarıyla ve keneler aracılığı ile bulaşmaktadır. Kuzey Avrupa ülkelerinde sivrisinek, kene ve tavşanlarla bulaşırken Güney Avrupa, Balkan ülkeleri ve ülkemizde kontamine su kaynaklı bulaş daha fazla görülmektedir (Penn, 2005; Wilke, 2006; Nigroviç ve Wingerter, 2008; Kılıç, 2010).

2.3.1 Solunum Yolu İle Bulaşma

Aerosol şeklinde bulunan kontamine su ve toz partiküllerinin solunum yolundan alınması ile meydana gelmektedir. En sık karşılaşılan risk faktörleri hasat yapmak, çim biçmek veya benzer aktivitelerdir. Solunum yolu ile bulaşma İskandinav ülkelerinde yaşayan çiftçilerde, ABD'de bahçe düzenlemesi yapan peyzajcılarda ve Orta Avrupa'da şeker kamışı hasatı yapanlarda bildirilmektedir. Laboratuvar çalışanları da solunum yolu ile bulaş açısından yüksek risk grubundadır. Solunum yolu ile meydana gelen

enfeksiyon genellikle tifoidal ve respiratuvar tularemiye neden olmaktadır (Dahlstrand ve ark., 1971; Syrjala ve ark., 1985; Cerny, 2001; Feldman ve ark., 2001, 2003; Jensen ve Kirsch, 2003; Tarnvik ve ark., 2004).

2.3.2 Sindirim Yolu ile Bulaşma

F.tularensis ile kontamine olmuş su ve besin maddelerinin sindirim yolu ile vücuda alınması ile ortaya çıkmaktadır. Kontamine olmuş suların neden olduğu tularemi olgularına özellikle Türkiye ve Güney Avrupa'da rastlanırken, ABD ve Kuzey Avrupa'dan nadiren olgu bildirilmektedir (Greco ve ark., 1987; Helvaci ve ark., 2000; Gürcan ve ark., 2004; Karadenizli ve ark., 2005). Bulgaristan'da sindirim yolu ile bulaşarak salgına neden olan 262 olguluk tularemi salgını bildirilmiştir (Christova ve ark., 2004).

2.3.3 Enfekte Hayvanlarla Temas Yolu ile Bulaşma

F.tularensis'in sağlam deriden penetre olabileceği deneysel olarak gösterilmiştir (Ohara, 1926). Enfekte hayvanlarla temas yolu ile bulaşma en fazla avcılarda ve av hayvanı ile temas edenlerde görülmektedir. Domuz, kemirgenler ve lagomorflar gibi hayvanlarla temas önemli risk faktörüdür (Münnich ve Lakatos, 1979; Ohara ve ark., 1996). Tularemi hastalığının bireysel bazı olgularda kedi ısırığı ile de bulaştığı bildirilmektedir (Capellan ve Fong, 1993; Liles ve Burger, 1993).

2.3.4 Vektörler Aracılığı ile Bulaşma

Kuzey Amerika ve Orta Avrupa'da farklı kene türlerinin *Francisella tularensis* taşıyıcısı olduğu gösterilmiştir. *Tabanidae* familyası içerisinde yer alan at sinekleri (*Tabanus ssp.* ve *Chrysozoma ssp.*) ve *Grysops* türü sineklerde etkeni taşıyabilmektedirler. ABD'de kene ve sinek gibi artropodlar en önemli vektörlerdir. İsveç ve Finlandiya'da ise sivrisinekler tularemi için önemli vektörler olarak tanımlanmaktadır. (Klock ve ark., 1973; Hopla, 1974; Eliasson ve ark., 2002; Petersen ve Schriefer, 2005).

2.4 Dayanıklılık

F.tularensis suda, toprakta, hayvan leşlerinde ve atıklarında aylarca, samanda altı ay ve - 15°C'de dondurulmuş tavşan etinde yıllarca canlı kalabilmektedir. Yüksek ısıya ve kloro dayanıksız olduğundan kaynatılmış veya klorlanmış suda canlılığını devam

ettiremez. Klorlanmamış suda 90 güne kadar canlı kalabildiği gösterilmiştir. Fiziksel etkenlere, kimyasal dezenfektanlara, standart inaktivasyon işlemlerine ve UV ışınlarına karşı oldukça duyarlıdır. *F.tularensis subsp. holarctica* yüzey sularında ve toprakta aylarca canlı kalabilmektedir. Doğal şartlarda *F.tularensis* su ve çamurda aylarca canlılığını koruyabilmektedir (Hopla, 1974; Ellis ve ark., 2002; WHO, 2007; Kılıç, 2010).

Francis besiyeri ve McCoy besiyerinde üreyen bakteriler buzdolabında saklanmak koşulu ile canlılıklarını 4 ay sürdürebilirler (Tokgöz ve Golem, 1938). Aşı suşu sağlamak veya DNA izolasyonu yapmak için 60 °C’de bir saat ısıtmak bakterilerin inaktivasyonu için yeterlidir (WHO, 2007).

Ortam temizliğinde ve arındırılmasında, %5 NaOCl kullanılması yeterlidir. Dezenfeksiyon işlemi için aerosolizasyondan kaçınmak koşulu ile kuaterner amonyum bileşikleri de kullanılabilir (Kılıç, 2006).

2.5 Klinik

F.tularensis fakültatif intrasellüler bir mikroorganizmadır. Diğer hücre içi bakterilerde olduğu gibi makrofaj sitozolünde fagozomal yapıyı parçalamakta ve çoğalmaktadır. Klinik tablo bakterinin virülansına, vücuda giriş yoluna ve konağın immün durumuna göre değişiklikler göstermektedir (Kılıç, 2006; WHO, 2007; Sağlık Bakanlığı, 2011).

Hastalığın kuluçka süresi 3-5 gün olmakla birlikte 1-21 gün arasında değişebilmektedir. Asemptomatik seyir gösterebileceği gibi bakteriyemi ile sonuçlanan olgularda görülmektedir. Hastalık Ülseroglandüler, Glandüler, Oküloglandüler, Orofarengeal, Sistemik (tifoidal) ve Pnömonik tularemi olmak üzere 6 değişik formda gözlenmektedir (Kılıç, 2006; WHO, 2007; Sağlık Bakanlığı, 2011).

Hastalık ateş, üşüme, titreme, baş ağrısı, halsizlik, iştahsızlık ve yorgunluk ile genellikle ani olarak başlar. Ateş 38 °C ve üstüne çıkarak tedavi edilmeyen olgularda 30 günden fazla sürebilmektedir. Ayrıca öksürük, kas ağrısı, göğüste rahatsızlık hissi, kusma, boğaz ağrısı, karın ağrısı ve diyare görülebilir (Kılıç, 2005; WHO, 2007; Sağlık Bakanlığı, 2011). Ülkemizde tularemiye bağlı tek ölüm vakası 1936 yılındaki Trakya salgınında bildirilmiştir (Gotschlich ve Berkin, 1938).

2.5.1 Ülseroglandüler Tularemi

F.tularensis subsp. tularensis enfeksiyonu başlıca ülseroglandüler formda seyredir. Hastaların %21-78’inde bu form gözlenmektedir (Aydemir, 2009). Bakteri cilt yolu ile

vücuda girer ve bu giriş yerinin drene olduğu lenf bezini tutar. Cilt lezyonu kırmızı ve ağrılı bir papül şeklinde başlar. Papül daha sonra nekroza uğrar ve ülserleşir. Genellikle kene ısırması, sivrisinek sokması ve enfekte hayvan dokularına temas sonrası oluşur. Kuzey Amerika'da kene ısırığı ve tavşan avcılarında gelişen olgularda en sık ülseroglandüler tularemi gözlenmektedir. Kuzey Avrupa'da ise sivrisinek ısırmasına bağlı olarak gözlenmektedir (Helvacı, 2009).

2.5.2 Glandüler Tularemi

Glandüler tularemi cilt lezyonu olmadan ağrılı lenfadenopati ile karakterizedir. ABD'de olguların %3-20'sinde, Japonya'da ise %62'sinde bu form görülmektedir (Aydemir, 2009). Cilt lezyonunun çok küçük veya atipik olması nedeniyle gözden kaçabilir. Büyümüş lenf bezleri uzun süre kalabilir. Ağrılı lenfadenopati vardır ve deride ülser gözlenmez (Helvacı, 2009).

2.5.3 Orofarengeal Tularemi

Bakteri kontamine su, gıdalar ve damlacıklar ile oral yoldan alınır. En yaygın semptomlar ateş ve şiddetli boğaz ağrısıdır. Hastalarda eksüdatif farenjit veya tonsillit mevcuttur. Bir veya daha fazla ülser görülebilir. Tek taraflı veya bilateral lenfadenopati gelişebilmektedir. Birkaç lenf nodu büyüyerek birleşebilmekte ve ağrılı, yumurta büyüklüğünde bir kitle haline gelebilmektedir. Lenf nodları ilerleyen zamanlarda süpüre olabilmektedir. Ülkemizde görülen tularemi vakalarının büyük çoğunluğu kontamine su ve gıda alınmasına bağlı olarak orofarengeal formda gözlenmektedir (Helvacı, 2009).

Ağızda ve farinks mukozasında kızarıklık ve püstüler değişimler yaygındır. Genellikle tek taraflı olarak lenfadenit gelişebilmektedir. Bu bulgular streptokokkal tonsillit, enfeksiyöz mononükleoz ve tüberküloz lenfadenit ile karışabilmektedir (Karadenizli ve ark., 2005).

2.5.4 Oküloglandüler Tularemi

Kontamine olmuş ellerle veya kontamine suyun göze teması ile ortaya çıkan tularemi formudur. Su kaynaklı tularemi vakalarının sıklıkla görüldüğü ülkemizde de kontamine su aracılığı ile bulaş gerçekleşmektedir. Genellikle tek taraflı pürülan konjonktivit ve aynı tarafta preavriküler lenfadenopati mevcuttur. Gözde ağrı, kaşıntı, fotofobi, hiperemi ve periorbital ödem gözlenebilmektedir (Helvacı, 2009).

2.5.5 Sistemik (Tifoidal) Tularemi

Çok fazla sayıda bakterinin vücuda alınması durumunda, immün sistemi bozuk veya baskılanmış olanlarda görülmektedir. Tulareminin en ağır formudur. Bakterinin vücuda giriş yeri genellikle tespit edilemez. Hastalarda toksik görünüm, yüksek ateş, üşüme, baş ağrısı, halsizlik, kusma, karın ağrısı ve diyare görülmektedir (Helvacı, 2009). Hastaların %5-30'unda görülen bu formun tanısını koymak diğer klinik formlara göre daha zordur ve bulaş değişik yollarla olmaktadır (Aydemir, 2009).

2.5.6 Pnömonik Tularemi

Bakterinin solunum yoluyla vücuda alınması sonrası veya diğer formların komplikasyonu olarak hematogen yolla gelişir. Hastalarda yüksek ateş ve baş ağrısının yanında akciğerlerde tek taraflı veya bilateral infiltratlar, hiler lenfadenopati ve plörezi saptanabilmektedir. Tulareminin pnömonik formu ölümcül olarak seyredabilmektedir (Syrjala ve ark., 1985; Helvacı, 2009). Tüm tularemi hastalarının %7-20'sini pnömonik form oluşturmaktadır (Aydemir, 2009).

2.5.7 Tularemi'de Cilt Döküntüleri

Tularemi olgularında hastaların %3-25'inde makülopapüler, vezikülopapüler, eritema nodosum, eritema multiforme, akne benzeri veya ürtiker şeklinde deri döküntüleri görülmektedir. Döküntüler genellikle semptomların başlamasından sonraki 2 hafta içerisinde ortaya çıkmaktadır (Penn, 2005). Tularemidе görülen sekonder deri bulguları sıklıkla kolları ve bacaklarda görülmektedir. Kadınlarda görülme oranı erkeklerden daha fazladır ve tedaviye başlanmasıyla birlikte süratli bir iyileşme sağlanmaktadır (Helvacı, 2009; Sarıcı ve Altınyazar, 2009).

2.6 Tedavi ve Antibiyotiklere Direnç

İnsanlarda *F.tularensis*'e karşı humoral ve hücrel bağışık yanıt oluşmakta, humoral yanıt ile oluşan antikorlar 8-25 yıl süre ile kanda saptanabilecek düzeyde kalmaktadır. Antikorların oluşması tek başına koruyuculukta etkin olmayıp diğer intrasellüler mikroorganizmalarda olduğu gibi etkin bir bağışıklık için hücrel immünitenin de oluşması gerekmektedir (Meriç, 2009).

Antibiyotiklerin kullanıma girmesinden önceki dönemlerde, toplam olgu fatalite hızı yaklaşık %7 (%5-15 arasında) ve ağır olgulardaki (pnomoni ve tifoidal formda) mortalite oranı %33 iken, günümüzde mortalite %2 düzeylerine inmiştir. Etkili

antimikrobiyal tedavinin kullanımından önce, hastalığın 3 ay veya daha uzun süren konvelesan dönemle seyrettiği bildirilmiştir (Kılıç ve Yeşilyurt, 2011).

Tularemi tedavisinde kullanılan başlıca antibiyotikler streptomisin, gentamisin, tetrasiklin, doksisisiklin, kloramfenikol ve kinolon türevleridir (Çizelge 2.2) (Penn, 2005; Tarnvik ve Chu, 2007; Kılıç ve Yeşilyurt, 2011; Sağlık Bakanlığı, 2011).

Çizelge 2.2 Erişkinlerde ve çocuklarda tularemi tedavisinde önerilen antibiyotikler, dozu ve süreleri (Sağlık Bakanlığı, 2011)

	Antibiyotik	Erişkin Dozu	Çocuk Dozu	Süre
I. Seçenek	Streptomisin	15 mg/kg/gün Maksimum doz 2 gr/gün Veriliş Yolu:IM	15 mg/kg/gün Günlük doz ikiye bölünür	10 gün
	Gentamisin	5 mg/kg/gün Veriliş Yolu:IM-IV	5 mg/kg/gün Günlük doz iki veya üçe bölünür	10 gün
II. Alternatif Tedavi	Siprofloksasin *	2x500 mg/gün oral 2x400 mg/gün, IV	15 mg/kg/gün Doz en fazla 1 gr/güne kadar çıkabilir	10-14 gün
	Doksisisiklin *	2x100 mg oral	4 mg/kg/gün	15-21 gün

* Çocuklarda mecbur kalmadıkça kullanılmamalıdır.

F.tularensis suşları beta-laktamaz aktivitesine sahip olduklarından Beta-laktam grubu antibiyotikler tularemi tedavisinde kullanılmamaktadır (Baker ve ark., 1985). Eritromisin direnci Avrupa'dan izole edilen suşlarda, Rusya'nın endemik bölgelerinde ve ülkemizde yaygın olarak görülürken, Kuzey Amerika'da izole edilen suşlarda daha az görülmektedir. İskandinav ülkelerinden izole edilen 22 suşun 14'ünün eritromisin direncine sahip olduğu bildirilmiştir (Scheel ve ark., 1993; Kılıç ve Yeşilyurt, 2011). Ülkemizden izole edilen iki suşun eritromisine dirençli olduğu belirtilmektedir (Gürcan ve ark., 2008).

2.7 Laboratuvar Tanısı

Yüksek aerosol bulaş potansiyeli nedeniyle *F.tularensis*'in izolasyon ve identifikasyonunu gerçekleştirecek laboratuvarlar minimum BGD-2 güvenlik standartına sahip olmalı ve tüm işlemler sınıf IIA biyogüvenlik kabini içinde yapılmalıdır (Sağlık Bakanlığı, 2005). *F.tularensis*'in kültür, antibiyogram ve biyokimyasal

testlerinin yapılması durumunda Dünya Sağlık Örgütü tarafından düzey 3 biyoemniyet kabini kullanılması önerilmektedir. Laboratuvarda meydana gelebilecek bulaşın önlenmesi için çalışan personelin maske, gözlük ve koruyucu elbiseler giymesi temel önlemlerdendir (WHO, 2007).

Tularemi hastalığının tanısı; etkenin izolasyonu, etkene ait antijenlerin saptanması, moleküler yöntemlerle bakteriye ait genetik yapıların gösterilmesi ve serolojik olarak antikorların gösterilmesi şeklinde konulmaktadır (Karadenizli, 2009).

Tulareminin serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılan direkt tanısı rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılabilmektedir. *F.tularensis* en sık laboratuvar enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmalardan birisi olup son derece bulaşıcıdır. Üremek için özel gereksinimleri olan nazlı bir bakteri olması nedeniyle kültürünün yapılması zordur (Karahana ve Kılıç, 2009).

Tanı için Alınacak Örnekler

Tularemi tanısı için hastadan alınacak örnekler klinik tabloya göre farklılıklar göstermektedir. Enfekte ülseri olan hastada, yaradan kazıntı ve sürüntü örnekleri alınır. Glandüler form gözükten olgularda lenf bezi biyopsileri, aspiratları veya akıntılı lezyonlardan sürüntü örnekleri alınarak laboratuvara ulaştırılmalıdır. Pulmoner tularemidde balgam, farengeal yıkama suyu, bronş yıkama suyu, transtrakeal aspirat, açlık mide aspiratı ve plevra mayii, ayrıca kan örnekleri alınabilir. Hastalardan serolojik tanı için akut ve konvalesan dönemlerde serum örnekleri alınmalıdır. Moleküler tanı amacıyla adı geçen klinik materyaller kullanılabilir (Karahana ve Kılıç, 2009).

Hastadan alınan örneklerin transportu amacıyla kömürlü Amies veya modifiye Thayer Martin besiyerleri tercih edilmektedir. Bu besiyerlerine alınan örneklerdeki bakterilerin yedi güne kadar canlılığını koruyabildiği bildirilmektedir (Karahana ve Kılıç, 2009).

2.7.1 Serolojik Tanı

F.tularensis'in çok virulan bir bakteri olması, laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilmesi ve kültür duyarlılığının %25 gibi düşük düzeylerde olması kültürün tanıda tercih edilmemesine neden olmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı tulareminin tanısında mikro aglütinasyon testi en sık kullanılan testtir (Gürcan, 2009a).

F.tularensis ile enfekte olan insanlarda spesifik IgM, IgG ve IgA antikorları semptomların başlangıcından 6-10 gün sonra aynı anda serumda belirmeye başlar.

Enfeksiyondan sonraki 1-2 ayda en yüksek seviyesine ulaşır ve en az 11 yıl saptanabilir düzeylerde kalır. IgG, IgM ve IgA sınıfı antikorlar ortalama 33 ila 41. günlerde en yüksek titreye ulaşmaktadırlar. IgM ve IgA sınıfı antikorlar 3-6 ayda belirgin olarak azalmakta IgG'ler ise yüksek düzeylerini korumaktadırlar (Koskela ve Salminen, 1985).

Antikor düzeylerinin uzun yıllar yüksek düzeylerde kalması eski ve yeni enfeksiyon ayırımında problemlere neden olabilmektedir. Eski ve yeni enfeksiyonların ayırımında tek bir antikor titresini ile yetinmeyip 1-2 hafta sonra alınacak yeni kan örneğinde 4 kat titre artışı olup olmadığı araştırılmalıdır (Gürcan, 2009a).

Antikorlar hastalığın başlangıcından itibaren 10-14 gün içerisinde oluşurlar ve mikroaglutinasyon testleri ile saptanabilecek düzeye gelirler. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) mikroaglutinasyon yönteminde $\geq 1:128$ titrede, tüp aglutinasyon yönteminde ise $\geq 1:160$ titredeki pozitifliği anlamlı kabul etmektedir (Ellis ve ark., 2002; WHO, 2007).

Serolojik tanıda mikroaglutinasyon testi en yaygın kullanılan tanı testidir (Bevanger ve ark., 1988). Türkiye'de yerli antijen ilk olarak 1936 yılında Trakya Bölgesinde meydana gelen tularemi salgınları sonrasındaki araştırmalarda üretilmiştir (Gotschlich ve Berkin, 1938). Ülkemizde yerli antijen olarak 1988 yılında Uludağ Üniversitesi'nde bir hastanın lenf bezi aspiratından izole edilen kökenden üretilen antijen ile Trakya Üniversitesi'nde 2005 yılında Bolu-Gerede'nin köylerinde hastalardan alınan lenf bezi aspiratlarından izole edilen *F.tularensis* kökenlerinden üretilen antijenler kullanılmaktadır (Gürcan, 2009b).

Tularemi tanısında immünfloresan yöntemler de kullanılabilir. İmmünfloresan yöntemlerin dezavantajları arasında çok sayıda örneğin çalışılmasında laboratuvar iş yükünü artırması, uzun yıllar önce geçirilmiş hastalıklarda daha düşük duyarlılıklara sahip olması ve çapraz reaksiyonlar sayılabilir (Gürcan, 2009b).

ELISA yöntemi fazla sayıda örneğin kolay ve hızlı şekilde çalışılması, uzun süre önce oluşan antikorların tespitinde daha duyarlı olması ve çapraz reaksiyon olasılığının daha düşük olmasından dolayı tercih edilmektedir (Bevanger ve ark., 1988; Gürcan, 2009b).

Brucella spp., *Escherichia coli* O:116 ve O:157, bazı *Salmonella* serotipleri, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., ve *Yersinia enterocolitica* serotip O:3 ve O:9'a karşı oluşan antikorlar, indirek immünfloresan veya aglutinasyon testlerinde *F.tularensis* ile çapraz reaksiyonlar verebilen başlıca mikroorganizmalardır (Bevanger ve ark., 1988; Porsch-Özcürümez ve ark., 2004).

2.7.2 Kültür

Tularemi tanısında kültür altın standart olarak kabul edilmektedir. Kültür çalışmaları enfeksiyonun kesin tanısının konmasını sağlar. Ayrıca yeni türlerin ve alt türlerin ortaya çıkarılması ile moleküler epidemiyoloji açısından önem taşımaktadır (Ellis ve ark., 2002; WHO, 2007).

F. tularensis zorunlu aerob bir bakteridir, ancak %5-10 CO₂ varlığında daha kolay üremektedir. Optimal üreme ısısı 35°C'dir. 28°C'de zayıf üremesi bu ısıda kolayca üreyebilen *Yersinia pestis*, *Francisella philomiragia* ve *F.tularensis subsp. novicidia*'dan ayırımında önemlidir (Kılıç, 2006).

F.tularensis subsp. tularensis, *F.tularensis subsp. holarctica* ve *F.tularensis subsp. mediaasiatica* yavaş üreyen nazlı bakterilerdir. Üremeleri için sistin, sistein ve tiyosülfat gibi kükürt içeren sülfidril bileşiklerine gereksinim gösterirler. *F.tularensis subsp. novicida* alt türü ve *F.philomiragia* türü diğerlerine göre daha kolay üreyen bakteriler olup koyun kanlı agar gibi genel kullanım besiyerlerinde ve diğerlerinin aksine %6 NaCl eklenmiş Nutrient Broth besiyerlerinde üreyebilirler (Winn ve ark., 2006; WHO, 2007) Sistein'e gereksinim göstermeden koyun kanlı agar gibi besiyerlerinde üreyebilen suşların varlığı da literatürde yer almaktadır (Bernard ve ark., 1994; Özel ve ark., 2010).

F.tularensis sıvı besiyerlerinde iyi üreyememektedir. Klinik örneklerde bulunabilecek bakterilerin yeniden canlandırılmasında, antibiyotik duyarlılık testlerinde sistin veya sistein eklenmiş Brain Heart Infusion Broth (BHI), Trypticase Soy Broth (TSB), Tiyoglikolat Broth ve Mueller-Hinton besiyerleri kullanılabilir (Kolaylı, 2009).

F.tularensis'in üretilmesinde; sistein-glukoz içeren kanlı agar (Francis besiyeri), %9 ısıtılmış koyun kanı eklenerek hazırlanan Cystein Heart Agar (CHAB), sisteinle zenginleştirilmiş çukulatamsı agar, Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE), %1 hemoglobin ile %1 IsoVitalax eklenmiş GC Agar Base II, Thioglycollate Glucose Blood Agar (TGBA) gibi zengin besiyerleri kullanılmaktadır. İlk izolasyonda yavaş ürerken (3-7 gün), pasajlarda 2-3 günde üremektedirler. CHAB besiyerinde 24-48 saatlik inkübasyondan sonra 2-4 mm büyüklüğünde yeşilimsi-beyaz, düzgün yüzeyli, yuvarlak, hafif mukoid şekilde koloniler gözlenmektedir. CHAB besiyerindeki üreme görünümü karakteristik olduğundan dolayı en sık kullanılan besiyerleri arasındadır. Floralı bölgelerden alınan örnekler antibiyotik eklenerek hazırlanmış besiyerlerine ekilmelidirler. Floralı ortamdaki bakteri izolasyonu olasılığını arttırmak için modifiye

Thayer-Martin besiyeri de kullanılabilir. Antibiyotik olarak hazırlanacak besiyerine litrede 7.5 mg kolistin, 2.5 mg amfoterisin, 0.5 mg linkomisin, 4.0 mg trimethoprim, 10 mg ampisilin olacak şekilde antibiyotik katılabilir (Kılıç, 2006; Kolaylı, 2009; WHO, 2007).

Çok küçük olması ve zayıf boyanması nedeniyle kültürden veya dokudan hazırlanan preparatlarda görülmesi son derece zordur. Bu nedenle hastalığın laboratuvar tanısında Gram boyamanın değeri sınırlıdır (Kılıç, 2006).

F.tularensis'in kontamine örneklerden izolasyonunda farelere inokülasyon yöntemi kullanılmaktadır. Fareler *F.tularensis* enfeksiyonuna oldukça duyarlı olup inokülasyondan sonraki 3-4 gün içerisinde hastalanırlar. Farelerin karaciğer ve dalaklarından uygun besiyerlerine ekimler yapılarak saf kültür halinde üretilmeleri mümkündür (WHO, 2007).

2.7.3 Moleküler Tanı ve Tiplendirme

Tularemi hastalığında etkenin bulaşıcı olması, kültür duyarlılığının düşük olması, etkene özgü antikörlerin genellikle hastalığın 2. haftasına kadar saptanamaması ve çapraz reaksiyonlar görülebilmesi tanıda sorunlara ve gecikmelere neden olmaktadır. Bu nedenle klinik ve çevresel örneklerde bakterinin moleküler yöntemlerle araştırılması gittikçe önem kazanmaktadır (Karadenizli, 2009).

Tularemi tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR ile hedeflenen başlıca gen bölgeleri; 17 kDa'luk dış membran lipoproteinlerini kodlayan Tul4 gen bölgesi, 43 kDa'luk dış membran proteinlerini kodlayan fop A gen bölgesi ve 16S rRNA gen bölgesidir. Tul4 gen bölgesi alt tür *tularensis* ve alt tür *holarctica* suşları arasında iyi korunmuş bir bölge olarak bilinmektedir (Karadenizli, 2009).

Konvansiyonel PCR'a göre daha hızlı ve daha duyarlı bir yöntem olan Real-Time PCR ile klinik örneklerde bakterinin varlığı 1-2 saat gibi kısa sürelerde tespit edilebilmektedir. Başlıca Real-time PCR yöntemleri arasında, 5' nükleaz assay (RT Taqman PCR), Hairpin problemleri, Hibridizasyon temelli rezonans enerji transfer problemleri, DNA'nın çift iplikliğine spesifik boyaların kullanılması sayılabilir (Karadenizli, 2009).

F.tularensis'in alt tür *tularensis* ve alt tür *holarctica* izolatlarının birbirinden ayrılmasında gliserol fermentasyonu, sitrülün üredaz aktivitesi, hayvan modellerindeki virülans özellikleri yanı sıra PCR temelli testler kullanılmaktadır (Karadenizli, 2009). RNA Helikaz geninde özel bir sekansta delesyon bulunması, IS*Ftu2* insertion sekans

elementinin olup olmaması, *pdpD* geni ve RD1 genindeki değişiklikler tespit edilerek iki alt türün birbirinden ayrılması mümkündür. İnsertion sekans geni olan *ISFtu2* geni alt tür *holarctica*'da bulunmasına rağmen alt tür *tularensis*'te bulunmamaktadır. *ISFtu2* geni varlığı bu açıdan alt tür ayırımında kullanılabilir. (Karadenizli, 2009).

F.tularensis subsp. holarctica'da RNA Helikaz'ı kodlayan gende devamlı olarak 30bp'lik bir delesyon bulunmaktadır. Bu genomik lokusu hedefleyen RT-PCR'da melting curve analizi ile her iki alt türün ayırımını yapmak mümkündür. Yöntemin dezavantajı ise alt tür ayırımının yalnızca kültürde izole edilmiş bakteriden yapılabilmesi klinik örneklerden yapılamamasıdır (Johansson ve ark., 2000).

2.8 Epidemiyoloji

Tularemi Kuzey yarımküreye özgü bir hastalık olup 30° - 71° enlemleri arasında bulunan ülkelerde görülmektedir (Şekil 2.1) (Ellis ve ark., 2002).



Şekil 2.1 Dünyada tulareminin endemik olarak görüldüğü bölgeler (koyu renkli alanlar) (Ellis ve ark., 2002)

Tularemi hastalığı hakkındaki epidemiyolojik bilgilerin büyük çoğunluğu hastalığın keşfinden sonraki on yıl içerisinde olmuştur. Hastalığın epidemiyolojisi tam olarak anlaşılammıştır ve *F.tularensis*'in yaşam döngüsü ile ilgili standart bir tanımlama mevcut değildir. Tularemi epidemiyolojisinin net olarak belirlenememesinin birinci nedeni *F.tularensis*'in birkaç yüz kilometrekarelik endemik bir bölgeye lokalize

olmasıdır. Komşu bölgelerde hastalığın insidansı çok düşük olabilmektedir. İkinci neden olarak ise *F.tularensis*'in bir bölgede bulunmasına rağmen aynı bölgede salgın görülmeyebileceği gerçeğidir. *F.tularensis*'in bazı bölgelerde endemik olarak bulunması enfeksiyon oluşumu için yeterli koşul değildir. Aktif enfeksiyon döngüsü için iklimsel koşullar gibi diğer bazı şartların da önceden oluşması gereklidir (Eliasson ve ark., 2006; Sjöstedt, 2007; Nigroviç ve Wingerter, 2008; Şahin, 2009).

Tularemi hastalığında karasal döngü ve su döngüsü olmak üzere iki farklı döngü tanımlanmaktadır. Karasal döngüde başlıca vektörler yabani tavşanlar, keneler ve bazı sinek türleridir. Su döngüsünde ise kunduz, misk sıçanı ve diğer sıçan türleri rol oynamaktadır. İnsan ise bu döngülerde organizma ile temas ederek organizmayı kazanan konak olarak tanımlanmaktadır (Mörner, 1992; Nigroviç Wingerter, 2008).

F.tularensis enfeksiyonu; lagomorflar, kemirgenler, insektivorlar, etobur hayvanlar, toynaklı hayvanlar, keseli hayvanlar, kuşlar, amfibiler, balıklar, omurgasız hayvanlar gibi çok çeşitli vahşi yaşam türünde gösterilmiştir (Şahin, 2009).

F.tularensis subsp. tularensis lagomorflar gibi belirli bazı memeliler için daha yüksek virülansa sahiptir. Oluşturduğu hastalık tabloları daha ağır seyreder ve mortalitesi daha yüksektir. Antibiyotik tedavisi yapılmayan olgularda mortalite %5-60 oranında değişmektedir. En fazla ülseroglandüler formda klinik tablolara yol açmaktadır (Şahin, 2009). *F.tularensis subsp. holarctica* alt türü daha çok Avrupa'da görülen tularemi olgularından sorumludur. Virülansı düşüktür ve nadiren ölümlere yol açmaktadır. Bu alt türün en sık neden olduğu klinik tablo ise orofarengeal formdur. Ülkemizde de daha çok orofarengeal formda tularemi olguları görülmektedir. (Dirik, 1939; Gürçan ve ark., 2004, 2006).

Tularemi Kuzey Amerika, Avrupa (özellikle Orta ve Kuzey Avrupa ile İskandinav ülkeleri), Çin ve Japonya'yı içerisine alan bir kuşakta genellikle sporadik olgular şeklinde zaman zaman da epidemiler şeklinde görülmektedir. Dünya'da yılda yaklaşık 500.000 tularemi olgusu olduğu tahmin edilmektedir (Ellis ve ark., 2002; Kılıç, 2005; WHO, 2007).

Kene, sinek ısırması ve avcılıkla ilgili olgular Haziran-Ağustos aylarında görülürken, su kaynaklı salgınlar daha çok kış ve ilkbahar aylarında görülmektedir (Penn, 2005; WHO, 2007).

Amerika kıtasında hastalık ABD, Meksika ve Kanada'da yaygındır. ABD'de hastalık Havai hariç tüm bölgelerde özellikle de Arkansas, Güney Dakota, Missouri ve

Oklahoma'dan bildirilmektedir. ABD'deki olguların %80'inin etkeni *F.tularensis subsp. tularensis*'tir (McChesney ve Narain, 1983).

ABD'de tulareminin insanlara bulaşmasında iki ana yol keneler ve tavşanlardır. Kene kaynaklı tularemi Missisipi'nin batısında özellikle de yaz aylarında görülmektedir. Missisipi'nin doğusunda ise hastalık genellikle kış aylarında tavşanlar gibi bazı hayvanlarla direkt temasla bulaşmaktadır. Tularemi insidansı özellikle Amerika Kızılderilileri ve Alaska yerlilerinde etkenle temas sıklığına bağlı olarak daha fazla izlenmektedir (CDC, 2002).

ABD'de tularemi olguları avlanmaya bağlı olarak Kasım ayından Şubat ayına kadar ve artropodların aktif olduğu Haziran ayından Eylül ayına kadar yoğunluk göstermektedir (Tarnvik ve Berglund, 2003).

Tularemi eski Sovyetler Birliği'nde İkinci Dünya savaşı süresince 100.000'in üzerinde olguya neden olmuştur (Eliasson ve ark., 2006). Rusya'da ve Kafkaslarda 1941-1942 yıllarında 167.000 olgu saptanmıştır (Sjöstedt, 2007). Rusya'da esas vektörler *Culex* ve *Anopheles* cinsi sivrisinekler ve *Ixodes* türü kenelerdir. Eski Sovyetler Birliği'nde aşı çalışmaları yapılmış ve ilk başarılı aşılama 1942 yılında gerçekleştirilmiştir (Sjöstedt, 2007). 1946-1960 yılları arasında yaklaşık 60 milyon kişi aşılanmıştır. Hastalıkla karşılaşan ve aşı yapılmamış kişilerde %4.3 olan tularemi görülme sıklığı aşılamayla %0.36'ya kadar indirilmiştir (Tarnvik ve Berglund, 2003).

Japonya'da enfeksiyonların çoğu ülkenin Kuzey doğusunda özellikle de lagomorflarla temas sonrası meydana gelmektedir. Japonya'da ayrıca kene kaynaklı enfeksiyonlar da rapor edilmektedir (Ohara ve ark., 1991,1996,1998). Japonya'da 1926 yılında Hachiro Ohara isimli araştırmacı tularemiye benzer klinik bulguları olan hastalığı bildirmiştir. Aynı araştırmacı enfekte tavşan dokusunu eşinin eli üzerine friksiyon yaparak sürmüş ve lenfadenopatilerden yapılan biyopsi ile *F.tularensis*'i izole etmiştir (Ohara, 1926). Japonya'da aşı çalışmalarına 1930'lu yıllarda başlanmıştır. 1924-1987 yılları arasında toplam 1335 olgu saptanmıştır. Hastalık 1950'li yıllara kadar artış gösterirken alınan tedbirlerle yıllık bildirim 10 olguya kadar gerilemiştir (Ohara ve ark., 1996; Tarnvik ve Berglund, 2003; Nigroviç ve Wingerter, 2008).

Tularemi İzlanda, Portekiz ve İngiliz adaları hariç tüm Avrupa'da görülmektedir. Güney ve Orta Avrupa'dan bildirilen olgular asıl olarak tavşan ve hamster gibi hayvanlar kanalı ile bulaşmaktadır. Bunun yanında kene kaynaklı, kontamine su ve yiyecek kaynaklı olgularda rapor edilmektedir (Tarnvik ve ark., 2004). Avusturya ve eski Çekoslovakya'dan kontamine şeker kamışı partiküllerinin inhalasyonuna bağlı

tularemi olguları bildirilmiştir (Cerny, 2001). Çek Cumhuriyeti'nde *Dermacentor reticulatus* ve *Ixodes ricinus* cinsi kenelerden, Avusturya'da ise *Dermacentor reticulatus* cinsi kenelerden *F.tularensis* izole edilmiştir (Hubalek ve ark., 1996,1998).

Tularemi hastalığı Almanya ve Danimarka'da nadir bir hastalıktır. Norveçte görülen tularemi vakalarının su kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Norveç'te 1975-1990 yılları arasında 105 tularemi olgusu bildirilmiştir. Danimarka'da ülseroglandüler tularemi olgusundan üretilen etkenin tip B olduğu ve Norveç'te izole edilen suşlarla yakın genetik ilişkisinin olduğu belirlenmiştir (Scheel ve ark., 1992; Byström ve ark., 2005).

Dünyada en yüksek tularemi insidansı İsvaç ve Finlandiya'nın bazı bölgelerinden rapor edilmektedir. İsveç'te hastaların çoğunluğu sivrisinek ısırması ile enfekte olmaktadır. Bunun yanında keneler ve *Hematopota pluvialis* türü sinekler ile de bulaş bildirilmektedir (Eliasson ve ark., 2002).

Günümüze kadar rapor edilen en büyük respiratuvar tularemi salgını 1966-1967 yıllarında Kuzey İsveç'te görülmüştür. Hayvanların beslenmesinde kullanılan samanların tarla fareleri tarafından kontamine edilmesi sonucu 600 çiftçide respiratuvar tularemi meydana gelmiştir (Dahlstrand ve ark., 1971; Syrjala ve ark., 1985; Nigroviç ve Wingerter, 2008).

Balkan yarımadasında çevre koşullarının insan sağlığını tehdit etmesi sonucu tularemi vakalarında son 10 yıl içerisinde artış görülmüştür (Sjöstedt, 2007; Nigroviç ve Wingerter, 2008). Kosova'da 1999-2000 yıllarındaki savaş ortamının kötü şartları nedeni ile tularemi vakalarında artış olmuştur. Kemirgenlerin su ve yiyecekleri kontamine etmesine bağlı olarak iki yıl içerisinde 327 tularemi olgusu bildirilmiştir. Enfeksiyon kaynağının ise fareler aracılığı ile kontamine olan su ve gıdalar olduğu bildirilmiştir. Etken olarak *F.tularensis subsp. holarctica* izole edilmiştir (Reintjes ve ark., 2002; Tarnvik ve Berglund., 2003; Gürcan, 2007).

Bulgaristan'da 1962 yılında Sreberna gölü çevresinde yakalanan Misk faresinden ilk tularemi suşu izole edilmiştir. Aynı bölgede 1997 yılında 4 olgu, 2004 ve 2005 yılının ilk çeyreğinde toplam 285 olgu Bulgaristan Sağlık Bakanlığı'na rapor edilmiştir. Hastaların tamamı orofarengiyal, oküloglandüler ve ülseroglandüler tularemi formlarının tipik kliniği ile seyretmiştir (Tarnvik ve Berglund, 2003).

Kontamine su içilmesine bağlı salgınlar özellikle Türkiye'den rapor edilmekte ve orofarinks tutulumu ile karakterize olan orofarengial form görülmektedir (Helvacı ve ark., 2000; Gürcan ve ark., 2004; Karadenizli ve ark., 2005; Meriç ve ark., 2008; Akalın

ve ark., 2009; Wilke ve ark., 2009). Bazı Avrupa ülkelerinde ve ülkemizde tularemi hastalığı uzun süre sessiz kaldıktan sonra epidemilerle tekrar ortaya çıkmaktadır (Akalin ve ark., 2009).

Tularemi hastalığının günümüzde artış göstermesi diğer bulaşıcı hastalıklarda da olduğu gibi insan nüfusunun artması, coğrafi alanlar arasındaki etkileşimin artması, karasal alanların kullanılmasında yaşanan değişim ve küresel ısınma ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Ayoğlu, 2009).

Laboratuvar çalışanları, çiftçiler, orman işçileri, ormanlık alanlarda yürüyüş yapanlar, bahçıvanlar, veteriner hekimler, avcılar, açıcılar ve kasaplar tularemi hastalığı için risk taşımaktadırlar (Nigroviç ve Wingerter, 2008).

F.tularensis dış ortam koşullarına oldukça dayanıklı olması, çok düşük sayıda bakterinin hastalığa neden olabilmesi (deri altından 10 ve akciğer yoluyla 10-50 bakterinin enfeksiyon oluşturabilmesi), kolay dağılabilmesi ve oluşturduğu klinik tabloların ciddiyeti nedeni ile tercih edilen biyolojik silah ajanları arasındadır (Kılıç, 2006).

DSÖ Uzmanlar Komitesi'ne göre, aerosol formdaki 50 kg virulan *F.tularensis* toz materyalinin 5 milyon nüfuslu kente havadan salınmasıyla 250.000 kişinin etkileneceği ve 19.000 kişinin öleceği hesaplanmıştır. Diğer bir öngöründe ise aynı miktar bakterinin 500.000 nüfuslu bir kentin üzerinde 2 km boyunca bir uçak tarafından salınması sonucunda 125,000 kişide tularemi gelişeceği 30.000 kişinin hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (Kılıç, 2006).

1930'lu yıllarda Japonya'da *F.tularensis* üzerinde biyolojik silah geliştirme çalışmaları yapılmıştır (Harris, 1992). İkinci Dünya savaşında Alman ve Rus askerler arasında görülen tularemi salgınının biyolojik silah kullanımı sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Isherwood ve ark., 2005).

F.tularensis 1940'lı ve 1950'li yıllarda ABD ve eski Sovyetler Birliği'nde biyolojik silah ajanı olarak geliştirilmiştir. Aerosol şekilde kolay yayılabilmesi ve yüksek enfektiviteye sahip olması *F.tularensis*'in A grubu biyolojik silah ajanları kategorisinde yer almasını sağlamaktadır (Dennis ve ark., 2001; Tarnvik ve Berglund, 2003).

ABD'de 1956 yılında Moskova'dan getirilen ve canlı bakteri içeren aşı suşu üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Hayvan modeli araştırmalarından sonra *F.tularensis* Live Vaccine Strain (LVS) aşısı üretilmiştir. Üretilen aşı ilk önce risk altındaki personellerin aşılama amacıyla kullanılmıştır. LVS aşısının Fort Detrick'te 1960

yılında kullanımından sonra; risk altındakilerde solunumsal tularemi insidansı 1000 kişide 5,7'den 0,27'ye düşmüştür. Ülseroglandüler tularemi insidansı değişmemiş ancak hastalığın seyri hafiflemiştir (Tarnvik ve Berglund, 2003; Gürcan, 2007; Nigroviç ve Wingerter, 2008).

Tularemi hastalığı temelde tavşan ve kemiricilerin hastalığıdır ve doğada fark edilmeyen enzootik odaklar şeklinde görülmektedir. Doğadaki ekolojik dengenin bozulması epidemilerin temel hazırlayıcısıdır ve hastalık ancak insanı etkilediğinde fark edilmektedir. Tularemi için 100'den fazla yabani ve evcil memeli türü, 25 kuş ve bazı sürüngen, kene ve sinek türleri rezervuar olarak kabul edilmektedir. Tüm bu bilgilere rağmen enfeksiyona neden olan bakteriyi barındıran hastalığın asıl rezervuarı (barındırıcı konağı) hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Ellis ve ark, 2002; WHO, 2007; Kılıç, 2009).

Türkiye'de Tularemi

Yapılan serolojik araştırmalara göre tularemi Trakya bölgesinde 1920'li yıllardan itibaren bulunmaktadır (Utku, 1954). Ülkemizde ilk tularemi olguları 1936 yılında Lüleburgaz askeri garnizonu ile Silivri, Çatalca ve Tekirdağ köylerinden münferit vakalar olarak saptanmıştır. Bu salgınlardan toplam 133'ü asker olmak üzere 150 kişinin etkilendiği bildirilmiştir (Gotschlich ve Berkin, 1938) . Daha sonraki yıllarda Konya ve Haymana'da sporadik olgular bildirilmiştir. 1938 yılında Bitlis ili Tatvan ilçesi Reşadiye beldesinde tavşan eti tüketilmesine bağlı olarak aynı aileden 6 kişide tularemi gözlenmiştir. Aynı bölgede tavşan eti tüketilmesine rağmen başka vakalara rastlanmamıştır. Yapılan araştırmada tularemi'nin insandan insana bulaşmadığı ve sinekler tarafından bulaştırılabileceği belirtilmektedir (Dirik, 1939).

Lüleburgaz'da 1945 yılında ikinci bir tularemi salgını ortaya çıkmış 15'i asker olmak üzere 18 kişi etkilenmiştir. Hastalığın ortaya çıkmasında Kaynarca deresinin rolü olduğu belirtilmektedir (Golem, 1945). Antalya ilinin Bademağacı köyünde 1953 yılında büyük çaplı bir tularemi salgını meydana gelmiştir. İki yüzden fazla olgunun saptandığı bu salgında, üstü açık bir şekilde köy çeşmesine gelen suyun kontamine olarak salgına neden olduğu öne sürülmüştür. Bu epidemide ortaya çıkan vakaların %8'inde tifoit tularemi tablosu tespit edilmiştir (Utku, 1954).

1988 yılında Bursa ili Karacabey harası ve Badırğa köyünde başlayan epidemi 2 yıl sürmüş ve 64 kişi bu salgından etkilenmiştir. Suna Gedikoğlu bu epidemideki 8 hastadan hastalık etkeni olan bakteriyi izole etmeyi başarmıştır (Gedikoğlu, 1996).

1988'den sonra Bursa ve çevresinde, Çanakkale ve Susurluk gibi yakın bölgelerde 1080 olgu saptanmıştır. Ankara-Ayaş'ta 1998 yılı içerisinde 16 olgu, Aralık 1999'da Samsun-Havza'da 34 olgu, Nisan 2000'de Yalova'da 22 olgu, Mayıs 2000'de Düzce'de 21 olgu, Ekim 2000'de Sinop-Yeşilyurt köyünde 27 olgu, Eylül 2001'de Gerede'de 14 olgu, 2004'te Zonguldak, Kastamonu ve Bartın'da 40 olgu bildirilmiştir. Aralık 2004-Mayıs 2005 arasında Kocaeli-Gölcük'te orofarengial formda 188 olgu saptanmıştır (Wilke, 2006; Gürcan, 2007).

Sivas İl Sağlık Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar Şubesi verilerine göre Sivas ilinde 2009 yılı içerisinde 19, 2010 yılı içerisinde 92, 2011 yılı içerisinde 199 ve 2012 yılının Ağustos ayına kadar 68 tularemi vakası tespit edilmiştir (Sivas Bulaşıcı Hastalıklar, 2012).

Tularemi salgınlarına 2005 yılı öncesinde Marmara ve Batı Karadeniz Bölgelerinde sıkça rastlanırken, 2009-2010 yıllarının ilk yarısından itibaren özellikle İç Anadolu Bölgesi ve diğer bölgelerden yeni vakalar bildirilmiştir (Sağlık Bakanlığı, 2011).

Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında 2000 yılından sonra ülkemizde görülen tularemi salgınlarının su kaynaklı olduğu görülmektedir. Bütün bu veriler: Marmara ve Karadeniz bölgesinde ağırlıklı olmak üzere ülkemizde *F.tularensis*'in endemik olarak bulunduğunu ve küçük salgınlara neden olduğunu göstermektedir. Sanitasyonu sağlanmış ve yeterli düzeyde klorlanmış şebeke suyu sağlanamaması, pınar, dere gibi açıktan akan su kaynakları ile temasın daha fazla olması, köy çeşmelerinin denetimsiz ve bakımsız olmaları nedeniyle ülkemizde tularemi epidemileri genellikle kırsal alanlarda görülmektedir (Kılıç, 2009).

Ülkemizde 1936-2005 yılları arasında görülen tularemi vakalarına ilişkin bilgiler Çizelge 2.3'de belirtilmiştir (Sağlık Bakanlığı, 2011).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2005 yılında 431, 2006 yılında 126, 2007 yılında 89, 2008 yılında 71, 2009 yılında 428 ve 2010 yılında 1531 tularemi vakası tespit edilmiştir. 2010 yılında Sağlık Bakanlığına bildirilen tularemi vakalarının %79.4'ü İç Anadolu ve Karadeniz Bölgelerinden bildirilmiştir (Maral ve ark., 2012).

Ülkemizde son yıllarda görülen tularemi vakalarındaki artış hastalığın bildirim zorunlu hastalıklar listesine alınmasına neden olmuştur. Tularemi hastalığı, 2005 yılında yürürlüğe giren Sağlık Bakanlığı "Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans Rehberi"nde Tularemi, Grup C hastalıklar içerisinde yer almaktadır (Sağlık Bakanlığı, 2005).

Ülkemizdeki salgınların mevsimsel özelliği incelendiğinde, 1988 öncesinde tüm epidemilerin yaz aylarında (Temmuz-Ağustos), 1988 sonrasında ise bahar ve kış aylarında (Eylül-Mayıs) ortaya çıktığı görülmektedir. Bu farklılık, bahar-kış aylarında yağışların artmasına ve buna bağlı olarak su kaynaklarının kirlenmesine bağlanmaktadır (Kılıç, 2005).

Kars bölgesindeki koyunlarda tularemi infeksiyonunun insidensi %0,14 olarak tespit edilmiş ve *Dermacentor spp.* cinsi kenelerden kültür yöntemiyle *F.tularensis* izole edilmiştir (Şeyda, 1996).

Ülkemizde 1930'lu yıllarda tularemi üzerine yapılan araştırmalarda fare kobay ve tavşanlara bakteri bulaştırıldığında hastalıktan ölenler olduğu gibi, hastalığı atlatanların da gözlendiği belirtilmektedir. Ayrıca hastalığa yakalanan hayvanların safra ve idrarları ile bakteriyi etrafa yaymalarının epidemiyolojik açıdan önemli olduğu belirtilmektedir (Tokgöz ve Golem, 1938).

Ülkemizde soğukkanlı hayvanlar üzerinde tularemi araştırılmasına yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Sait Bilal Golem tarafından yapılan çalışma sonuçlarına göre; *F.tularensis*'in karın içine enjeksiyonu sonucu yavru kaplumbağalarda ölümcül, erişkin kaplumbağalarda ise inaparan enfeksiyon meydana geldiği görülmüştür. Kurbağalarda ise ölümcül bir enfeksiyon meydana gelmektedir. Aynı çalışmada enfekte edilen kaplumbağa ve kurbağaların çıkartıları ile uzun süre bakteriyi etrafa yaydıkları, *F.tularensis* ile enfekte olan sulara yaşayan kurbağaların da enfekte olarak, meydana gelen inaparan enfeksiyon ile suların devamlı enfekte kaldığı belirtilmektedir (Golem, 1940).

Çizelge 2.3 1936-2005 yılları arasında ülkemizde bildirilen tularemi salgınları (Sağlık Bakanlığı, 2011)

Yıl	Bölge	Vaka	Mevsim	Bulaşma
1936	Lüleburgaz	150	Yaz	Su kaynaklı
1937	Tatvan	6		Gıda
1945	Lüleburgaz	18	İlkbahar	Su kaynaklı
1953	Antalya	200	Sonbahar	Su kaynaklı
1988 - 2002	Bursa	205	Kış	Su kaynaklı
1997	Ankara	16	Kış	Su kaynaklı
2000	Düzce	21	Sonbahar	Su kaynaklı
2001	Bolu	14	Sonbahar	Su kaynaklı
2002	Balıkesir	115	Kış	Su kaynaklı
2004	Suluova	43	Sonbahar	Su kaynaklı
2004 - 2005	Zonguldak	61	Kış	Su kaynaklı
2004 - 2005	Kocaeli	145	Kış-ilkbahar	Su kaynaklı
2004 - 2005	Kars	56	Kış-ilkbahar Sonbahar	Su kaynaklı
2005	Kocaeli	129	Kış	Su kaynaklı
2005	Tokat	8	Kış	Su kaynaklı
2005	Edirne	10	Kış	Su kaynaklı
2005	Düzce	11	Kış	Su kaynaklı

2.9 *Acanthamoeba* Cinsi Amipler

Doğada toprak, hava ve su gibi çevrelerde özgür olarak yaşayan çeşitli amip cins ve türleri bulunmaktadır. İstemli ya da fırsatçı patojen olarak tanımlanan bu amiplerden insanlarda enfeksiyon oluşturanlar *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Vahlkampfia* ve *Sappinia* cinsleri içerisinde yer almaktadırlar (Saygı ve Polat, 2003; Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).

Toprakta ve tatlı sularda özgür olarak yaşayan amipler insanlarda başlıca primer amibik meningoensefalit (PAME) ve granülamatoz amibik meningoensefalit (GAE) olarak isimlendirilen ivergen ve süregen enfeksiyonlara neden olmaktadır (Saygı ve Polat, 2003; Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).

Acanthamoeba cinsi amipler 1913 yılında Puschkarew tarafından toz örneklerinden izole edilmiş ve *Amoeba polyphagus* ismi verilmiştir. 1930 yılında Castellani tarafından *Cryptococcus pararoseus* kültürlerinden izole edilen amipler

Acanthamoeba castellanii olarak isimlendirilmiştir. *Acanthamoeba* cinsi amiplerin sınıflandırılması ise 1931 yılında Volkonsky tarafından yapılmıştır (John, 1998; Visvesvara ve ark., 2007).

Doğada yaygın olarak bulunmaktadırlar. Toprakta, tozlardan, havadan, kaplıca sularından, deniz suyundan, yüzme havuzlarından, lağım sularından, çamurdan, çeşme sularından, diş tedavi ünitelerinden, diyaliz ünitelerinden, bakteri, maya ve hücre kültürlerinden, bitkilerden, hayvanlardan, sağlıklı insanların burun ve boğazlarından, kontakt lenslerden, lens saklama kaplarından, lens temizleme solüsyonlarından, dışkıdan, infekte hastaların beyin ve akciğer dokusundan, deri lezyonlarından ve korneal dokulardan izole edilmişlerdir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).

Acanthamoeba cinsi amiplerin yaşam döngüsünde iki dönem ayırt edilmektedir. Birinci dönem aktif olarak beslenen, büyüyen, çoğalan ve hareket eden trofozoit formu, ikinci dönem ise dış çevre koşullarına daha dayanıklı olan kist formudur (Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).

Acanthamoeba trofozoitlerinin büyüklükleri 25–56 µm arasında değişiklik göstermektedir. Genellikle yavaş olan hareketlerini, parmak şeklinde olan lobopod ve akantopod (*acanthopodium*) denilen dikensi yalancı ayaklar ile sağlarlar (Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).

Acanthamoeba kistlerinin büyüklükleri 13–20 µm arasında değişiklik göstermektedir. Kistler, tek çekirdekli ve yuvarlak olup çeperleri endokist ve ektokist denilen iki tabakadan meydana gelmektedir. Genellikle dış tabaka hafifçe kıvrık, iç tabaka ise polihedral bir görünümdedir (John, 1998; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Saygı ve Polat, 2003; Akın Polat ve ark., 2007).

Günümüzde *Acanthamoeba* cinsi amiplerin morfolojik yapıları göz önüne alınarak 24'ten fazla türü tanımlanmıştır. Morfolojik yapı ve kist büyüklüklerine göre 3 grup altında incelenmektedirler (Khan, 2006).

Grup I'de bulunan *A. astronyxis*, *A. commandoni*, *A. echinulata*, *A. pearcei* ve *A. tubiashi* türleri diğer gruplardaki türlerden daha büyük kistlere sahiptirler. Ektokist ile endokist arasında oldukça belirgin bir şekilde görülen açıklık vardır ve yıldız şeklindeki endokist, uçlardan ektokistle bağlantılıdır (Khan, 2006).

Grup II'de bulunan *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. guina*, *A. rhysodes*, *A. stevensoni*, *A. triangularis* gibi türlerde ektokistler buruşuk bir görünümde iken endokist yıldız, poligonal, üçgen veya oval şekilde olabilmektedir (Khan, 2006).

Grup III'deki *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, *A. royreba* türlerinin kistleri küçüktür, kist duvarı ince ve düz bir yapıdadır ve ektokist düz çeperi ile endokisti çevrelemektedir. Ektokist ile endokist arasındaki mesafe birbirine çok yakındır. (John, 1998; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).

Acanthamoeba türleri insan vücudunda başlıca merkezi sinir sistemi ve göze yerleşerek enfeksiyon oluştururlar. Merkezi sinir sistemine yerleşerek primer amibik meningoensefalit (PAME) adı verilen enfeksiyona neden olmakta ayrıca çeşitli yollarla göze bulaşarak keratit oluşturmaktadırlar. Dokularda hem trofozoit hemde kist halinde bulunabilen bu amipler ayrıca insanlarda deri, mukoza, akciğer ve toraksta yerleşebilmektedirler (John, 1998; Saygı ve Polat, 2003; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Khan, 2006).

Acanthamoeba cinsi amipler genellikle çevrede bulunan bakteri, alg ve mantar gibi katı maddeleri fagositoz ile, sıvı ortamda erimiş halde bulunan besinleri ise pinositoz ile hücre içerisine alarak beslenmektedirler (John, 1998; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Greub ve Raoult, 2004; Khan, 2006).

Acanthamoeba cinsi amiplerin çevresel ve klinik örneklerden izole edilmesinde en sık kullanılan yöntem besleyici değeri olmayan agar yüzeyine amiplerin beslenebilmesi için *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* gibi Gram negatif bakterilerden sürülerek oluşturulan kültür ortamıdır. Üzerine bakteri sürülmüş besleyici değeri olmayan agar plaklarına klinik ve çevresel örneklerden inoküle edilerek 30 °C'de inkübasyona bırakılmaktadır. Plaklar mikroskop altında incelendiğinde *Acanthamoeba* kist ve trofozoitleri tipik görünümleri ile kolayca tanımlanabilmektedir. Plaklar 7 gün boyunca amiplerin varlığı yönünden incelenmelidir (Khan, 2006).

Acanthamoeba cinsi amiplerin aksenik olarak üretilmesinde Proteose Pepton Yeast Extract Glucose Broth (PPYG) besiyeri kullanılmaktadır (Schuster, 2002).

2.9.1 *Acanthamoeba* Cinsi Amipler ile Bakteri İlişkileri

Özgür yaşayan amipler buldukları ortamdaki bakteri, alg ve mantarları fagositozla hücre içine alarak sindirmektedirler. İntrasellüler yaşama alışkanlığındaki çok sayıda mikroorganizma değişik mekanizmalarla amipler içerisinde çoğalmakta ve yaşamlarını devam ettirmektedirler. Amipler içerisinde canlı kalan ve yaşamlarını devam ettiren bu bakteriler amiplere dirençli bakteriler (Amoeba Resistant Bacteria (ARB)) olarak adlandırılmaktadır (Greub ve Raoult, 2004).

Amiplere dirençli bakterilerden *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli* O157, *Francisella tularensis*, , *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae* ve *Mycobacterium avium* gibi bakteriler özgür yaşayan amipler içerisinde canlı kalarak yaşamlarını devam ettirebilmektedirler (Greub ve Raoult, 2004).

Legionella ve *Listeria* gibi amiplere dirençli bakterilerden bazıları amipler içerisinde çoğalmakta ve amip hücrelerini parçalayarak ortamda serbest kalmaktadırlar. Amiplere dirençli bakteriler ile enfekte amip kistleri bakterileri klor ve dezenfektanların etkisinden korumaktadır (Barker ve Brown, 1994).

Özgür yaşayan amipler doğada çok çeşitli ortamlardan izole edilmiş olup doğal sularda da yaygın olarak bulunmaktadır (Martinez ve Visvesvara, 1997; Khan, 2006). Sularda serbest olarak yaşayan amipler ve bakteriler arasında kompleks bir etkileşimin olduğu bilinmektedir. *Acanthamoeba* cinsi amipler *Legionella*, *Chlamydia* ve *Mycobacterium* türleri gibi birçok hücre içi patojen mikroorganizma için çevresel konak olarak görev yapmaktadırlar (Amann ve ark., 1997; Neumeister ve ark., 1997; Steinert ve ark., 1998).

F.tularensis hücre içi bir bakteri olup suda serbest yaşayan protozoonlar dahil bir çok canlıda yaşayabilmektedir. *F.tularensis* deneysel şartlarda protozoonlar içerisinde çoğalabilmektedir. Bu durum bakteri için kısa süreli üreme ortamı oluşturmaktadır ve protozoonların *F.tularensis* için doğal rezervuar olabileceği belirtilmektedir (Berdal ve ark., 2000; Abd ve ark., 2003; Sağlık Bakanlığı, 2011).

Fakültatif intrasellüler bir bakteri olan *F.tularensis*, su kaynaklarında serbest olarak yaşayan bir amip olan *Acanthamoeba castellanii* içerisinde yaşamını sürdürebilmektedir ve bu simbiyotik yaşam bakterinin sularda ve çamurda aylarca canlı kalmasını sağlamaktadır. *F.tularensis*'in *A.castellanii* trofozoitlerinin içerisindeki vokuollerde, dışarı salınan veziküllerde ve kistlerin içerisinde canlı kalabildiği ve çoğalabildiği gösterilmiştir (Kantardjiev ve Velinov, 1995; Abd ve ark., 2003; Greub ve Raoult, 2004).

F.tularensis'in farklı köken ve alt türlerinin *Acanthamoeba castellani* içerisine değişik oranlarda alındığı ve amip içerisinde çoğaldığı belirtilmektedir. Ayrıca *Acanthamoeba castellani*'nin patojen *F.tularensis* kökenleri ile enfekte edilmesinden sonraki 30 dakika içerisinde amibin hücre içi veziküllerinde bulunduğu tespit edilmiştir. *Acanthamoeba castellani* kistlerinden 21 gün sonra canlı bakteri elde edilebildiği bildirilmektedir (El-Etr ve ark., 2009).

F.tularensis ve *A.castellani*'nin birlikte kültürünün yapılması durumunda intrasellüler bakterilerin üç haftadan daha uzun bir süre canlılıklarını koruyabildikleri görülmüştür. *F.tularensis*'in tek başına kültürünün yapılması durumunda ise iki hafta içerisinde ortamda canlı bakterinin kalmadığı belirtilmektedir (Abd ve ark., 2003).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Örneklerin Toplanması

Çalışmamızda Haziran 2011-Mart 2012 tarihleri arasındaki 10 aylık dönemde Sivas ilinin ilçe, belde ve köylerinden alınan 300 adet su örneği incelemeye alınmıştır.

Sivas Sağlık Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar Şubesinde alınan bilgiler doğrultusunda ilimizde tularemi olgusu görülen bölgeler belirlenmiştir. Tularemi olgusu görülen bölgelerden 200 adet su örneği, tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden ise 100 adet su örneği alınarak çalışmamızda kullanılmıştır.

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan su örnekleri; Haziran 2011-Mart 2012 tarihleri arasında tularemi olgularının görüldüğü Merkez ilçe, Gemerek, Gürün, Şarkışla, Suşehri, Yıldızeli ve Zara ilçeleri olmak üzere 7 ilçeye bağlı 29 yerleşim yerinden alınmıştır. Su örnekleri 2 litrelik plastik şişelere alınarak soğuk zincir yolu ile laboratuvara ulaştırılmıştır.

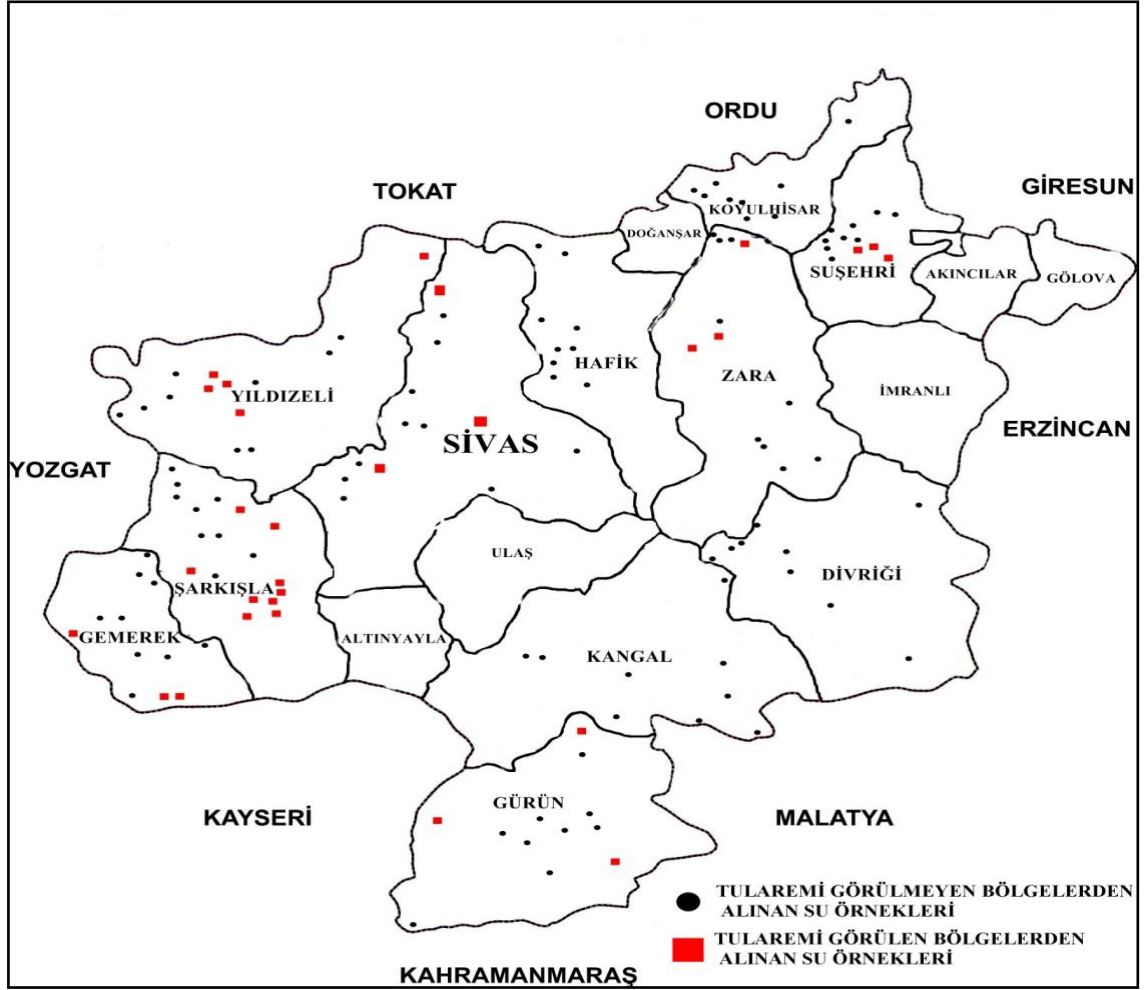
Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan su örnekleri; Haziran 2011-Mart 2012 tarihleri arasında Merkez ilçe, Gemerek, Gürün, Şarkışla, Suşehri, Yıldızeli, Zara, Kangal, Divriği, Hafik ve Koyulhisar ilçeleri olmak üzere 11 ilçeye bağlı 100 köyden alınarak Sivas İl Halk Sağlığı Laboratuvarına analiz amacıyla gönderilen sulardan seçilmiştir.

Su deposunda toplanarak şebeke sistemi ile dağıtımı yapılan su örnekleri şebeke suyu, belirli bir kaynaktan çıkan ve şebeke sistemi olmadan tek bir noktadan kullanıma verilen köy çeşmeleri ve pınar sularından alınan örnekler kaynak suyu olarak adlandırılmıştır.

Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan su örnekleri 1-100 arası numaralandırılmış, tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan su örnekleri ise T1-T200 arası numaralandırılmıştır. Su örneklerinin alındığı bölgelerin listesi EK-1 ve EK-2'de belirtilmiştir.

Su örneklerinin alınması sırasında komparatör cihazı yardımı ile serbest bakiye klor ölçümleri yapılmıştır. Yalnızca Sivas Merkez Yenidoğan Mahallesinden alınan T37 nolu su örneğinde 0.5 mg/L düzeyinde klor bulunduğu tespit edilmiştir. Köy muhtarları ile yapılan görüşmelerde içme ve kullanma sularının düzenli klorlanmadığı bilgisine ulaşılmıştır.

Örneklerin alındığı bölgelerin il genelinde dağılımı Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1 Örneklerin alındığı bölgelerin il genelinde dağılımı

3.2 Çalışmada Kullanılan Alet, Ekipman ve Malzemeler

1. 0.20 µm Por Çaplı Sellüloz Nitrat Membran Filtre (Sartorius 11407-47-ACN)
2. *Acanthamoeba* Primerler
3. Agar (Agar No:1, OXOID L11)
4. Agaroz (Biomax 104514PR)
5. Alkol (% 96'lık)
6. BCYE Agar (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) (Acumedia 7728A)
7. Binoküler Işık Mikroskobu (HAMILTON BLP 2000)
8. Biyogüvenlik kabini Sınıf II (Bilser BLF2000)
9. Brain Heart Infusion Agar (LAB M, LAB 48)
10. D (+) Glukoz (Merck 8337)
11. Desikatör
12. DNA Ladder (100 bp) (Solis Biodyne, 07-11-00050)

13. Elektroforez Tankı (E-C Apparatus Corporation, E-C MIDICELL[®] PRIMO EC330)
14. Ependorf Tüpü (1.5 ml) (ISOLAB 078.03.002)
15. Ependorf Tüpü (2 ml) (ISOLAB 078.03.004)
16. Etidium Bromide (SIGMA-ALDRICH E8751)
17. Etüv (Nüve EN500)
18. FJTaQ DNA Polymerase (500 U, 5U/μl)(Genoks-261111)
19. Glucose Cystein Blood Agar (GCBA)
20. *Francisella tularensis* Antiserum (BD 240939)
21. Gel Loading Solution (6x) (SIGMA G 7654)
22. Güç Kaynağı (E-C Apparatus Corporation, E-C 1000-90)
23. *Helicobacter pylori* Selective Supplement (Dent) (OXOID SR0147E)
24. Jel Görüntüleme Sistemi (Vilbert Lourmat Photodocumentation and Imaging Systems)
25. L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate (MERCK 1028390025)
26. *Legionella* (GVPC) Selective Supplement (OXOID SR0152E)
27. Membran Filtrasyon Sistemi (Sartorius 16831)
28. Mikrodalga Fırın (Beko MD 1500)
29. Mikropipet (100-1000 μl) (BRAND Transferpette[®]S 704780)
30. Mikropipet (1-10 μl) (BRAND Transferpette[®]S 704770)
31. Mikropipet (20-200 μl) (BRAND Transferpette[®]S 704778)
32. Mikrosantrifüj (Nüve NF1200)
33. Nuclease Free Water (Metis G104)
34. Nükleotides dNTP set (dNTP set, 100 mM, 4x0.25 ml) (VIVANTIS NP2406)
35. PCR Tüpü (0.2 ml) (THERMO SCIENTIFIC AB-0620)
36. Penicillin G Sodium Salt (C₁₆H₁₇N₂NaO₄S)(≈ 1600 U/mg) (ROTH CN28.2)
37. Pipet Uçları (Fitreli, DNaz, RNaz Free) (10,20,200,1000 μl)(NEPTUNE)
38. QIAmp[®] DNA Minikit (QIAGEN 51304)
39. RD1 Primerler
Forward: (5'-TTT ATA TAG GTA AAT GTT TTA CCT GTA CCA-3')
Reverse: (5'-GCC GAG TTT GAT GCT GAA GA-3')
40. Stereo mikroskop (Hund Wetzlar)
41. TBE Buffer (10x Powder) (BIO BASIC A0024)
42. Thermal Block (Wealtec HB-1)

43. Thermal Cycler (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems)

44. Tul4 Primerler

Tul4-435 (5'-GCT GTA TCA TCA TTT AAT AAA CTG CTG-3')

Tul4-863 (5'-TTG GGA AGC TTG TAT CAT GGC ACT-3')

45. Vakum Pompası (Sartorius 16612)

46. *Acanthamoeba* Primerler

Forward: JDP1 (5'- GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3')

Reverse: JDP2 (5'- TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA-3')

3.3 Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Brain Heart Infusion Agar (LAB M , LAB 48)

Brain-Heart Infusion Solids (porcine)	17.5	g/L
Tryptose	10.0	g/L
Glucose	2.0	g/L
Sodium chloride	5.0	g/L
Disodium phosphate	2.5	g/L
Agar No2	12.0	g/L

Final pH: 7.4 ± 0.2 25 °C'de

24.5 gram Brain Heart Infusion Agar tartılarak üzerine 420 mililitre distile su eklendi ve kaynayan su banyosunda eriyinceye kadar bekletildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika bekletilerek steril edildi.

D (+) Glukoz (Merck 8337)

5 gram Glukoz tartılarak steril plastik kap içerisine aktarıldı. Üzerine 20 ml steril distile su eklenerek çözünmesi sağlandı.

L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate (MERCK 1028390025)

0.5 g L-Cysteine tartılarak 10 ml'lik enjektör içerisine aktarıldı. 5 ml steril distile su enjektörle aspire edildi ve L-Cystein'in çözünmesi sağlandı.

Penicillin G Sodium Salt (C₁₆H₁₇N₂NaO₄S)(≈ 1600 U/mg) (ROTH CN28.2)

47 mg Penicillin G hassas terazide tartılarak steril 10 ml'lik enjektör içerisine aktarıldı. 5 ml steril distile su enjektörle aspire edildi ve Penicillin G'nin çözünmesi sağlandı.

***Helicobacter pylori* Selective Supplement (Dent) (OXOID SR0147E)**

Vancomycin	5.0 mg
Trimethoprim	2.5 mg
Cefsulodin	2.5 mg
Amphotericin B	2.5 mg

2 ml steril distile su şişe içerisinde bulunan *Helicobacter pylori* Selective Supplement üzerine eklendi ve çözünmesi sağlandı.

***Legionella* (GVPC) Selective Supplement (OXOID SR0152E)**

Glycine (Ammonia free)	1.5 g
Vancomycin hydrochloride	0.5 mg
Polymyxin B sulphate	40000 IU
Cycloheximide	40.0 mg

10 ml steril distile su şişe içerisinde bulunan *Legionella* (GVPC) Selective Supplement üzerine eklendi ve çözünmesi sağlandı.

Glucose Cystein Blood Agar (GCBA) Besiyerinin Hazırlanması

Otoklavdan çıkarılan Brain Heart Infusion Agar besiyerinin 55 °C'ye kadar soğuması beklendi. Brain Heart Infusion Agar besiyerinin içerisine son konsantrasyonda %1 olacak şekilde Glukoz, %0.1 olacak şekilde L-Cystein ve %9 olacak şekilde taze insan kanı eklendi.

Kontaminasyonu ve diğer bakterilerin üremesini engellemek amacıyla 500 ml besiyeri içerisine 1 şişe *Helicobacter pylori* Selective Supplement, 1 şişe *Legionella* (GVPC) Selective Supplement ve 150 U/ml olacak şekilde Penicillin G eklendi. İnsan kanı dışındaki bileşenler, 0.20 µm çaplı selüloz nitrat, enjektör ucuna takılabilen filtrelerden süzülerek besiyerine eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile eklenen bileşenlerin iyice karışması sağlandı ve hazırlanan besiyeri 90 mm çaplı petri plaklarına 10-15 ml olacak şekilde dağıtıldı.

Besleyici Değeri Olmayan Agar (BDOA) (Agar No:1, OXOID L11)

15 gram agar tartıldı ve üzerine 1000 ml distile su eklendi. Karıştırıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. 50 °C'ye kadar soğuması beklendi ve 90 mm çaplı petri plaklarına 10-15 ml olacak şekilde dağıtıldı. Hazırlanan %1.5'lik agar plakları bir gece oda ısısında bekletilerek yüzeylerinin kuruması sağlandı.

Acanthamoeba cinsi amiplerin su örneklerinden izole edilmesi amacıyla üzerine *Escherichia coli* sürülmüş olan %1.5'lik besleyici değeri olmayan agar (BDOA) plakları kullanıldı. Koyun kanlı agar'da üretilen *E.coli*, eküvyon çubuk yardımı ile alınarak %1.5'lik agar plaklarının yüzeylerine sürüldü.

BCYE Agar (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar) (Acumedia 7728A)

Yeast Extract	10	g/L
ACES Buffer	10	g/L
Charcoal, Activated	1.5	g/L
α -Ketoglutarate	1	g/L
Ferric Pyrophosphate	0.25	g/L
Agar	15	g/L

Final pH: 6.9 ± 0.2 25 °C'de

38 gram besiyeri tartılarak üzerine 900 ml distile su eklendi. Besiyeri pH'sı 1N KOH ile 6.9 olacak şekilde ayarlandı. Hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Kaynayan su banyosunda eriyinceye kadar bekletildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 50 °C'ye kadar soğutuldu. İçerisine % 0.1 konsantrasyonda olacak şekilde L-Cystein eklendi. 90 mm çaplı petri plaklarına 10-15 ml olacak şekilde dağıtıldı.

Etidyum Bromür Çözeltisi (5 mg/ml)

Toz halde bulunan Etidyum Bromürden 50 mg tartıldı. 10 ml distile suda manyetik çalkalayıcı kullanılarak 1 saat boyunca çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti renkli şişeye aktarıldı ve etrafı alüminyum folyo ile kapatıldı.

Kontrol Çalışması

Hazırlamış olduğumuz Glucose Cystein Blood Agar (GCBA) ve Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) besiyerleri Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Tularemi Referans Tanı Laboratuvarı'nda kontrol edildi. Tularemi Referans Tanı Laboratuvarı'nda üretilmiş *F.tularensis* suşlarından GCBA ve BCYE agar besiyerlerine ekimler yapıldı. Hazırladığımız besiyerlerinin çalışmamız için uygun olduğu görüldü.

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen *Acanthamoeba polyphaga*, BDOA plaklarının ve BCYE besiyerinin

kontrolü amacıyla kullanıldı. Yapılan kontrol çalışmalarında üzerine *E.coli* sürülmüş BDOA plaklarında ve BCYE agar besiyerinde amiplerin üredikleri gözlemlendi.

3.4 Su Örneklerinin Filtre Edilmesi

2 litrelik plastik şişelere alınan su örnekleri soğuk zincir kurallarına uyularak laboratuvara ulaştırıldı. Su örnekleri 0.20 µm çaplı selüloz nitrat membran filtrelerden geçirilerek süzüldü. Filtre kağıtları steril bisturi yardımı ile ortadan ikiye kesildi. Kesilen filtrenin yarısı GCBA besiyeri üzerine bırakılarak *F.tularensis* kültüründe kullanıldı. Filtrenin diğer yarısı ise *Acanthamoeba* cinsi amiplerin üretilmesi ve DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı. Bu amaçla filtrenin diğer yarısı; içerisine süzülen su örneğinden eklenmiş 2 ml'lik ependorf tüplerine alındı. 2 ml'lik ependorf tüpleri DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20 °C'de bekletildi.

3.5 Su Örneklerinden *F.tularensis* İzolasyonu

Üzerine filtre konulmuş olan GCBA besiyerleri desikatör içerisinde 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Desikatör içerisinde renksiz ve kokusuz mum yakılarak % 5–10 CO₂ 'li ortam oluşması sağlandı.

F.tularensis ilk izolasyonunda yavaş üreyen bir bakteri olduğundan filtre içeren besiyerleri 3. günden itibaren stereo mikroskop altında incelemeye alındı. Yeterli ışık sağlanması amacıyla üstten ve yandan, beyaz ışık veren lambalar kullanıldı. Stereo mikroskopta yapılan incelemede 2-3 mm çapında saydam, pürüzsüz, düzgün yüzeyli, yeşilimsi beyaz, yuvarlak, hafif mukoid kolonilerin *F.tularensis* kolonileri olabileceği düşünüldü. Şüpheli koloniler öze yardımıyla filtre üzerinden alınarak GCBA besiyerine aktarıldı ve desikatör içerisinde 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

2 günlük inkübasyondan sonra şüpheli kolonilerden öze ile alınarak lam üzerinde aglütinasyon testi yapıldı. Aglütinasyon testi için *F.tularensis* antiserumu kullanıldı (BD 240939). Lam üzerine 10 µl serum fizyolojik ve 10 µl antiserum konuldu. Öze ile besiyerinden alınan koloniler serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi ve antiserum ile karıştırıldı. Kısa sürede yoğun aglütinasyon verip vermediği gözlemlendi. Ayrıca şüpheli kolonilerden alınarak katalaz ve oksidaz testleri uygulandı.

Aglütinasyon testinde yoğun aglütinasyon gösteren, katalaz pozitif, oksidaz negatif bakterilerden DNA izolasyonu yapıldı. PCR çalışması yapılmaya kadar DNA örnekleri -20 °C'de bekletildi.

Su örneklerinin süzöldüğü filterleri içeren tüm besiyerleri 10. güne kadar etüvde bekletildi. 10. gün yapılan incelemede şüpheli koloniye rastlanmaması durumunda besiyerleri otoklavda 121 °C’de 15 dakika bekletilerek steril edildi ve tıbbi atığa atıldı.

F.tularensis’in solunum yolu ile bulaşabilen tehlikeli bir bakteri olması nedeniyle koruyucu elbise, eldiven, maske, gözlük gibi koruyucu ekipmanlar kullanıldı. Besiyerlerine ekim yapılması, aglütinasyon, katalaz ve oksidaz deneyleri gibi tüm işlemler sınıf II biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.

3.6 Su Örneklerinden *Acanthamoeba* Cinsi Amiplerin İzolasyonu

Acanthamoeba cinsi amiplerin su örneklerinden izole edilmesi amacıyla Üzerine *E.coli* sürölmüş olan %1.5’lik besleyici değeri olmayan agar (BDOA) plakları kullanıldı. Koyun kanlı agar’da üretilen *E.coli*, eküvyon çubuk yardımı ile alınarak %1.5’lik agar plaklarının yüzeylerine süröldü. BDOA plakları ekim için hazır hale getirilmiş oldu.

İçerisinde filtre bulunan 2 ml’lik ependorf tüpleri vorteks ile 5 dakika boyunca karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 2 ml’lik ependorf tüpünden 100 µl alınarak üzerine *E.coli* sürölmüş BDOA plakları üzerine eklendi. BDOA agar plakları 24 °C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Plaklar 1. günden itibaren ışık mikroskobunda 10’luk objektif ile incelemeye alındılar. 15 gün boyunca yapılan incelemede *Acanthamoeba* trofozoit ve kistleri görölmemesi durumunda plaklar atıldı.

BDOA plaklarının incelenmesinde amipler, sadece trofozoitlerin bulunduğu erken dönemde kontraktıl vakuollerinin ve çekirdeklerinin görünümlüyle, ilerleyen dönemlerde ise tipik kist görünümlüleriyle ayırt edildiler.

Agar plaklarında yıldız, üçgen, poligonal veya oval şekilli kistlerin göröldüğü bölgeler işaretlendi. İşaretli bölgeler lanset yardımı ile kesilerek alındı ve üzerine *E.coli* sürölmüş yeni bir BDOA plağının ortasına ters yüz edilerek bırakıldı. BDOA agar plakları 24 °C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. BDOA plakları ertesı günden itibaren ışık mikroskobunda 10’luk objektif ile incelemeye alındılar. Günlük yapılan incelemelerde *Acanthamoeba* cinsi amiplerin 3. günden itibaren kistleşmeye başladıkları gözlemlendi.

3.7 *Acanthamoeba* spp. ile *F.tularensis* Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Çalışmamızda su örneklerinde *F.tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amipler arasındaki ilişkinin araştırılmasında;

- a) Su örneklerinden BDOA ortamında izole edilen *Acanthamoeba* cinsi amiplerin BCYE besiyerine aktararak kültürlerinin yapılması ve *F.tularensis* üretilmeye çalışılması
- b) Su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* cinsi amiplerden DNA izolasyonu yapılarak PCR ile *F.tularensis* varlığının araştırılması kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Abd ve ark. (2003), *F.tularensis*'in *Acanthamoeba castellanii* içerisindeki intrasellüler vokuollerde çoğaldığını ve amip hücrelerini parçaladığını, El-Etr ve ark. (2009) ise *A.castellanii* kistlerinden 21 gün sonra canlı *F.tularensis* elde edilebildiğini bildirmektedirler. Penland ve Wilhelmus (1997), *Acanthamoeba* cinsi amiplerin BCYE besiyerinde iyi derecede üreyebildiğini ve besiyeri üzerinde bıraktıkları izler nedeni ile kolayca tanımlanabileceklerini bildirmektedirler. BCYE besiyerinin aynı zamanda *F.tularensis* kültüründe kullanılan bir besiyeri olması nedeni ile çalışmamızda BCYE besiyeri kullanılmıştır.

BDOA plaklarında üretilen ve morfolojik özelliklerine göre *Acanthamoeba* cinsi olarak tanımlanan amipler ortamda bulunan bakterilerin minimuma indirilmesi amacıyla yıkama işlemine alındı.

BDOA plakları üzerine 15 ml steril distile su eklendi. Steril plastik öze yardımı ile agar plaklarının yüzeyleri kazındı ve agar yüzeyindeki amip kistlerinin sıvı faza geçmeleri sağlandı. Agar plaklarında bulunan sıvı kısım steril santrifüj tüplerine alındı. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım atıldı. Dipte kalan çöküntü üzerine 10 ml steril distile su eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Tekrar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

Son yıkama işleminden sonra bakterileri yok etmek amacı ile dipte kalan çökelti üzerine % 3'lük HCL çözeltisi eklendi. Tüpler bir gece oda ısısında bekletildi. Ertesi gün yıkama işlemi 3 kez tekrar edilerek ortamdaki HCL'in uzaklaşması sağlandı. Tüp dibinde kalan çökeltiden 100 µl alınarak BCYE besiyeri üzerinde 3-4 noktaya eşit şekilde dağıtıldı. Plaklar desikatör içerisine yerleştirildi ve 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Desikatör içerisinde renksiz ve kokusuz mum yakılarak % 5-10 CO₂ 'li ortam oluşması sağlandı.

Ertesi günden itibaren plaklar stereo mikroskop altında incelemeye alındı. Stereo mikroskop altında plaklar 45° açı ile tutularak kontrol edildi. *Acanthamoeba* cinsi amiplerde üremenin olduğu bölgeler amiplerin besiyeri üzerinde bıraktıkları izler nedeniyle kolaylıkla gözlemlendi. BCYE agar plakları 10 gün boyunca amiplerin üremesi yönünden ve *F.tularensis* kolonilerinin varlığı açısından incelendi.

3.8 DNA İzolasyonu

Su Örneklerinden DNA İzolasyonu

Su örneklerinden DNA izolasyonu yapmak amacıyla 2 ml'lik ependorf tüpü içerisinde bulunan membran filtreler kullanıldı. Su örneklerinin süzülmesi sırasında 2 ml'lik ependorf tüpü içerisine süzülen su örneğinden eklendi. Steril bisturi yardımı ile ortadan ikiye kesilen membran filtrenin yarısı steril pensler yardımı ile kıvrılarak ependorf tüpü içerisine yerleştirildi.

DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20 °C'de saklanan 2 ml'lik ependorf tüplerinin oda ısısında çözünmesi sağlandı. Filtre üzerinde bulunabilecek bakterilerin tüp içerisinde bulunan suya geçmesini sağlamak için tüpler vorteks ile 10 dakika boyunca karıştırıldı. Karıştırılan tüplerden 1 ml sıvı alınarak 1.5 ml'lik steril ependorf tüplerine aktarıldı. DNA izolasyonu üreticinin direktifleri doğrultusunda, DNA izolasyon protokolünün 1. basamağından itibaren devam edildi. İzole edilen DNA'lar PCR çalışması yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Kültürde Üretilen Bakterilerden DNA İzolasyonu

F.tularensis olduğundan şüphelenilen bakterilerden PCR çalışmasında kullanılmak üzere DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu üreticinin direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. 1.5 µl'lik ependorf tüpü içerisine 180 µl ATL buffer eklendi. GCBA besiyerinde üretilen bakterilerden öze yardımı ile alınarak 180 µl ATL buffer içerisine süspanse edildi ve iyice karışması sağlandı. DNA izolasyonuna üreticinin direktifleri doğrultusunda, DNA izolasyon protokolünün 4. basamağından itibaren devam edildi. İzole edilen DNA'lar PCR çalışması yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

***Acanthamoeba* Cinsi Amiplerden DNA İzolasyonu**

Üzerine *E.coli* sürülmüş besleyici değeri olmayan agar (BDOA) plaklarında üreyen amiplerden PCR çalışmasında kullanılmak üzere DNA izolasyonu yapıldı.

BDOA plaklarında yıldız, üçgen, poligonal veya oval şekilli kistlerin görüldüğü bölgeler işaretlendi. İşaretli bölgeler lanset yardımı ile kesilerek alındı ve üzerine *E.coli* sürülmüş yeni bir BDOA plakının ortasına ters yüz edilerek bırakıldı. BDOA agar plakları 24 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

BDOA plakları ertesi günden itibaren ışık mikroskopunda 10'luk objektif ile incelemeye alındılar. Günlük yapılan incelemelerde *Acanthamoeba* cinsi amiplerin 3. günden itibaren kistleşmeye başladıkları gözlemlendi. BDOA plakları üzerine 15 ml steril distile su eklendi. Steril plastik öze yardımı ile agar plaklarının yüzeyleri kazındı ve agar yüzeyindeki amiplerin sıvı faza geçmeleri sağlandı.

Agar plaklarında bulunan sıvı kısım 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine alındı. 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek *Acanthamoeba* cinsi amiplerin tüpün dip kısmında toplanması sağlandı. Santrifüj tüplerinin dip kısmında yaklaşık 2 ml sıvı bırakılarak üst kısımdaki sıvı boşaltıldı. Tüpler vorteks yardımı ile karıştırılarak dipteki peletin dağılması sağlandı. Yapılan bu işlem sonucu *Acanthamoeba* cinsi amiplerin trofozoit ve kistleri yoğun bir şekilde elde edilmiş oldu.

Vorteks yardımı ile karıştırılan sıvı kısımdan 1 ml alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. DNA izolasyonuna üreticinin direktifleri soğurtusunda, DNA izolasyon protokolünün 1. basamağından itibaren devam edildi. İzole edilen DNA'lar PCR çalışması yapıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

DNA İZOLASYON PROTOKOLÜ (QIAmp® DNA Minikit (QIAGEN 51304))

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpleri 10 dakika 5000 x g (7500 rpm)'de santrifüj edildi.
2. Tüpün dibinde kalan pelete zarar vermeden üst kısımda kalan sıvı boşaltıldı.
3. Bakteriyel pelet üzerine 180 µl ATL buffer eklendi.
4. 20 µl proteinaz K eklendi ve vorteks yardımı ile karıştırıldı.
5. 56 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sırasında 3 kez vorteks ile karıştırıldı.
6. 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü kapaktaki damlacıkların uzaklaştırılması amacıyla kısaca santrifüj edildi.
7. 200 µl Buffer AL eklendi. 15 saniye boyunca vortekslendi.
8. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
9. 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü kapaktaki damlacıkların uzaklaştırılması amacıyla kısaca santrifüj edildi.
10. 200 µl ethanol (%96-100) eklendi. 15 saniye boyunca vortekslendi.
11. 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü kapaktaki damlacıkların uzaklaştırılması amacıyla kısaca santrifüj edildi.

12. Karışım dikkatli bir şekilde QIAmp Mini spin column'lara aktarıldı. Kapakları kapatıldı ve 6000 x g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. QIAmp Mini spin column'lar 2 ml'lik temiz toplama tüplerine yerleştirildi. filtrat içeren toplama tüpleri atıldı.
14. QIAmp Mini spin column'ların kapakları dikkatlice açılarak içerisine 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapakları kapatıldı ve 6000 x g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. QIAmp Mini spin column'lar 2 ml'lik temiz toplama tüplerine yerleştirildi. filtrat içeren toplama tüpleri atıldı.
16. QIAmp Mini spin column'ların kapakları dikkatlice açılarak içerisine 500 µl Buffer AW2 eklenir. Kapaklar kapatıldı ve 20.000 x g (14.000 rpm)'de 3 dakika santrifüj edildi.
17. QIAmp Mini spin column'lar 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. filtrat içeren toplama tüpleri atıldı.
18. QIAmp Mini spin column'ların kapakları dikkatlice açılarak içerisine 200 µl Buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 6000 x g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
19. QIAmp Mini spin column'ların kapakları dikkatlice açılarak içerisine 200 µl Buffer AE eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 6000 x g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
20. Elde edilen DNA örnekleri PCR çalışması yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.9 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Çalışmamızda Konvansiyonel PCR yöntemi :

- a. Su örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak *F.tularensis* araştırılmasında
- b. Su örneklerinden kültür yöntemi ile izole edilen ve *F.tularensis* olduğundan şüphelenilen bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında
- c. PCR ile *F.tularensis* olduğu kesinleşen bakterilerin alt tür tanımlanmasında
- d. Su örneklerinden BDOA plaklarında üretilen ve morfolojik yapılarına göre tiplendirilen amiplerin *Acanthamoeba* cinsine ait olup olmadıklarının araştırılmasında
- e. BDOA plaklarında üretilen *Acanthamoeba* cinsi amiplerden DNA izolasyonu yapılarak, *F.tularensis* varlığının araştırılmasında kullanılmıştır.

3.9.1 *F.tularensis*'in PCR ile Tür Düzeyinde Tanımlanması

Çalışmamızda su örneklerinden, kültürde üretilip *F.tularensis* olduğundan şüphelenilen bakterilerden ve su örneklerinden izole edilen *Acanthamoeba* cinsi amiplerden DNA elde edilmiş ve PCR çalışmasında kullanılmıştır.

F.tularensis'in PCR reaksiyonu ile tespit edilmesinde hedeflenen başlıca gen bölgeleri; 17 kDa'luk dış membran lipoproteinlerini kodlayan Tul4 gen bölgesi, 43 kDa'luk dış membran proteinlerini kodlayan fop A gen bölgesi ve 16S rRNA gen bölgesidir (Karadenizli, 2009).

Çalışmamızda *F.tularensis*'in Tul4 gen bölgesine yönelik sentezlettirilen primerler kullanılmıştır. Tul4 gen bölgesine ait primerler ile yapılan PCR sonucunda yaklaşık 400 baz çiftlik bölge çoğaltılmaktadır (Sjöstedt ve ark., 1997).

Tul4 Primerler

Forward: Tul4-435 (5'-GCT GTA TCA TCA TTT AAT AAA CTG CTG-3')

Reverse: Tul4-863 (5'-TTG GGA AGC TTG TAT CAT GGC ACT-3')

(Sjöstedt ve ark., 1997).

Reaksiyon Karışımı

	Hacim	Son Konsantrasyon	Stok Konsantrasyon
PCR Buffer	5 µl	1X	10X
MgCl ₂	2.5 µl	2.5 mM	50 mM
Taq DNA Polimeraz	0.125 µl	1.25 U	500 U (5U/ µl)
dNTP	0.4 µl	0.2 mM	25 mM
Tul4-435	2 µl	0.4 µM	10 µM
Tul4-863	2 µl	0.4 µM	10 µM
Kalıp DNA	5 µl		
ddH ₂ O	32.975 µl		
Toplam hacim	50 µl		

Çalışılacak örnek miktarına göre ana karışım hazırlandı ve PCR tüplerine 45 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her tüp üzerine örnek DNA'sından 5 µl eklenerek tüpler kapatıldı. Önceden programlanan ısı döngü (Thermal cycler) cihazına yerleştirildi.

Reaksiyon karışımlarımızın kontrolü ve karışım hazırlanması sırasındaki kontaminasyonları tespit etmek amacıyla pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Pozitif kontrol olarak Gemerek ilçesi Çiçekoğlu köyü şebeke suyundan izole edilen ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Tularemi Referans Tanı Laboratuvarı'nda yapılan PCR çalışması sonucu *F.tularensis subsp. holarctica* olduğu kesinleşen izolat kullanıldı. Negatif kontrol olarak reaksiyon karışımı hazırlamada kullanılan distile su kullanıldı.

DNA Amplifikasyonu:

Hedef DNA 94 °C'de 4 dk bekletilerek denatüre edildi. Bu aşamadan sonra;

94 °C'de 40 sn denatürasyon

64 °C'de 30 sn primerlerin bağlanması (Annealing)

72 °C'de 45 sn uzama (Elongation)

olmak üzere toplam 40 döngü gerçekleştirildi. En son aşama olarak 72 °C'de 5 dk bekletilerek final uzaması gerçekleştirildi ve reaksiyon tamamlandı (Kaygusuz ve ark., 2010). Reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar +4 °C'de bekletildi.

Amplifikasyon ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra değerlendirildi. Negatif sonuç alınan örnekler için aynı amplifikasyon işlemi tekrarlandı.

3.9.2 *F.tularensis*'in PCR ile Alt Tür Düzeyinde Tanımlanması

F.tularensis'in alt tür *tularensis* ve alt tür *holarctica* izolatlarının birbirinden ayrılmasında RNA Helikaz geninde özel bir sekansta delesyon bulunması, *ISFtu2* insertion sekans elementinin olup olmaması, *pdpD* geni ve RD1 genindeki değişiklikler tespit edilerek iki alt türün birbirinden ayrılması mümkündür (Karadenizli, 2009).

Çalışmamızda *F.tularensis*'in RD1 gen bölgesine yönelik sentezlettilen primerler kullanılmıştır. RD1 gen bölgesine ait primerler ile yapılan PCR sonrasında *F.tularensis subsp. tularensis*'te 1522, *F.tularensis subsp. holarctica*'da 924, *F.tularensis subsp. mediaasiatica*'da 1453, *F.tularensis subsp. novicida*'da 3322 baz çiftlik bölge çoğaltılmaktadır (WHO, 2007).

RD1 Primerler

Forward: (5'-TTT ATA TAG GTA AAT GTT TTA CCT GTA CCA-3')

Reverse: (5'-GCC GAG TTT GAT GCT GAA GA-3')

(Broekhuijsen ve ark., 2003).

Reaksiyon Karışımı

	Hacim	Son Konsantrasyon	Stok Konsantrasyon
PCR Buffer	5 µl	1X	10X
MgCl ₂	2.5 µl	2.5 mM	50 mM
Taq DNA Polimeraz	0.125 µl	1.25 U	500 U (5U/ µl)
dNTP	0.4 µl	0.2 mM	25 mM
Forward Primer	2 µl	0.4 µM	10 µM

Reverse Primer	2 µl	0.4 µM	10 µM
Kalıp DNA	5 µl		
ddH ₂ O	32.975 µl		
Toplam hacim	50 µl		

Çalışılacak örnek miktarına göre ana karışım hazırlandı ve PCR tüplerine 45 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her tüp üzerine örnek DNA'sından 5 µl eklenerek tüpler kapatıldı. Önceden programlanan ısı döngü (Thermal cycler) cihazına yerleştirildi.

Reaksiyon karışımlarımızın kontrolü ve karışım hazırlanması sırasındaki kontaminasyonları tespit etmek amacıyla pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Pozitif kontrol olarak Gemerek ilçesi Çiçekoğlu köyü şebeke suyundan izole edilen ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Tularemi Referans Tanı Laboratuvarı'nda yapılan PCR çalışması sonucu *F.tularensis subsp. holarctica* olduğu kesinleşen izolat kullanıldı. Negatif kontrol olarak reaksiyon karışımı hazırlamada kullanılan distile su kullanıldı.

DNA Amplifikasyonu:

Hedef DNA 95 °C'de 3 dk bekletilerek denatüre edildi. Bu aşamadan sonra;

95 °C'de 30 sn denatürasyon

58 °C'de 1 dk primerlerin bağlanması (Annealing)

72 °C'de 1 dk uzama (Elongation)

olmak üzere toplam 30 döngü gerçekleştirildi. En son aşama olarak 72 °C'de 5 dk bekletilerek final uzaması gerçekleştirildi ve reaksiyon tamamlandı (Wang ve ark., 2010). Reaksiyon tüpleri değerlendirme aşamasına kadar +4 °C'de bekletildi.

Amplifikasyon ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra değerlendirildi. Negatif sonuç alınan örnekler için aynı amplifikasyon işlemi tekrarlandı.

3.9.3 Acanthamoeba Cinsi Amiplerin PCR ile Tanımlanması

Acanthamoeba cinsi amiplerin PCR ile tanımlanmasında 18S rDNA gen bölgesine yönelik primerler kullanıldı. JDP1 ve JDP2 primerler ile yapılan ampilifikasyon sonucu, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin 18S rDNA gen bölgesinde yaklaşık 423 ila 551 baz çifti arasında ortalama 500 bp'lik bölge çoğaltılmaktadır (Schroeder ve ark., 2001; Corsaro ve Venditti, 2011).

Acanthamoeba 18S rDNA gen bölgesine özgü primerler:

Forward: JDP1 (5'- GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3')

Reverse: JDP2 (5'- TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA-3')

(Schroeder ve ark., 2001).

Reaksiyon Karışımı

	Hacim	Son Konsantrasyon	Stok Konsantrasyon
PCR Buffer	5 µl	1X	10X
MgCl ₂	2.5 µl	2.5 mM	50 mM
Taq DNA Polimeraz	0.125 µl	1.25 U	500 U (5U/ µl)
dNTP	0.4 µl	0.2 mM	25 mM
Forward (JDP1) Primer	2 µl	0.4 µM	10 µM
Reverse (JDP2) Primer	2 µl	0.4 µM	10 µM
Kalıp DNA	5 µl		
ddH ₂ O	32.975 µl		
Toplam hacim	50 µl		

Çalışılacak örnek miktarına göre ana karışım hazırlandı ve PCR tüplerine 45 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her tüp üzerine örnek DNA'sından 5 µl eklenerek tüpler kapatıldı. Önceden programlanan ısı döngü (Thermal cycler) cihazına yerleştirildi.

Reaksiyon karışımlarımızın kontrolü ve karışım hazırlanması sırasındaki kontaminasyonları tespit etmek amacıyla pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilimdalı'ndan temin edilen *Acanthamoeba polyphaga* türü amipten elde edilen DNA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak reaksiyon karışımı hazırlamada kullanılan distile su kullanıldı.

DNA Amplifikasyonu:

Hedef DNA 94 °C'de 7 dk bekletilerek denatüre edildi. Bu aşamadan sonra;

94 °C'de 1 dk denatürasyon

65 °C'de 1 dk primerlerin bağlanması (Annealing)

72 °C'de 1 dk uzama (Elongation)

olmak üzere toplam 45 döngü gerçekleştirildi. En son aşama olarak 72 °C'de 10 dk bekletilerek final uzaması gerçekleştirildi ve reaksiyon tamamlandı.

Amplifikasyon ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra değerlendirildi. Negatif sonuç alınan örnekler için aynı amplifikasyon işlemi tekrarlandı.

3.10 Agaroz Jel Elektroforezi

3.10.1 Agaroz Jelin Hazırlanması

Amplifikasyon ürünlerinin değerlendirilmesi amacıyla %2'lik agaroz jel kullanıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez işlemi sırasında TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu kullanıldı. 2 gram agaroz hassas terazide tartıldı ve üzerine 100 ml 1X TBE tamponu eklendi. Mikrodalga fırında agarozun iyice erimesi sağlandı ve 60 °C'ye kadar soğuması beklendi. Çeker ocakta 100 ml agaroz üzerine 5 mg/ml stok Etidyum Bromür çözeltisinden 10 µl eklendi. Agaroz jel, taraklar yerleştirilerek jel dökümü için hazır hale getirilen yatay jel tablasına dikkatlice boşaltıldı. 30 dakika boyunca jelin katılaşması beklendi ve taraklar jele zarar vermeden çıkarıldı.

3.10.2 Elektroforez İşlemi ve Görüntüleme

Agaroz jel, kuyucuklar katod tarafında olacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi. TBE tampon çözeltisi agaroz jelin en az 1 mm üzerinde olacak şekilde elektroforez tankına eklendi. 5 µl DNA örneği 1 µl yükleme tamponu (6x) (SIGMA G 7654) ile karıştırıldı ve jele yüklendi. Elektroforez tankının kapağı kapatıldı ve 60 dakika 110 voltta elektroforez işlemine tabii tutuldu.

Elektroforez işleminin bitmesinden sonra jel, bilgisayarlı jel görüntüleme sistemi (Vilbert Lourmat Photodocumentation and Imaging Systems) ile görüntülendi.

3.11 İstatistik

Çalışmalardan elde edilen veriler SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programında değerlendirildi. Yanılma düzeyi $\alpha:0.05$ olarak seçildi ve sonuçların değerlendirilmesinde Ki-kare testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1 İncelenen Su Örneklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda tularemi olgusu görülen bölgelerden 200, tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden 100 olmak üzere toplam 300 su örneği incelendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 İncelenen su örneklerinin ilçelere göre dağılımı

	Merkez İlçe	Gemerek	Gürün	Şarkışla	Suşehri	Yıldızeli	Zara	Kangal	Divriği	Hafik	Koyulhisar	Toplam
Tularemi olgusu görülen bölgeler	25	25	19	47	10	21	53	---	---	---	---	200
Tularemi olgusu görülmeyen bölgeler	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	100
Toplam	35	34	28	56	19	30	62	9	9	9	9	300

Tularemi olgusu görülen ve tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan su örneklerinin alındıkları yerleşim yeri sayılarına göre dağılımları Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2 İncelenen su örneklerinin alındığı yerleşim yeri sayısına göre dağılımı

	Merkez İlçe	Gemerek	Gürün	Şarkışla	Suşehri	Yıldızeli	Zara	Kangal	Divriği	Hafik	Koyulhisar	Toplam
Tularemi olgusu görülen bölgeler	3	3	3	9	3	5	3	--	--	--	--	29
Tularemi olgusu görülmeyen bölgeler	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	100
Toplam	13	12	12	18	12	14	12	9	9	9	9	129

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan su örneklerinin 91'i (%45.50) kaynak suyu, 109'u (%54.50) şebeke suyu idi. Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan su örneklerinin 47'si (% 47.00) kaynak suyu, 53'ü (% 53.00) şebeke suyu özelliğinde idi (Çizelge 4.3).

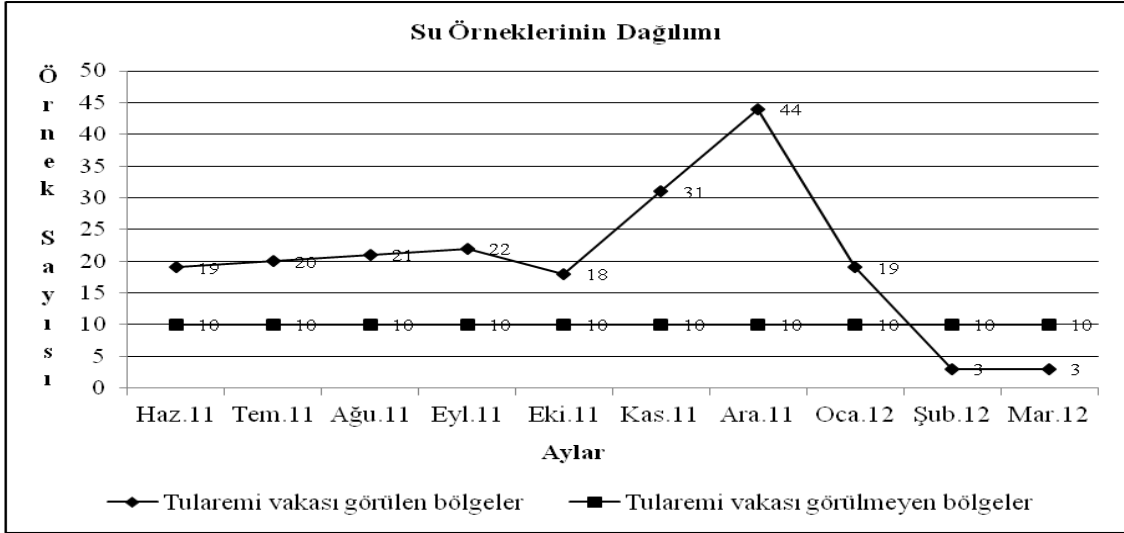
Çizelge 4.3 İncelenen su örneklerinin niteliğine göre dağılımı

	Örnek Sayısı	Kaynak Suyu	%	Şebeke Suyu	%
Tularemi olgusu görülen bölgeler	200	91	45.50	109	54.50
Tularemi olgusu görülmeyen bölgeler	100	47	47.00	53	53.00
Toplam	300	138	46.00	162	54.00

İncelenen su örneklerinin aylara göre dağılımı Çizelge 4.4'te ve Şekil 4.1'de görülmektedir.

Çizelge 4.4 İncelenen su örneklerinin aylara göre dağılımı

	Yaz			Sonbahar			Kış			İlkbahar	
	Haziran 2011	Temmuz 2011	Ağustos 2011	Eylül 2011	Ekim 2011	Kasım 2011	Aralık 2011	Ocak 2012	Şubat 2012	Mart 2012	Toplam Örnek Sayısı
Tularemi olgusu görülen bölgeler	19	20	21	22	18	31	44	19	3	3	200
Tularemi olgusu görülmeyen bölgeler	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
Toplam	29	30	31	32	28	41	54	29	13	13	300



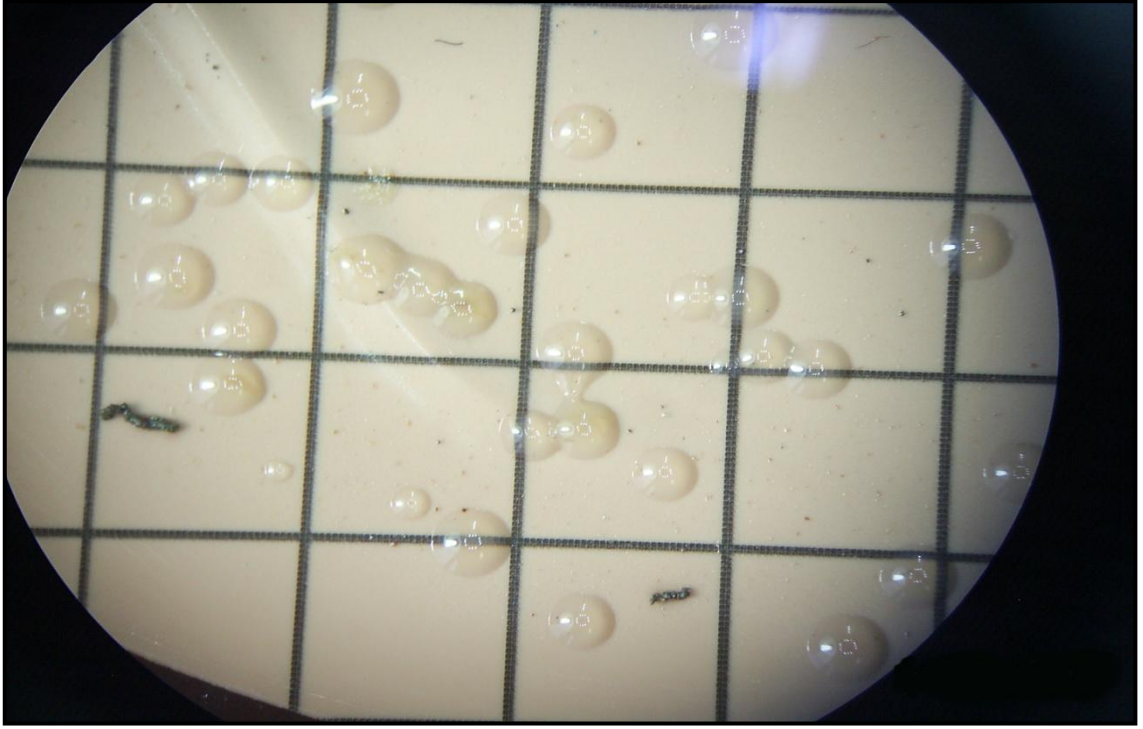
Şekil 4.1 Su örnekleri dağılım grafiği

4.2 İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

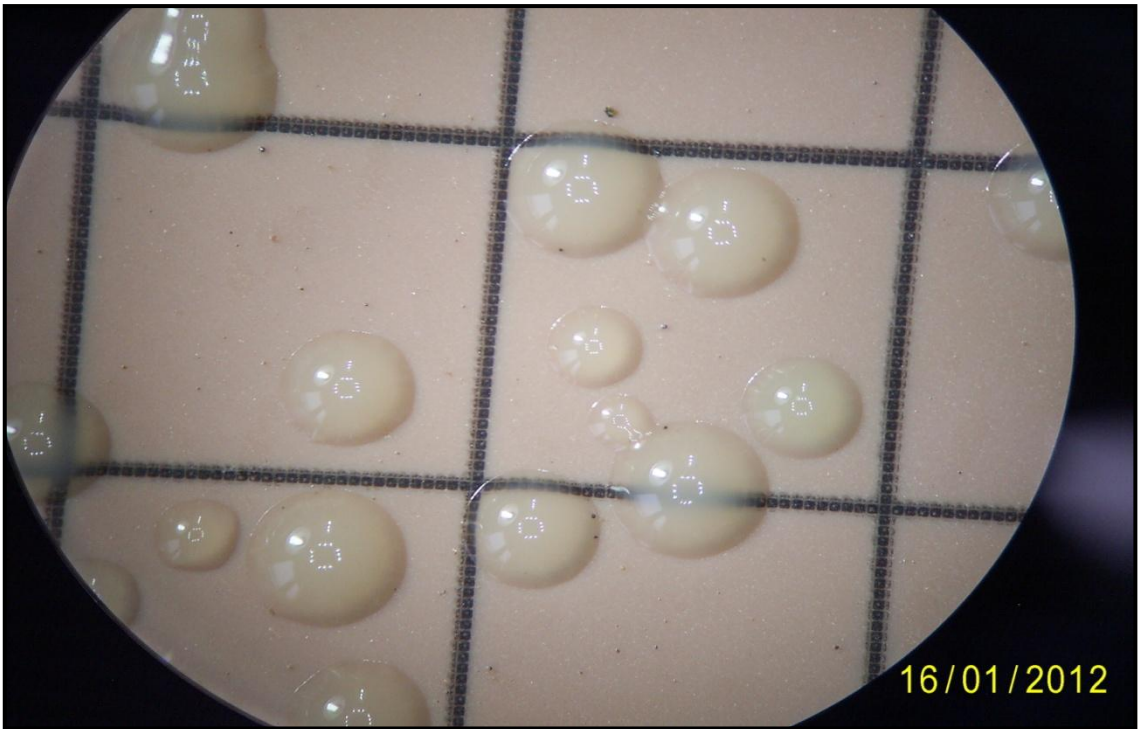
4.2.1 Kültür Bulguları

F.tularensis kültürleri stereo mikroskop altında kontrol edildiğinde bazı örnekler için kültürlerde 3.günden itibaren koloni oluşumu gözlemlendi. Stereo mikroskop yardımı ile kontrol edilen membran filtrelerin üzerinde, 2-3 mm çapında saydam, pürüzsüz, düzgün yüzeyli, yeşilimsi beyaz, yuvarlak, hafif mukoid kubbe şeklinde koloniler görüldü (Şekil 4.2, 4.3). 4. günden itibaren kolonilerin büyüdüğü ve çıplak gözle bakıldığında görülebilecek hale geldikleri gözlemlendi. Filtre üzerinde oluşan kolonilerden alınarak GCBA besiyerine ekim yapıldı. Kültürde üreyen bakterilerin yeşilimsi beyaz renkte, mukoid görünümde, tereyağı kıvamında ve kendine has kokusunun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4, 4.5).

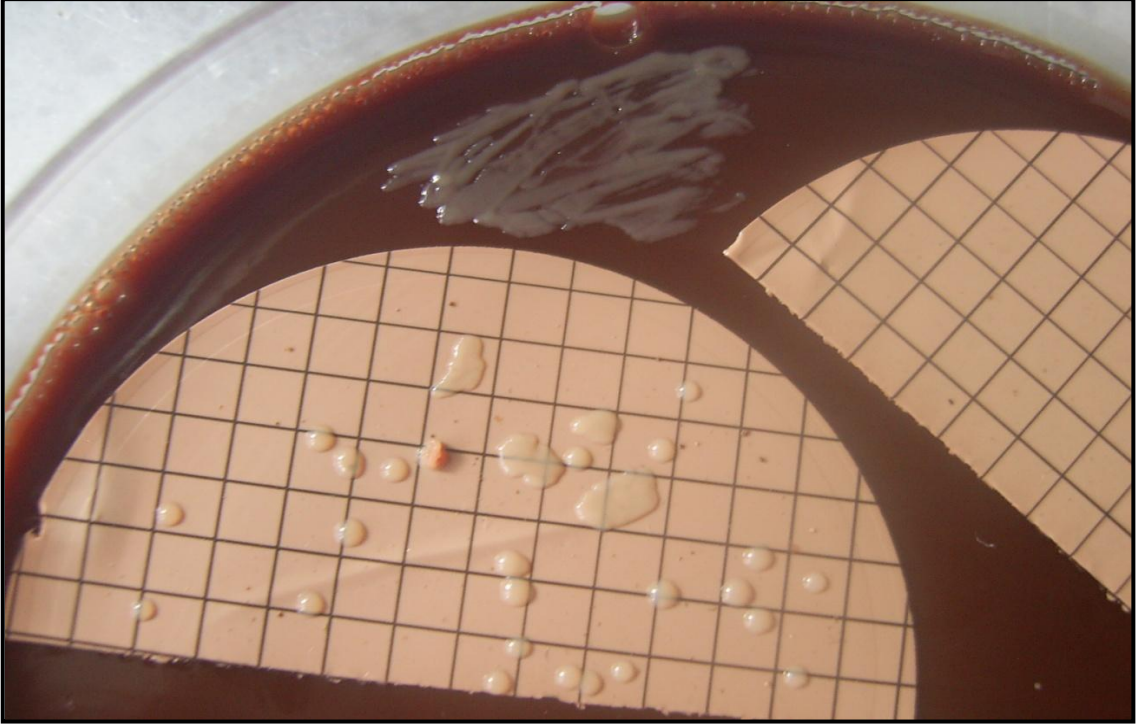
2 litre su örneğinin membran filtrelerden süzülmesi sonucu GCBA besiyeri üzerine bırakılan filtrelerde oluşan *F.tularensis* kolonilerinin sayısının 3-1000 CFU/2lt arasında olduğu görüldü.



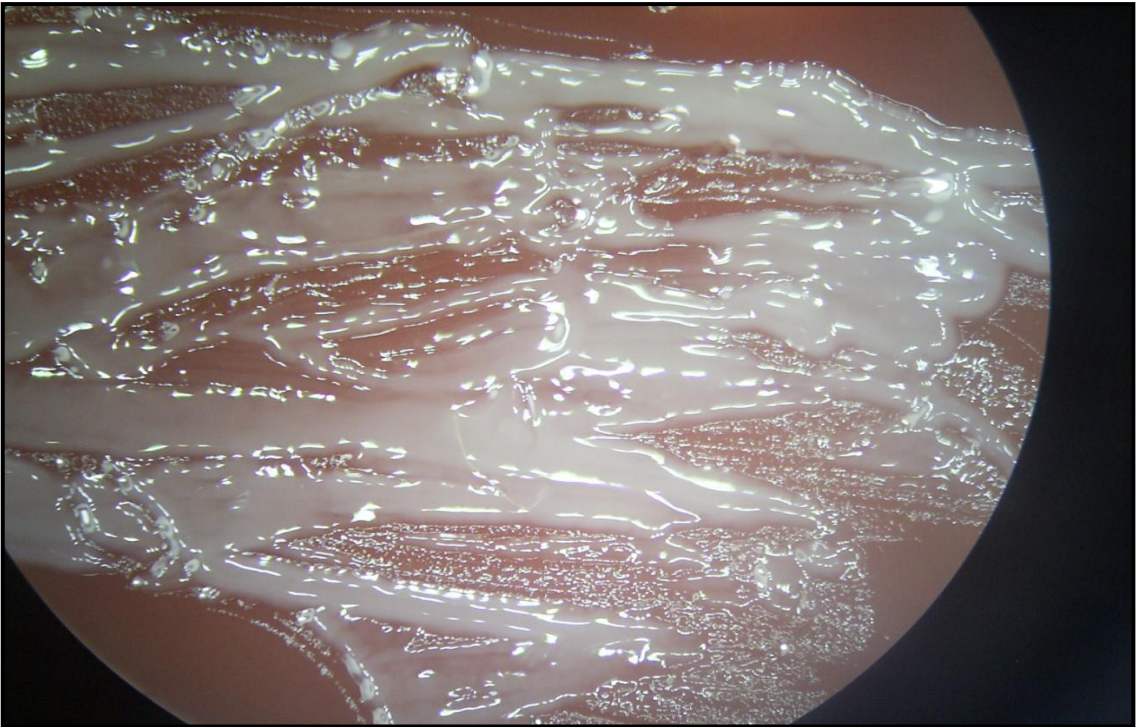
Şekil 4.2 GCBA besiyerinde, membran filtre üzerinde çoğalan *F.tularensis* kolonilerinin stereo mikroskop altında görünüşleri(5.gün)



Şekil 4.3 GCBA besiyerinde, membran filtre üzerinde çoğalan *F.tularensis* kolonilerinin stereo mikroskop altında görünüşleri(6.gün)



Şekil 4.4 Gemerek Çiçekoğlu köyünden alınan su örneğinde üretilen *F. tularensis*'in membran filtre ve besiyeri üzerinde üreme görünümü(7.gün)



Şekil 4.5 GCBA besiyerinde *F.tularensis*'in üreme görünümü

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 30'undan (%15.00) *F.tularensis* izolasyonu yapıldı. *F.tularensis* izolasyonu yapılan su örneklerinin 3 ilçeye bağlı 8 farklı bölgeden alınmış olduğu görüldü (Çizelge 4.5).

Bakteri izolasyonu yapılan 30 su örneğinin 24'ü (%80.00) şebeke suyu, 6'sı (%20.00) ise kaynak sularından alınmış örneklerden oluşmaktaydı.

Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan 100 su örneğinin hiç birisinden *F.tularensis* izole edilmedi. Toplam olarak incelenen 300 su örneğinin 30'undan (%10.00) kültür yöntemi ile *F.tularensis* izolasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 4.6).

F.tularensis izole edilen merkezlerin il haritası üzerindeki dağılımı Şekil 4.6'da görülmektedir.

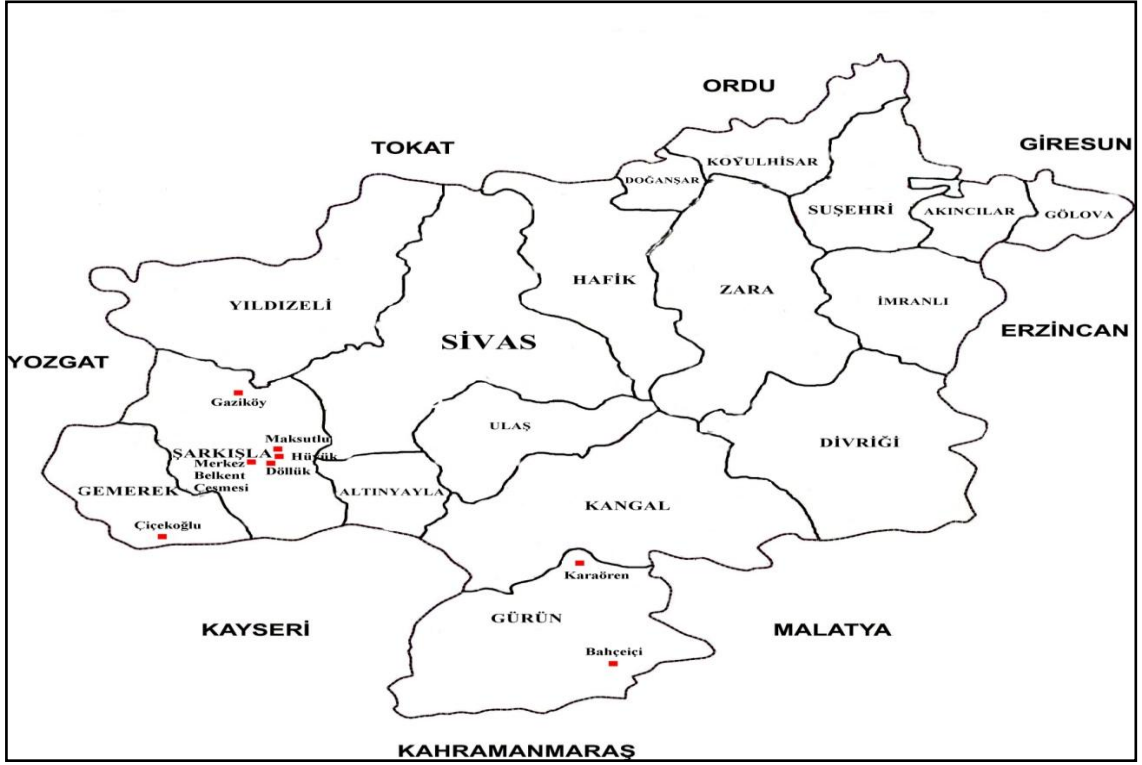
Çizelge 4.5 Kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edilen örneklerin yerleşim yerlerine göre dağılımı

İlçe Adı	Su Örneği Alınan Bölge	Örnek No
Gemerek	Çiçekoğlu Köyü	T131
Gürün	Bahçeici Köyü	T135
Gürün	Karaören Köyü	T173 ^K , T174 ^K , T175, T181 ^K , T182, T183
Şarkışla	Merkez Hüyük Köyü	T142, T144, T145, T146, T148 ^K , T149, T151, T152, T153, T163 ^K , T164, T165, T166, T167, T168, T169, T170, T171
Şarkışla	Maksutlu Köyü	T184
Şarkışla	Döllük Köyü	T186
Şarkışla	Merkez Belkent Çeşmesi	T187 ^K
Şarkışla	Gazi köyü	T198

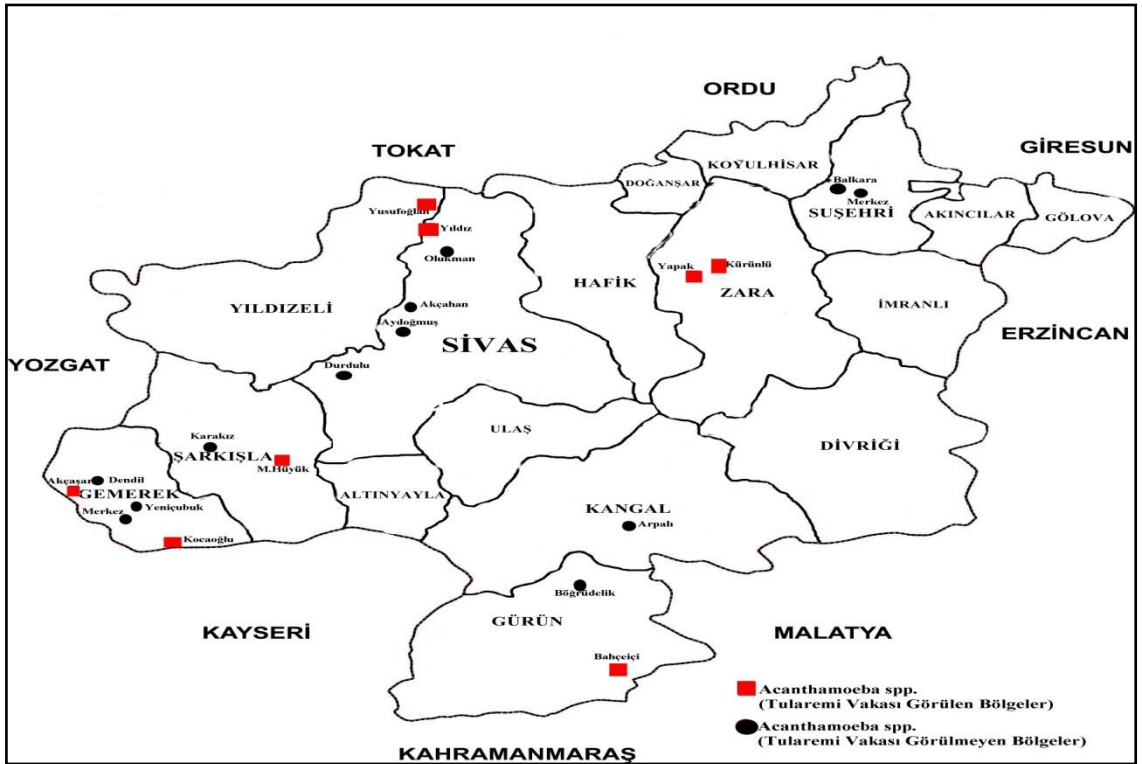
^K (Kaynak Suyu)

Çizelge 4.6 Kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edilen örneklerin dağılımı

	İncelenen Su Örneği	<i>F.tularensis</i>	%
Tularemi olgusu görülen bölgeler	200	30	15.00
Tularemi olgusu görülmeyen bölgeler	100	0	0.00
Toplam	300	30	10.00

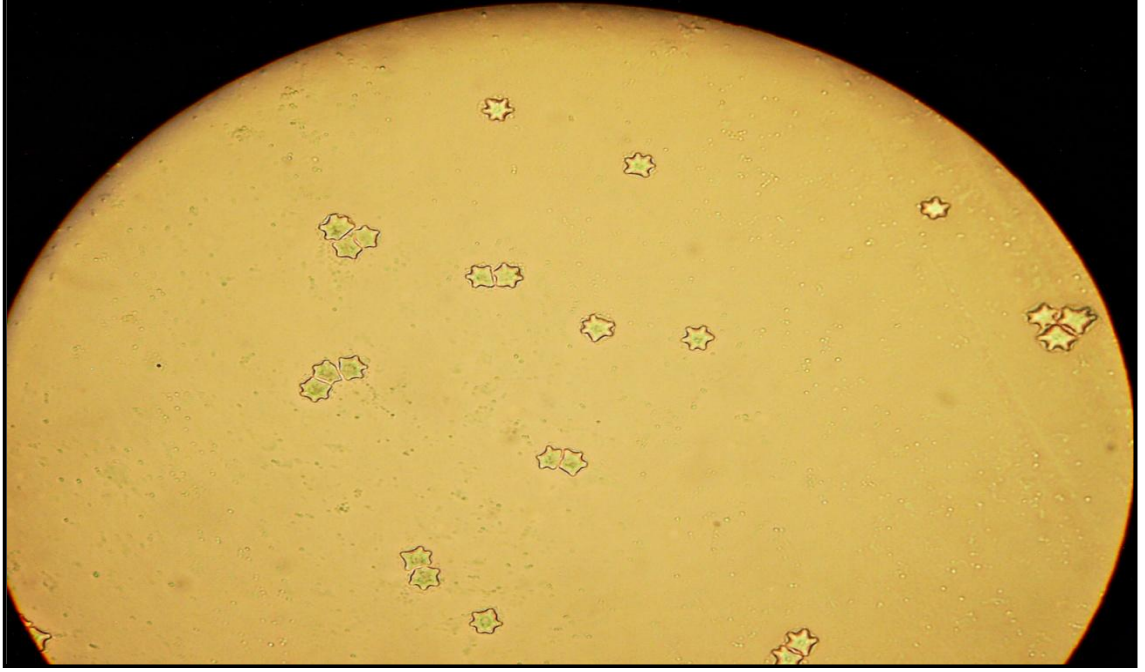


Şekil 4.6 Kültür yöntemiyle *F.tularensis* izole edilen merkezlerin il haritası üzerinde dağılımı

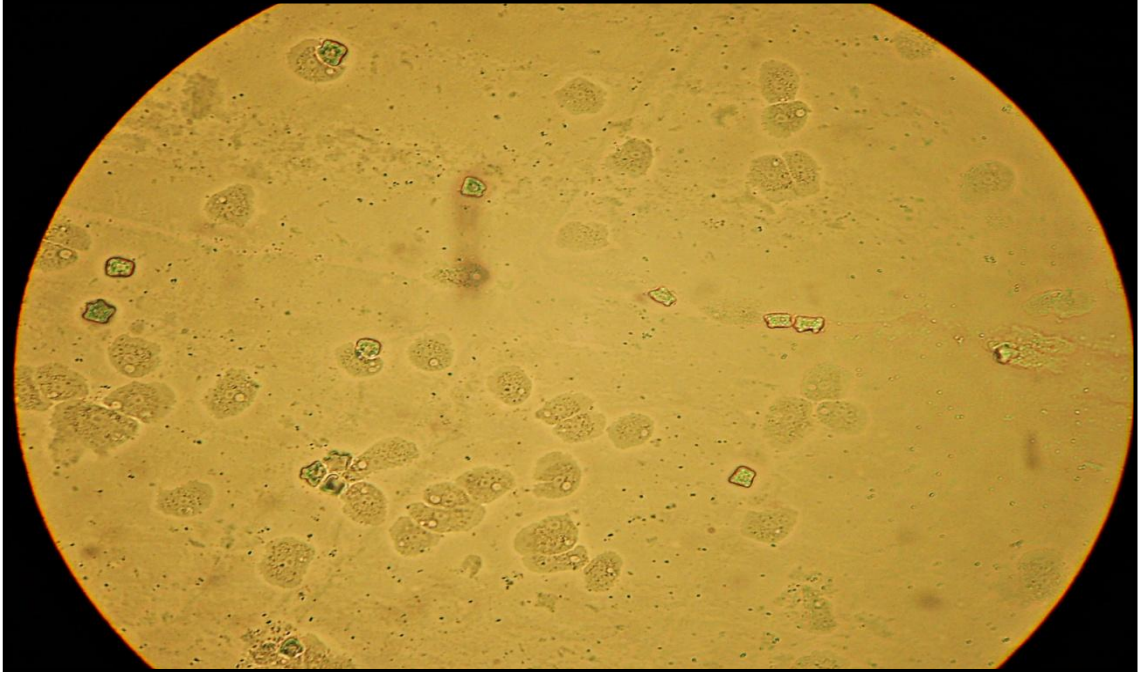


Şekil 4.7 *Acanthamoeba* cinsi amip izole edilen bölgelerin il haritası üzerinde dağılımı

BDOA plaklarında üreyen amipler, sadece trofozoitlerin bulunduğu erken dönemde kontraktıl vakuollerinin ve çekirdeklerinin görünümüyle, ilerleyen dönemlerde ise tipik kist görünümüleriyle ayırt edildiler (Şekil 4.8, 4.9).



Şekil 4.8 BDOA plaklarında üretilen *Acanthamoeba* cinsi amip kistlerinin görünümüleri (10X)



Şekil 4.9 BDOA plaklarında üretilen *Acanthamoeba* cinsi amip trofozoitlerinin görünümüleri (10X)

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 16'sından (%8.00) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu yapıldı. *Acanthamoeba* izole edilen 16 su örneğinin 9'u (%56.25) şebeke suyundan, 7'si (%43.75) kaynak suyundan alınmış örneklerden oluşmaktaydı (Çizelge 4.7).

Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan 100 su örneğinin 12'sinden (%12.00) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu yapıldı. *Acanthamoeba* izolasyonu yapılan 12 su örneğinin 5'i (%41.66) şebeke suyundan, 7'si (%58.33) kaynak suyundan alınmış örneklerden oluşmaktaydı (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7 Tularemi olgusu görülen bölgelerden üretilen *Acanthamoeba* cinsi amiplerin dağılımı

İlçe Adı	Su Örneği Alınan Bölge	Örnek No
Yıldızeli	Yusufoğlan Köyü	T24 ^K , T26
Merkez	Yıldız Beldesi	T42, T44, T50 ^K , T54, T55
Gemerek	Kocaoğlu Köyü	T67
Gemerek	Akçaşar Köyü	T75 ^K
Zara	Yapak Köyü	T106, T115 ^K , T123 ^K
Zara	Kürünlü Köyü	T141 ^K
Gürün	Bahçeici Köyü	T159
Şarkışla	Merkez Hüyük Köyü	T163 ^K , T171

^K (Kaynak Suyu)

Çizelge 4.8 Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden üretilen *Acanthamoeba* cinsi amiplerin dağılımı

İlçe Adı	Su Örneği Alınan Bölge	Örnek No
Merkez	Durdulu Köyü	1 ^K
Merkez	Olukman Köyü	3 ^K
Kangal	Arpalı Köyü	4
Suşehri	Merkez	15
Merkez	Aydoğmuş Köyü	30
Merkez	Akçahan Köyü	32
Gemerek	Dendil Köyü	67 ^K
Gürün	Böğrüdellik Köyü	70
Gemerek	Merkez	73 ^K
Gemerek	Yeniçubuk Beldesi	74 ^K
Suşehri	Balkara Köyü	90 ^K
Şarkışla	Karakız Köyü	91 ^K

^K (Kaynak Suyu)

Tularemi olgusu görülen ve görülmeyen bölgelerden alınan toplam 300 su örneğinin 28'inden (%9.33) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu gerçekleştirildi (Çizelge 4.9). Tularemi olgusu görülen bölgeler ve tularemi olgusu görülmeyen bölgelerdeki su örneklerinde, *Acanthamoeba* cinsi amip görülme sıklığı yönünden istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$). *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu gerçekleştirilen merkezlerin il haritası üzerindeki dağılımı Şekil 4.7'de görülmektedir.

Çizelge 4.9 *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyon sonuçları

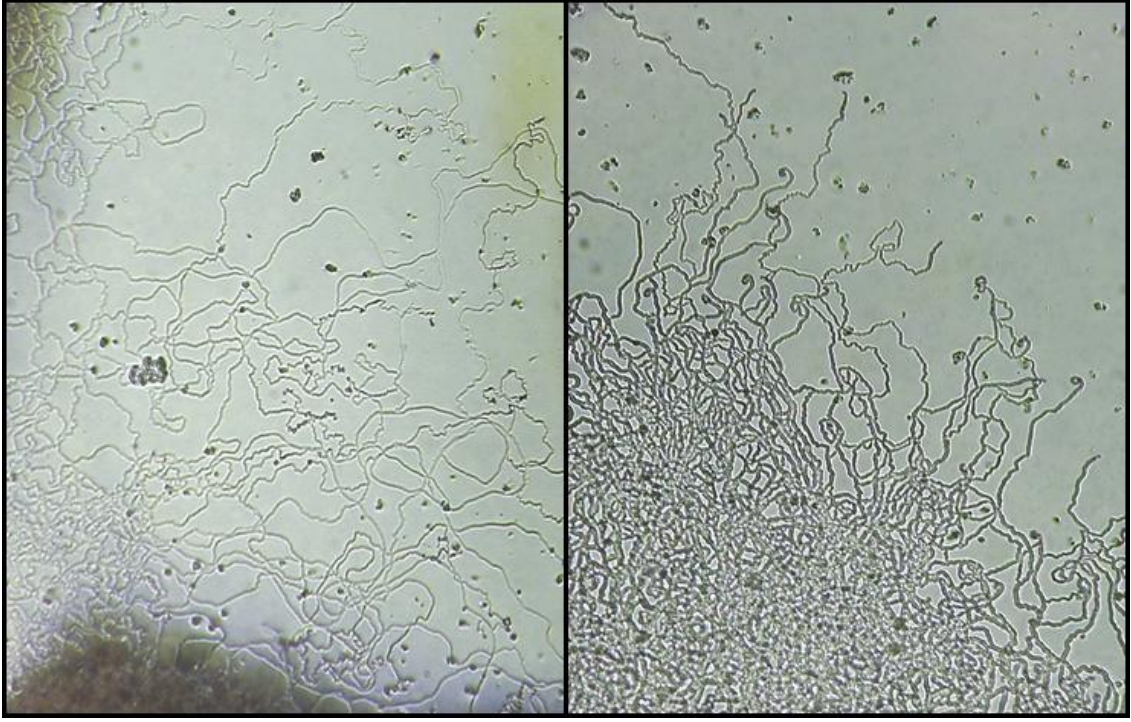
	İncelenen Su Örneği	<i>Acanthamoeba</i> cinsi amip izole edilen	%	<i>Acanthamoeba</i> cinsi amip izole edilmeyen	%
Tularemi olgusu görülen bölgeler	200	16	8.00	184	92.00
Tularemi olgusu görülmeyen bölgeler	100	12	12.00	88	88.00
Toplam	300	28	9.33	272	90.66
$X^2 = 1.26$		$p > 0.05$			

Çalışmamızda *F.tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin birlikte pozitifliği yalnızca iki su örneğinde saptandı (Çizelge 4.10). Tularemi olgusu görülen Şarkışla Merkez Hüyük köyünden alınan T163 ve T171 nolu örneklerden kültür yöntemi ile *F.tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amip izole edildi. T163 nolu örnek kaynak suyundan, T171 nolu örnek ise şebeke suyundan alınmıştı.

Çizelge 4.10 *F.tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin izolasyon sonuçları

	İncelenen Su Örneği	<i>F.tularensis</i>	%	<i>Acanthamoeba</i> cinsi amip	%	<i>F.tularensis</i> + <i>Acanthamoeba</i> cinsi amip	%
Tularemi olgusu görülen bölgeler	200	30	15.00	16	8.00	2	1.00
Tularemi olgusu görülmeyen bölgeler	100	0	0.00	12	12.00	0	0.00
Toplam	300	30	10.00	28	9.33	2	0.66

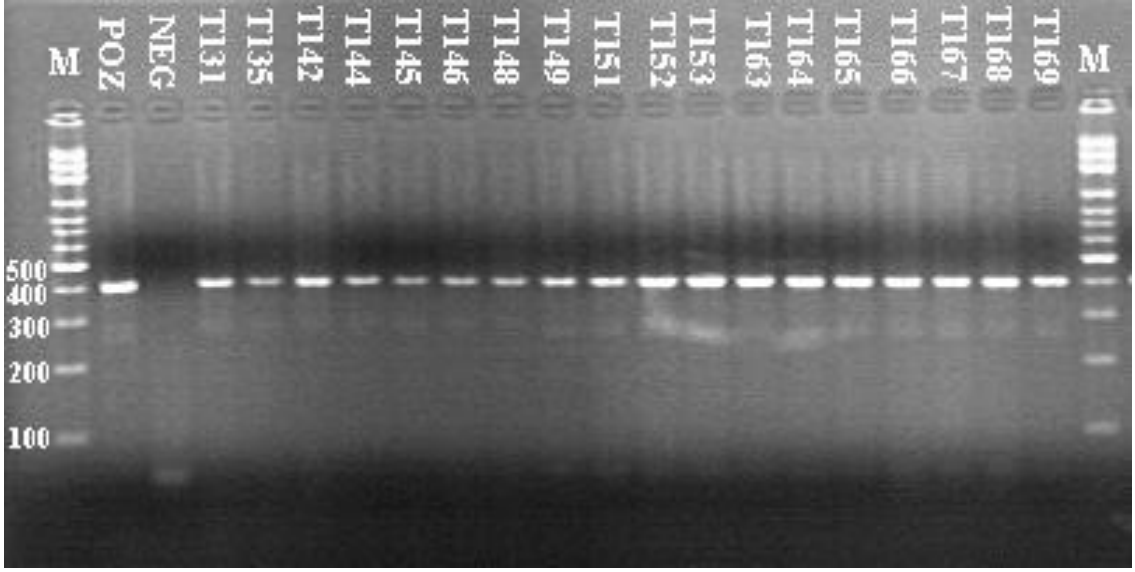
Tularemi olgusu görülen ve görülmeyen bölgelerden alınan toplam 300 su örneğinden BDOA ortamında 28 (%9.33) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu yapıldı. Bu amipler BCYE agar besiyerine aktarılarak üremeleri sağlandı. BCYE agar besiyerinde *Acanthamoeba* cinsi amip üremesi olmasına rağmen, *F.tularensis* üremesi görülmedi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 *Acanthamoeba* cinsi amiplerin BCYE besiyerinde üremeleri sırasında oluşturdukları izler

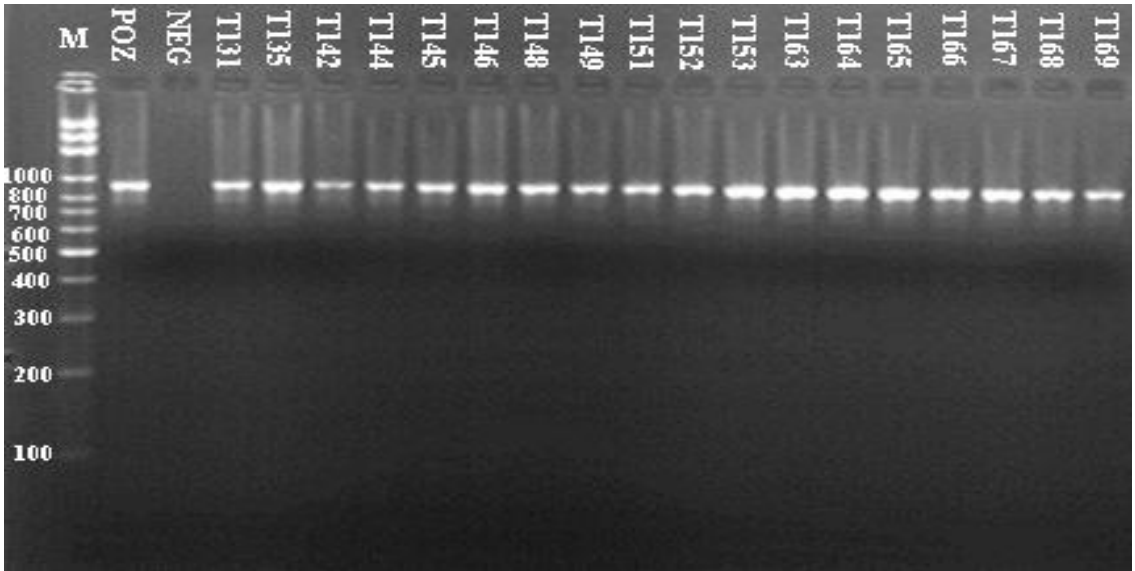
4.2.2 PCR Bulguları

Üreme zamanı, koloni morfolojisi ve antiserumla aglütinasyon özellikleri yönünden olası *F.tularensis* olarak değerlendirilen 30 izolat, türe özgü Tul4 primerler ile yapılan PCR sonucu 400 bp'lik bölgede bant oluşturdu ve izolatların *F.tularensis* türüne ait olduğu saptandı (Şekil 4.11).



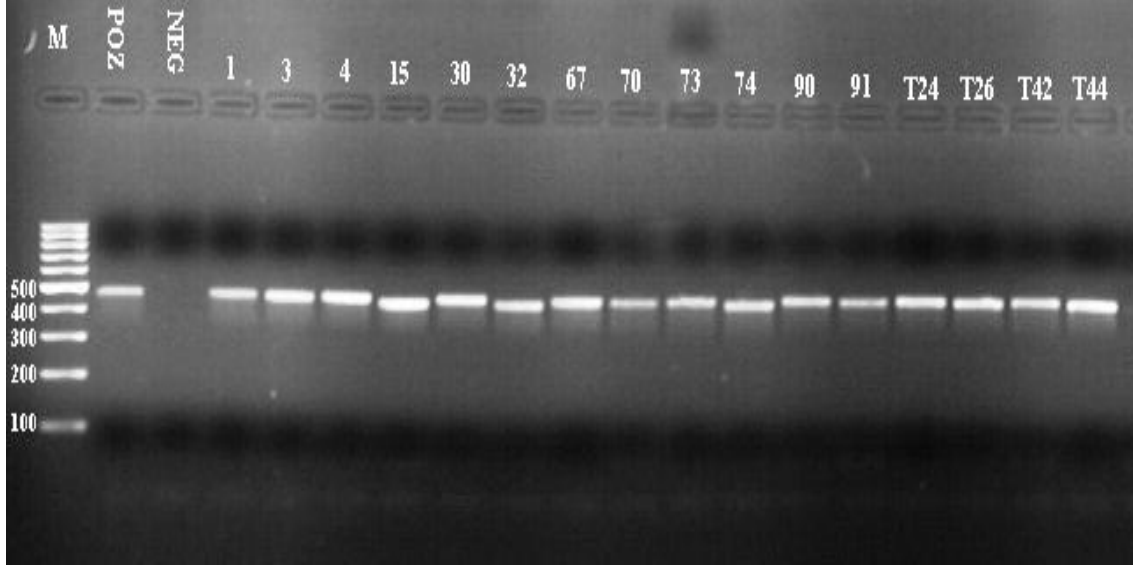
Şekil 4.11 *Francisella* cinsi bakterilerin Tul4 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması
(M: Markır -Poz: Pozitif Kontrol - Neg: Negatif Kontrol)

Türe özgü Tul4 primerler ile yapılan PCR ile *F.tularensis* olduğu kesinleşen 30 izolattın hepsi, alt türe özgü RD1 primerler ile yapılan PCR sonucu 924 bp'lik bölgede bant oluşturdu ve *F.tularensis subsp. holarctica* olarak tanımlandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 *Francisella* cinsi bakterilerin RD1 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması
(M: Markır - Poz: Pozitif Kontrol - Neg: Negatif Kontrol)

Toplam 300 su örneğinden izole edilen 28 *Acanthamoeba* izolatının tümü 18S rDNA gen bölgesine yönelik primerler ile yapılan PCR sonucu yaklaşık 500 bp'lik bölgede bant oluşturdu ve *Acanthamoeba* cinsine ait oldukları saptandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 *Acanthamoeba* cinsi amiplerin 18S rDNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması
(M: Markır - Poz: Pozitif Kontrol - Neg: Negatif Kontrol)

Tularemi olgusu görülen ve tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan toplam 300 su örneğinden DNA izolasyonu yapıldı ve PCR ile *F.tularensis* DNA'sının varlığı yönünden incelendi. Türe özgü Tul4 primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda 300 su örneğinin hiçbirisinde *F.tularensis* DNA'sının varlığına rastlanmadı.

Tularemi olgusu görülen ve görülmeyen bölgelerden alınan toplam 300 su örneğinden izole edilen 28 *Acanthamoeba* izolatından DNA elde edilerek PCR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının varlığı araştırıldı. Türe özgü Tul4 primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda 28 *Acanthamoeba* izolatının hiç birisinde *F.tularensis* DNA'sının varlığına rastlanmadı.

5. TARTIŞMA

Tularemi hastalığında karasal döngü ve su döngüsü olmak üzere iki farklı döngü tanımlanmakta olup karasal döngüde başlıca vektörler yabani tavşanlar, keneler ve bazı sinek türleri yer almaktadır. Su döngüsünde ise kunduz, misk sıçanı ve diğer sıçan türleri rol oynamaktadır. İnsan ise bu döngülerde organizma ile tesadüfen temas ederek organizmayı kazanan konak olarak tanımlanmaktadır. Karasal döngüde etken *F.tularensis subsp. tularensis*, su döngüsünde ise *F.tularensis subsp. holarctica*'dır. (Mörner, 1992; Nigroviç ve Wingerter, 2008; Sağlık Bakanlığı, 2011).

F.tularensis subsp. holarctica primer olarak Kuzey Avrupa, Balkanlar, Türkiye, Sibirya, Uzak Doğu, Kazakistan ve Kuzey Amerika'da izole edilmektedir ve daha çok su kaynaklı salgınlardan sorumludur (WHO, 2007).

Tularemi hastalığında enfekte hayvan ve kene ile temas dünya genelinde en sık gözlenen bulaşma yolu iken, ülkemizde kene kaynaklı veya sığır salyasından bulaş gibi nadir vakalar dışında klorlanmamış içme suyu veya kaynak suyu tüketilmesi ana bulaş yolunu oluşturmaktadır (Bıçakcı ve Öztürk, 2008; Sağlık Bakanlığı, 2011; Yeşilyurt ve ark., 2011)

Tularemi tanısında kültür altın standart olarak kabul edilmektedir (WHO, 2007). Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında; nazlı üreyen bir bakteri olması, flora bakterileri ve çevresel örneklerde bulunan diğer bakteriler tarafından üremesinin baskılanması, solunum yolu ile bulaşması ve çalışmalar için yüksek güvenilirli laboratuvara gereksinim olması gibi nedenlerden dolayı moleküler yöntemlerin tercih edildiği görülmektedir.

Greco ve ark. (1987) tarafından, İtalya'nın Tuscany bölgesinde 1982 yılında meydana gelen tularemi salgınında 49 vaka tanımlanmıştır ve salgının klorlanmamış suların kullanılmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Salgın bölgesinden alınan 20 su örneğinden Hb-Cys-Agar kullanılarak *F.tularensis* izole edilmeye çalışılmış fakat başarılı sonuç alınamamıştır. Salgın bölgesinden yakalanan yabani tavşanlardan *F.tularensis* tip 1 izole edilmiştir.

Chitadze ve ark. (2009) tarafından, Gürcistan'da 2006 yılında meydana gelen tularemi salgınında 21'i orofarengeal ve 5'i glandüler tipte olmak üzere toplam 26 vaka tespit edilmiştir. Salgın bölgesinden alınan 5 adet su örneği santrifüj edilerek beyaz farelere enjekte edilmiştir. Farelerin dalakları çıkarılarak McCoy besiyerine ekimler

yapılmıştır. İncelenen 5 adet su örneğinin tamamından kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edilmiştir.

Pazdiora ve ark. (2002), Çek Cumhuriyetinde 2000 yılında meydana gelen ve 48 kişinin etkilendiği tularemi salgınının su kaynaklı olduğunu ve iki su örneğinde PCR yöntemi ile bakterinin tespit edildiğini belirtmektedirler.

Berdal ve ark. (2000), 1997 yılında Kuzey Norveç'te görülen tularemi salgınında, salgın görülen iki bölgeden aldıkları 24 su örneğinde immünokromatografik test, ELISA ve PCR yöntemleri ile *F.tularensis* varlığını araştırmışlardır. Salgın bölgesindeki bir kuyudan alınan 4 su örneğinin 2'sinde her üç yöntemle pozitiflik saptanmıştır. Aynı kuyuda bulunan yaban sıçanı ölüsünün karaciğer, dalak ve böbreğinde de her üç yöntemle pozitiflik saptanmıştır.

Berrada ve Telford (2010), ABD'nin Massachusetts eyaletinin Martha's Vineyard bölgesinde, tulareminin görüldüğü alanlardan su, sediment ve toprak örnekleri olarak PCR yöntemi ile *Francisella* spp. varlığını araştırmışlardır. Tatlısu göleti çevresinden alınan 10 su örneği ile bataklık alan çevresinden alınan 25 su örneği *Francisella* türleri yönünden negatif bulunmuştur. Acı su gölünden alınan 42 su örneğinin 19'u PCR ile 16S rRNA hedef gen bölgesi açısından *Francisella* spp. pozitif bulunmuştur. PCR ile 16S rRNA hedef gen bölgesi açısından pozitif bulunan 19 örneğin 14'ü *sdhA*, 12'si *fopA*, 16'sı *ISFTu2*, 12'si *tul4* gen bölgesi açısından pozitif bulunmuştur.

Broman ve ark. (2011), İsveç'te yaptıkları araştırmalarında tulareminin endemik olduğu bölgelerdeki su yüzeylerinden aldıkları 341 su örneğinin 108'inde (%32), 245 sediment örneğinin 48'inde (%20) gerçek zamanlı PCR ile *F.tularensis* DNA'sının varlığını saptamışlardır.

Kantardjiev ve ark. (2006), Bulgaristan'da 1997-2005 yılları arasında görülen tularemi salgınında, 41 kuyudan aldıkları su örneklerinin 4'ünden *F.tularensis* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada 4'ü hastalardan, 4'ü sulardan, 1'i tavşanlardan ve 1'i kenelerden olmak üzere toplam 10 *F.tularensis subsp. holarctica* kökeni izole edilmiştir.

Larssen ve ark. (2011), 2011 yılı Ocak-Mart ayları arasında Norveç'te meydana gelen tularemi salgınında 39 tularemi vakasından 21'inin orofarengeal tipte olduğunu ve salgının içme sularından kaynaklandığını bildirmektedirler. Beş farklı kuyu suyundan alınan su örneklerinde *F.tularensis* DNA'sı PCR yöntemiyle tespit edilmiştir.

Su kaynaklı tularemi salgınlarının görüldüğü ülkelerde yapılan çalışmalara bakıldığında Chitadze ve ark. (2009) tarafından Gürcistanda 5 su örneğinin

tamamından, Kantardjiev ve ark. (2006) tarafından Bulgaristan'da 41 kuyu suyu örneğinin 4'ünden kültür yöntemi ile *F.tularensis* izolasyonu gerçekleştirildiği görülmektedir.

İçme ve kaynak sularının kullanılmasına bağlı olarak ortaya çıkan tularemi salgınları özellikle Türkiye'den bildirilmektedir. Ülkemizde tularemi olgularının ortaya çıkmasının kontamine olmuş sulardan kaynaklandığı hipotezi hemen hemen bütün olgularda ileri sürülmüştür (Şahin, 2009; Kılıç, 2010).

Ülkemizde görülen en büyük tularemi salgını İbrahim Etem Utku tarafından bildirilmiştir. Antalya ili Bademağacı Köyünde 1953 yılı Ocak-Eylül ayları arasında meydana gelen salgında, yerel sağlık kuruluşlarına göre 154, araştırmacıya göre 300'e yakın kişinin etkilendiği belirlenmiştir. Utku, salgına tavşan ve sıçanların suyu kirletmesinin ve bu suların tüketilmesinin neden olabileceğini düşünmüş ancak sularda etken varlığını gösterememiştir (Utku, 1954).

Helvacı ve ark. (2000), Bursa yöresinde 1988 yılından itibaren görülen salgınları 10 yıllık dönemde incelemişler ve 205 hastanın 10'undan (%4.9) kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole etmişlerdir.

Wilke-Topçu (2009), 1988 yılında Bursa ve çevresinde meydana gelen salgında sulardan etken üretilmediğini bildirmektedir. Olguların çoğunun orofarengeal formda olduğunu ve aynı kaynak suyu çeşmesinden su içenler arasında görülmesinin salgının su kaynaklı olduğunu düşündüğünü belirtmektedir.

Gürcan ve ark. (2008), 2005-2006 yıllarında Trakya ve Batı Karadeniz bölgelerindeki köylerde görülen tularemi salgınlarında 12 hastadan toplam 16 örnek olarak incelemişlerdir. İki hastanın lenf nodlarından alınan aspirat örneklerinde kültür yöntemiyle *F.tularensis* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Nuhören ve Yazıkara suşları olarak isimlendirilen kökenler yapılan moleküler analizler sonucu 2003 yılında Bulgaristan'da izole edilen kökenlerle benzer bulunmuştur.

Çelebi ve ark. (2006), 2004-2005 yıllarında Zonguldak, Bartın ve Kastamonu illerinde yaptıkları çalışmalarda su örneklerinde kültür ve gerçek zamanlı PCR yöntemi ile tularemi açısından negatiflik bulurken, 7 tularemi hastasının lenf nodu aspiratlarında PCR yöntemi ile pozitiflik saptamışlardır.

Leblebicioğlu ve ark. (2008), Amasya ilinin Suluova ilçesinde 2004 yılında görülen tularemi salgınında, ilçenin içerisinden geçen dereleden aldıkları su örneklerinde gerçek zamanlı PCR yöntemiyle *F.tularensis* varlığını belirlemişlerdir.

Wilke ve ark. (2009), 2004-2005 yıllarında Kocaeli bölgesinde meydana gelen tularemi salgınının su kaynaklı olduğunu bildirmektedirler. Gerçek zamanlı PCR ile yapılan çalışmada su örneklerinde pozitiflik saptanamamışlardır.

Gürcan ve ark. (2006), 2005 yılında Edirne’de görülen tularemi salgınında üç çeşmeden alınan kaynak suyu örneklerinin birisinde PCR yöntemiyle *F.tularensis* DNA’sının varlığını saptamışlardır.

Meriç ve ark. (2008), 2005 yılı Ocak-Mart ayları arasında Kocaeli ili Karamürsel ilçesi Pazarköy köyünde meydana gelen tularemi salgınının su kaynaklı olduğunu bildirmektedirler. Salgında su deposundan ve şebekeden alınan su örnekleri kültür ve PCR yöntemleri ile incelenmiştir. Filtre edilen su örneklerinde gerçek zamanlı PCR ile *F.tularensis* DNA’sı gösterilmiş, ancak filtre edilen su örneklerinin kültürlerinde *F.tularensis* üretilmemiştir. Deponun temizlenmesi ve suların klorlanması ile salgın kontrol altına alınmıştır.

Meriç ve ark. (2010), 2005-2006 yıllarında Sakarya ilinin Kocadöngel köyünde çıkan tularemi salgınına inceledikleri çalışmalarında su örneklerinde kültür yöntemi ile negatif sonuç alınırken, su deposundan alınan örnekte gerçek zamanlı PCR ile pozitif sonuç alınmıştır.

Otkun ve ark. (2011), 2009 yılında Çanakkale ilinin Biga ilçesine bağlı Balıklıçeşme ve Sinekçi köylerinde meydana gelen tularemi salgınına incelemişlerdir. Su örneklerinden yapılan kültürlerde *F.tularensis* üremesi saptanamamıştır. Sinekli köyündeki 11 farklı noktadan alınan su örneklerinin 4’ünden ve Balıklıçeşme köyündeki 5 farklı noktadan alınan su örneklerinin 4’ünde gerçek zamanlı PCR ile pozitiflik saptanmıştır.

Ulu Kılıç ve ark. (2011), 2009 yılında Çankırı ili Çerkeş ilçesi Kadıözü köyünde meydana gelen tularemi salgınına incelemişlerdir. Kadıözü köyünden alınan 10 adet su örneği membran filtrelerden süzülerek kültür ve PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. Alınan su örneklerinde *F.tularensis* üretilmemiştir. Köylüler tarafından sıklıkla kullanılan doğal kaynak sularının birisinde *tul4* gen bölgesini hedefleyen konvansiyonel PCR ile *F.tularensis* DNA’sı saptanmıştır. Yapılan PCR çalışmaları sonucu etkenin *F.tularensis subsp.holarctica* olduğu belirlenmiştir.

Engin ve ark. (2011), Sivas ilinde 2009 ve 2010 yıllarında görülen tularemi salgınında 29 olguyu değerlendirmişlerdir. İki hastanın lenf gangliyonlarından alınan örneklerde *F.tularensis* DNA’sı PCR ile pozitif bulunmuştur.

Dikici ve ark. (2012), 2010 yılında Konya ilinde tularemi vakaları görülen Emen beldesi ve Yukarıçiğil beldesinden su örnekleri alarak kültür ve PCR yöntemleri ile *F.tularensis* varlığını araştırmışlardır. Üç olgudan alınan aspirat örneğinde PCR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının varlığı gösterilmiştir. Bu bölgelerdeki depolar, çeşmeler ve doğal kaynaklardan alınan 33 su örneğinin hiçbirisinde kültür ve PCR yöntemleri ile pozitiflik saptanamamıştır.

Gürcan ve ark. (2012), 2010 yılında Trakya bölgesinde meydana gelen salgını inceleyerek, salgının su kaynaklı olduğunu ve sadece çocukların etkilendiğini bildirmektedirler. Havuzda yüzme ve dere suyu ile temasın hastalığa yakalanma riskini 9.3 kat artırdığını belirtmektedirler. Su örneklerinde kültür yöntemi ile bakteri üretilmezken, 3 hastanın evinden ve dere suyundan alınan örneklerde gerçek zamanlı PCR ile *F.tularensis* varlığı saptanmıştır.

Ülkemizde tularemi hastalığı etkeni olan *F.tularensis*'in su örneklerinden kültür yöntemi ile ilk izolasyonu 1937 yılında Talat Vasfi Özel tarafından gerçekleştirilmiştir. Hamzabey Deresi ve Ceylan Suyundan alınan su örnekleri farelere enjekte edilmiş ve ölen farenin karaciğeri başka bir fareye yedirilmiştir. Farelerin kalp kanı alınarak sistinli besiyerine ekim yapılmış ve bakteri üretilmiştir (Özel, 1938).

Helvaci ve ark. (2000), Bursa yöresinde görülen salgınlarda 10 yıllık süreç içerisinde 205 hastanın 10'undan kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole etmeyi başarmışlardır. Gürcan ve ark. (2008), 2005-2006 yılları arasında Trakya ve Batı Karadeniz bölgesi salgınlarında 12 hastadan aldıkları 16 örneği kültür yöntemi ile incelemişler ve iki hastanın lenf nodu aspiratlarından *F.tularensis* izole etmişlerdir.

Kültür yöntemi ile su örneklerinde doğrudan *F.tularensis* izolasyonu ilk kez 2009 yılında Şimşek ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar 2008-2009 yıllarında Çorum, Sivas ve Samsun'da görülen tularemi salgınlarında toplam 154 içme suyu örneğinin (Çorum:69, Sivas:55, Samsun:30) 4'ünden kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole etmişlerdir. 17 su örneğinde ise gerçek zamanlı PCR ile *F.tularensis* DNA'sının varlığını ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışma ile ülkemizde ilk kez kültür ve PCR yöntemleri ile su örneklerinde *F.tularensis* varlığı tespit edilmiştir. Sivas ilinden alınan 55 su örneğinin birisinden kültür yöntemiyle *F.tularensis* izole edilmiş, üç su örneğinde ise PCR ile pozitiflik saptanmıştır.

Çalışmamızda tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 30'undan kültür yöntemi ile *F.tularensis* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız

kültür yöntemi ile su örneklerinde *F.tularensis* izolasyonu yönünden Şimşek ve ark.'nın (2012) çalışmaları ile benzerlik taşımaktadır.

Ülkemizde görülen tularemi salgınlarına neden olan alt türün *F.tularensis subsp. holarctica* olduğu yapılan moleküler çalışmalarla kanıtlanmıştır (Kılıç, 2010). Ulu-Kılıç ve ark. (2010), seksen üç yaşındaki bir hastanın lenf nodu aspiratından PCR yöntemiyle *F.tularensis subsp. holarctica* saptamışlardır. Uyar ve ark. (2011), Çorum, Ankara, Kırşehir ve Yozgat illerinden 7 hastanın lenf bezi aspiratlarını in House PCR ile incelemişler ve 5 hastanın lenf bezi aspiratı örneğinde PCR ile pozitiflik saptamışlardır. Yapılan PCR çalışmaları ile etkenin *F.tularensis subsp. holarctica* olduğu kesinleşmiştir. Özel ve ark. (2010) tarafından Yozgat ilinde bir hastadan alınan lenf nodu aspiratında PCR yöntemiyle *F.tularensis subsp. holarctica* saptanmıştır.

Çalışmamızda 30 su örneğinden kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edilmiş ve alt tür tanımlamaya yönelik yapılan PCR sonrasında tüm örneklerin *F.tularensis subsp. holarctica* olduğu saptanmıştır.

Pazdiora ve ark. (2002), Çek Cumhuriyetinde iki su örneğinde; Berdal ve ark. (2000) Kuzey Norveç'te 4 su örneğinin 2'sinde; Berrada ve Telford (2010) ABD'nin Massachusetts eyaletinin Martha's Vineyard bölgesinde 42 su örneğinin 19'unda; Broman ve ark. (2011) İsveç'te 341 su örneğinin 108'inde; Larssen ve ark. (2011) Norveç'te 5 farklı kuyu suyundan alınan su örneklerinde PCR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının varlığını saptamışlardır.

Leblebicioğlu ve ark. (2008), 2004 yılında Amasya ilinin Suluova ilçesinde dereden aldıkları su örneklerinde; Gürcan ve ark. (2006), 2005 yılında Edirne'de üç çeşmeden alınan kaynak suyu örneklerinin birisinde; Meriç ve ark. (2008) Kocaeli ili Karamürsel ilçesi Pazarköy köyünde su deposundan ve şebekeden alınan su örneklerinde; Meric ve ark. (2010) Sakarya ilinin Kocadöngel köyünden aldıkları su örneklerinde; Otkun ve ark. (2011) Çanakkale ilinin Biga ilçesine bağlı Balıklıçeşme köyündeki 5 farklı noktadan alınan su örneklerinin 4'ünde ve Sinekçi köyündeki 11 farklı noktadan alınan su örneklerinin 4'ünden; Ulu-Kılıç ve ark. (2011) Çankırı ili Çerkeş ilçesi Kadıözü köyünden alınan 10 su örneğinin birisinde; Gürcan ve ark. (2012) Trakya bölgesinde görülen salgında 3 hastanın evinden ve dere suyundan alınan örneklerde PCR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının varlığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda tularemi olgusu görülen ve tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan toplam 300 su örneği PCR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının

varlığı yönünden araştırılmıştır. Toplam 300 su örneğinin hiç birisinde *F.tularensis* DNA'sının varlığı saptanmamıştır.

Engin ve ark. (2011), Sivas ilinde saptanan 29 tularemi olgusunu değerlendirdikleri çalışmalarında şikayetlerin başlamasından tularemi tanısı alınmaya kadar geçen sürenin ortalama 38 gün olduğunu belirtmektedirler. Çalışmamızda tularemi olgusu görülen bölgeler Sivas Sağlık Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar Şubesinden alınan veriler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bir bölgede tularemi olgusu bulunduğu belirlenmesi ve o bölgeden su örneklerinin alınması için geçen süre içerisinde su deposundaki sirkülasyondan dolayı bakteri sayısı azalmaktadır.

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 30'undan kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edilmesine rağmen aynı su örneklerinde PCR yöntemi ile bakteri DNA'sının varlığı tespit edilememiştir. Çalışmamızda 2 litre su örneğinin membran filtrelerden süzülüp filtrelerin yarısının GCBA besiyeri üzerine bırakılarak inkübe edilmesi sonucu, filtreler üzerinde 3 ila 1000 CFU arasında değişen oranlarda *F.tularensis* kolonilerinin olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edilmesine rağmen PCR yöntemi ile tespit edilemesinin nedeninin, su örneklerinde bulunan bakteri sayısının yeterli miktarda olmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Whitehouse ve Hottel, (2007), toprak örneklerinden *F.tularensis* DNA'sının geri kazanılmasında 5 farklı ticari DNA ekstraksiyon kitinin verimliliğini karşılaştırarak, toprak tipi ve ekstraksiyon yöntemine göre *F.tularensis* tespit limitinin 20-20.000 CFU/g arasında değiştiğini bildirmektedirler.

Çalışmamızda maliyetinin yüksek olması nedeni ile gerçek zamanlı PCR yöntemi yerine konvansiyonel PCR yöntemi kullanılmıştır. Tul4 gen bölgesine yönelik konvansiyonel PCR yöntemi ile, 1 ml fosfat tamponlu su içerisindeki 10^2 bakteri ve *F.tularensis* içeren 1 ml serum örneğindeki 10^3 ile 10^4 bakteri tespit edilebilmektedir (Grunow ve ark., 2000).

Johansson ve ark. (2004), gerçek zamanlı PCR'da birkaç DNA hedef bölgesinin kullanılmasının, 10-100 hücre/ml aralığında standart PCR'dan 10 kat daha duyarlı olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca Higgins ve ark. (2000) TaqMan 5' nuclease assay ve PCR-enzyme immunoassay yöntemlerinin duyarlılıklarının <100 CFU olduğunu belirtmektedirler.

Gerçek zamanlı PCR yönteminin konvansiyonel PCR yönteminden daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Ülkemizde yapılan araştırmalara bakıldığında klinik örneklerde

ve su örneklerinde *F.tularensis* DNA'sının saptanmasında, genellikle gerçek zamanlı PCR yönteminin kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda konvansiyonel PCR yöntemi kullanılmasının negatif sonuç alınmasına sebep olabileceğini düşünmekteyiz.

Çeşitli su örneklerinde *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığı ve su örneklerinden izole edilmesi ile ilgili dünyanın farklı ülkelerinde yapılmış çalışmalar bulunmakta ve farklı oranların gözlemlendiği görülmektedir.

Boost ve ark. (2008), Hong Kong'ta yaptıkları araştırmalarda banyo lavabolarından alınan 100 çeşme suyu örneğinin 10'undan (%10) *Acanthamoeba* cinsi amip izole etmişlerdir.

Lorenzo-Morales ve ark. (2005), İspanya'da 148 musluk suyu ve 60 deniz suyu örneğinde *Acanthamoeba* cinsi amip varlığını araştırmışlardır. 148 musluk suyu örneğinin 88'inden (%59.46) ve 60 deniz suyu örneğinin 24'ünden (%40) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Jeong ve Yu (2005), Kore'nin Pusan bölgesinde evlerden aldıkları 207 çeşme suyunun 12'sinden (%5.8) *Acanthamoeba* cinsi amip izole etmişlerdir.

Winck ve ark. (2011), Brezilya'da devlet ve belediyeye ait okullardan aldıkları 136 musluk suyu örneğinde özgür yaşayan amiplerin varlığını araştırmışlardır. Otuz bir su örneğinde (%22.79) özgür yaşayan amip varlığına rastlarken, bu örneklerin 13'ünün *Acanthamoeba* cinsine ait olduğunu belirtmektedirler. *Acanthamoeba* cinsi amiplerin tüm su örnekleri içerisindeki izolasyon oranı ise %9.5'tir.

Kao ve ark. (2012), Güney Tayvanda iki su havzasında yaptıkları çalışmada 211 su örneğinin 34'ünde (%16.1) *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığına rastlamışlardır.

Stockman ve ark. (2011), 1990-1992 yılları arasında 467 eve ait suları incelemişler ve evlerin %51'inden *Acanthamoeba* cinsi amip izole etmişlerdir.

Bagheri ve ark. (2010), 2007-2008 yıllarında İran'daki hastanelerden aldıkları 94 içme suyu örneğinin 45'inden (%48) *Acanthamoeba* cinsi amipleri izole etmişlerdir.

Badirzadeh ve ark. (2011), İran'da 7 kaplıcadan aldıkları 28 su örneğinin 12'sinde (%42.9) özgür yaşayan amip tespit etmişler ve 28 kaplıca suyunun birisinde (%3.6) *Acanthamoeba* cinsi amip varlığına rastlamışlardır.

Huang ve Hsu (2010), Tayvan'da 3 kaplıcadan aldıkları 52 kaynak suyu örneğinin 11'inden (%21.2) *Acanthamoeba* spp. izole etmişlerdir.

Leiva ve ark. (2008), Nicaragua'nın Leon bölgesindeki akarsular, kuyu suları, musluk suları ve su tanklarından aldıkları 178 su örneğinden %21 oranında *Acanthamoeba* spp. izole etdiklerini bildirmektedirler.

Ülkemizde çevresel örneklerden *Acanthamoeba* cinsi amiplerin izole edilmesine yönelik sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır.

Kuk ve ark. (2012), Kayseri ilinde kuyu sularında yaptıkları araştırmada 26 kuyu suyu örneğinin 5'inin (%19.23) PCR ve agar kültürü ile *Acanthamoeba* açısından pozitif olduğunu bildirmektedirler.

Kilic ve ark. (2004), Ankara'da bulunan bir askeri hastanenin değişik bölümlerindeki çiçek saksılarının topraklarından aldıkları 28 toprak örneği ve iki su örneğinde *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığını araştırmışlardır. Örneklerin tümünden *Acanthamoeba* cinsi amipler izole edilmiştir.

Özçelik ve ark. (2011), Sivas şehir merkezinden 24, ilçelerden 43, köylerden 144, kırsal alandaki kaynak sularından 25, kaplıca sularından 8, derelerden 2 ve kuyu sularından 4 olmak üzere toplam 250 su örneğinde serbest yaşayan amip türlerinin yaygınlığını araştırmışlardır. İncelenen 250 su örneğinin 75 (%30.0)'inde serbest yaşayan amip türlerine rastlanmıştır. Yapılan incelemede 250 su örneğinin 11'inin (%4.4) *Acanthamoeba* spp. olduğu belirlenmiştir. Özçelik ve ark. (2011), Türkiye'de yapılan benzer çalışmalarda çevresel ve klinik örneklerden saptanan bir prevalans değeri bulunmadığını belirtmektedirler.

Çalışmamızda tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 16'sından (%8), tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan 100 su örneğinin 12'sinden (%12) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu yapıldı. Toplam olarak 300 su örneğinin 28'inden (%9.33) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

F.tularensis dış ortam koşullarına oldukça dayanıklı olup, özellikle sudaki serbest yaşayan amipler (*Acanthamoeba castellanii*) içinde yaşamını sürdürebilmesinin, su kaynaklı epidemiler ve hastalığın bölgesel devamlılığı açısından önemli olduğu kabul edilmektedir (Greub ve Raoult, 2004; Sağlık Bakanlığı, 2011).

Amiplere dirençli bakterilerden *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli* O157, *Francisella tularensis*, , *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium leprae* ve *Mycobacterium avium* gibi bakteriler özgür yaşayan amipler içerisinde canlı kalarak yaşamlarını devam ettirebilmektedirler (Greub ve Raoult, 2004).

Legionella ve *Listeria* gibi amiplere dirençli bakterilerden bazıları amipler içerisinde çoğalmakta ve amip hücrelerini parçalayarak ortamda serbest kalmaktadırlar. Amiplere dirençli bakteriler ile enfekte amip kistleri bakterileri klor ve dezenfektanların etkisinden korumaktadır (Barker ve Brown, 1994).

Legionella pneumophila ile enfekte edilen *Acanthamoeba polyphaga*' trofozoitlerinden oluşan kistler bakteriyi en az 50 mg/l serbest klorun etkisinden korumaktadır (Kilvington ve Price, 1990).

Özgür yaşayan amipler ile bakteriler arasındaki ilişkilerin araştırılmasına yönelik çok sayıda çalışma olmasına rağmen, *Acanthamoeba* spp. ile *F.tularensis* arasındaki ilişkilerin araştırılması amacıyla yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Abd ve ark. (2003), *F.tularensis* ve *A.castellani*'nin birlikte kültürünün yapılması durumunda intrasellüler bakterilerin üç haftadan daha uzun bir süre canlılıklarını koruyabildiklerini belirtmektedirler. *F.tularensis*'in tek başına kültürünün yapılması durumunda ise iki hafta içerisinde ortamda canlı bakterinin kalmadığı belirtilmektedir.

El-Etr ve ark. (2009), *F.tularensis*'in farklı köken ve alt türlerinin *Acanthamoeba castellani* içerisine değişik oranlarda alındığı ve amip içerisinde çoğaldığını bildirmektedirler. Ayrıca *Acanthamoeba castellani*'nin patojen *F.tularensis* kökenleri ile enfekte edilmesinden sonraki 30 dakika içerisinde amibin hücre içi veziküllerinde bulunduğu tespit edilmiştir. *Acanthamoeba castellani* kistlerinden 21 gün sonra canlı bakteri elde edilebildiği bildirilmektedir.

Shanan ve ark. (2011), Sudan'da koleranın endemik olduğu bölgelerden aldıkları 400 su örneğinde PCR yöntemi ile *Vibrio cholerae* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığını araştırmışlardır. 400 su örneğinin 8'inden (%2) *Acanthamoeba* ve *V.cholerae*, 13'ünden (%3.25) yalnızca *Acanthamoeba*, bir su örneğinden de (%0.25) yalnızca *V.cholerae* tespit etmişlerdir.

İstanbul'daki 61 eve ait duş başlıklarından alınan sıcak su ve sürüntü örnekleri *L.pneumophila* ve özgür yaşayan amipler açısından incelenmiştir. İncelenen evlerin %21,3'ünden *L. pneumophila*, % 31'inden özgür yaşayan amip izole edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre *L.pneumophila* ve ÖYA ların varlığı arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır (Burak ve Zeybek, 2011).

Penland ve Wilhelmus, (1997, 1998), *Acanthamoeba* cinsi amiplerin BCYE besiyerinde üreyebildiklerini bildirmektedirler. Çalışmamızda *Acanthamoeba* cinsi amipler ile *F.tularensis* arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla BCYE besiyeri kullanılmıştır. BCYE besiyerinin aynı zamanda *F.tularensis*'in izolasyonunda kullanılan bir besiyeri olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda tularemi olgusu görülen ve görülmeyen bölgelerden alınan toplam 300 su örneğinden BDOA ortamında 28 (%9.33) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu yapıldı. 28 *Acanthamoeba* izolatı BCYE besiyerine aktarılarak amiplerin üremesi

sağlandı. Amiplerin BCYE besiyerinde üremeleri sırasında besiyeri üzerinde *F.tularensis* kolonilerinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi. Toplam 28 *Acanthamoeba* izolatu BCYE besiyerinde üremesine rağmen, hiç *F.tularensis* kolonisi oluşumu gözlemlenmedi. Ayrıca amiplerden DNA izolasyonu yapıldı ve PCR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının varlığı yönünden incelendi. Amiplerde *F.tularensis* DNA'sının varlığına da rastlanmadı.

Çalışmamızda tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 30'undan (%15) *F.tularensis* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yalnızca 2 (%1) su örneğinde *Acanthamoeba* cinsi amip ve *F.tularensis* birlikte izole edilmiştir. Tularemi olgusu görülen bölgeler ve tularemi olgusu görülmeyen bölgelerdeki su örneklerinde, *Acanthamoeba* cinsi amip görülme sıklığı yönünden istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tularemi hastalığında insanlardaki enfeksiyöz doz bakterinin vücuda giriş yerine göre farklılıklar göstermektedir. Deriden veya solunum yolu ile 10-50 bakterinin alınması enfeksiyona neden olurken, sindirim yolu ile alınan bakterinin enfeksiyon oluşturması için gereken bakteri sayısı en az 10^8 'dir (Oral, 2009).

Tokgöz ve Golem, (1938), enfekte hayvanların safra ve idrarları ile bakteriyi etrafa yaymalarının epidemiyolojik açıdan önemli olduğunu belirtmektedirler. Yüzey sularının kontaminasyonu enfekte hayvanların idrar ve dışkıları ile olmaktadır. Ayrıca tularemiden ölen hayvanların karkasları da suları kontamine etmektedir. Deneysel çalışmalara göre enfekte bir su faresi veya sıçan 500.000 litre suyu kontamine edebilmektedir. Su kontamine olduğunda kan emen sinekler, vertebralı hayvanlar ve insanlar için kontaminasyon kaynağı olarak görev yapabilir. Sudaki *F.tularensis* yoğunluğu litrede 100-1000 arasına ulaştığında farelerin %50'si, organizma sayısı litrede 10.000 olduğunda farelerin %90'ı enfekte olmaktadır (Şahin, 2009).

F.tularensis hayvan ölümlerinde uzun süre yaşayabilmektedir. İçme suyu kaynaklarında veya yakınlarında bulunabilen enfekte hayvan ölümleri içme sularını uzun süre kontamine edebilmekte ve insanlarda salgınlar şeklinde enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Çınar, 2009).

Broman ve ark. (2011), insan vakası görülmeyen bölgelerden alınan su örneklerinden *F.tularensis subsp. holarctica* tespit ettiklerini bildirmektedirler.

Ülkemizde son yıllarda tularemi vakalarında artış, bazı ekolojik dengelerin değişmesi ile izah edilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda özellikle yağışlı sezonlardan sonra kemirici popülasyonundaki artışın tularemi vaka sayısının artmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ancak, ülkemizde tularemi vakalarının kümelenme eğilimi ve genel

olarak küçük çaplı su kaynaklı salgınlar şeklinde görülmesi nedeniyle kemiricilerin su kaynağına teması en önemli etken olarak görülmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2011).

Sonuç olarak ilimizde tularemi olgularının görüldüğü bölgelerden alınan su örneklerinde, kültür yöntemi ile *F.tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığı ortaya konmuştur. Su örneklerinde kültür yöntemi ile *F.tularensis* üretilmesine rağmen konvansiyonel PCR yöntemi ile *F.tularensis* DNA'sının varlığı saptanamamıştır. Kültür yönteminin *F.tularensis* izolasyonunda altın standart olduğu bir kez daha doğrulanmıştır. Su örneklerinden *F.tularensis* üretilmesi ilimizde görülen tularemi olgularının su kaynaklı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda *Acanthamoeba* cinsi amiplerin *F.tularensis* bakterisine ev sahipliği yaptığı yönünde bir ilişki kurulamamış olup *Acanthamoeba* cinsi amiplerin tularemi epidemiyolojisindeki yerleri hakkında yeni çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Sivas il merkezi, ilçeler ve köylerinden alınan su örneklerinde bakteriyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak *F.tularensis* ve *Acanthamoeba* cinsi amiplerin varlığı ortaya konuldu. Tularemi olgusu görülen bölgelerden 200, tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden 100 olmak üzere toplam 300 su örneği çalışmada kullanıldı. Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 30'undan (%15) kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edildi. Tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan 100 su örneğinde *F.tularensis* izole edilmedi.

Konvansiyonel PCR yöntemi ile *F.tularensis* izolatlarının *F.tularensis subsp. holarctica* alt türü oldukları saptandı.

Toplam 300 su örneğinde konvansiyonel PCR yöntemi ile *F.tularensis* varlığı araştırıldı. Su örneklerinde *F.tularensis* DNA'sının varlığına rastlanmadı.

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 16'sından (%8), tularemi olgusu görülmeyen bölgelerden alınan 100 su örneğinin 12'sinden (%12) *Acanthamoeba* cinsi amip izolasyonu yapıldı. Toplam 300 su örneğinden 28 (%9.33) *Acanthamoeba* izolatu elde edildi.

Acanthamoeba izolatları BCYE besiyerine aktararak *F.tularensis* üretilmeye çalışıldı. *Acanthamoeba* izolatlarından kültür yöntemi ile *F.tularensis* izole edilmedi. Konvansiyonel PCR yöntemi ile *Acanthamoeba* izolatlarında *F.tularensis* DNA'sının varlığına rastlanmadı.

Tularemi olgusu görülen bölgelerden alınan 200 su örneğinin 2'sinde (%1) *Acanthamoeba* cinsi amip ve *F.tularensis* birlikte izole edildi.

Ülkemizde, tularemi olgularının çoğunlukla kırsal alanlarda görüldüğü ve hastalığın su kaynaklı olduğu bilinmektedir. Su kaynaklı tularemi salgınlarına özellikle ülkemizde rastlanıyor olması düşündürücüdür.

Su kaynaklarının hastalık etkenini taşıyan kemiriciler tarafından kontamine edildiği bilinmekle birlikte hastalığın rezervuar veya rezervuarlarının araştırılmasına yönelik çalışmaların yapılması faydalı olacaktır.

Kırsal alanlarda yer alan köy su depolarının temizlik ve bakımlarının düzenli olarak yapılması, su kaynaklarının koruma altına alınması, içme ve kullanma sularına yeterli derecede dezenfeksiyon işlemi uygulanması ve halkın tularemi hastalığı hakkında bilinçlendirilmesi önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandström, G., Forsman, M. (2003). Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*, Appl Environ Microbiol, 69 (1), 600-606.
- Akalın, H., Helvacı, S., Gedikoğlu, S. (2009). Re-emergence of tularemia in Turkey, Int J Infect Dis, 13 (5), 547-551.
- Akın Polat, Z., Özçelik, S., Vural, A., Saygı, G. (2007). Akselik Kültürlerde *Acanthamoeba* Trofozoitleri Üzerindeki Gözlemler ve Bunların Farklı Boyalarla Boyanma Özellikleri, Türkiye Parazitolojisi Dergisi, 31 (1), 7-13.
- Amann, R., Springer, N., Schönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E.N., Müller, K.D., Michel, R. (1997). Obligat Intracellüler Bakteriyel Parazitler of *Acanthamoeba* related to *Chlamydia* spp., Appl Environ Microbiol, 63 (1), 115-21.
- Aydemir, H. (2009). Tularemide Ayırıcı Tanı. *Francisella tularensis* ve Tularemisi, Gürçan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 245-255.
- Ayoğlu, F.N. (2009). Tularemide Halk Sağlığı Yaklaşımları. *Francisella tularensis* ve Tularemisi, Gürçan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 223-244.
- Badirzadeh, A., Niyyati, M., Babaei, Z., Amini, H., Badirzadeh, H., Rezaeian, M. (2011). Isolation of Free-Living Amoebae from Sarein Hot Springs in Ardebil Province, Iran, Iranian J Parasitol, 6 (2), 1-8.
- Bagheri, H.R., Shafiei, F., Sajjadi, S.A. (2010). Isolation of *Acanthamoeba* spp. From Drinking Waters in Several Hospitals of Iran, Iranian J Parasitol, 5 (2), 19-25.
- Baker, C.N., Hollis, D.G., Thornsberrry, C. (1985). Antimicrobial Susceptibility Testing of *Francisella tularensis* with a Modified Mueller-Hinton Broth, J Clin Microbiol, 22 (2), 221-225.
- Barker, J. ve Brown, R.W. (1994). Trojan Horses of the microbial world : protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment, Microbiology, (140), 1253-1259.
- Berdal, B.P., Mehl, R., Haaheim, H., Loksa, M., Grunow, R., Burans, J., Morgan C., Meyer H. (2000). Field detection of *Francisella tularensis*, Scand J Infect Dis, 32 (3), 287-291.
- 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), 551-553.
- Berrada, Z.L. ve Telford, S.R. (2010). Diversity of *Francisella* Species in Environmental Samples from Martha's Vineyard, Massachusetts, Microb Ecol, 59 (2), 277-283.
- Bevanger, L., Maeland, J.A., Naess, A.I. (1988). Agglutinins and Antibodies to *Francisella tularensis* Outer Membrane Antigens in the Early Diagnosis of Disease during an Outbreak of Tularemia, J Clin Microbiol, 26 (3), 433-437.
- Bıçakçı, Z. ve Öztürk, B. (2008). İki Yaşında Bir Çocuğa Sığır (İnek) Salyasından Tularemisi Bulaşımı: Uzun Erimli İzlemi ile Vaka Sunumu, Çocuk Dergisi, 8 (3), 197-199.
- Boost, M., Cho, P., Lai, S., Sun, W.M. (2008). Detection of *Acanthamoeba* in Tap Water and Contact Lens Cases Using Polymerase Chain Reaction, Optom Vis Sci, 85 (7), 526-530.

- Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Byström, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W., Forsman, M. (2003). Genome-Wide DNA Microarray Analysis of *Francisella tularensis* Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *J Clin Microbiol*, 41 (7), 2924-2931.
- Broman, T., Thelaus, J., Andersson, A.C., Backman, S., Wikström, P., Larsson, E., Granberg M., Karlsson, L., Back, 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, 1-10.
- Burak, D.M. ve Zeybek, Z. (2011). Investigation of *Legionella pneumophila* and free living amoebas in the domestic hot water systems in İstanbul, *Türk J Biol* , 35, 679-685.
- Byström, M., Böcher, S., Magnusson, A., Prag, J., Johansson, A. (2005). Tularemia in Denmark: Identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* Strain by Real-Time PCR and High-Resolution Typing by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis, *J Clin Microbiol*, 43 (10), 5355-5358.
- Capellan, J. ve Fong, IW. (1993). Tularemia from a cat bite: case report and review of feline-associated tularemia, *Clin Infect Dis*, 16 (4), 472-475.
- CDC. (2002). Tularemia United States 1999-2000, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (51), 181-184.
- Cerny, Z. (2001). Changes of epidemiology and the clinical picture of tularemia in Southern Moravia (the Czech Republic) during the period 1936-1999, *Eur J Epidemiol*, 17 (7), 637-642.
- Chitadze, N., Kuchuloria, T., Clark, D.V., Tsertsvadze, E., Chokheli, M., Tsertsvadze, N., Trapaidze, N., Lane, A., Bakanidze, L., Tsanova, S., Hepburn, M.J., Imnadze, P. (2009). Water-Borne Outbreak of Oropharyngeal and Glandular Tularemia in Georgia: Investigation and Follow-up, *Infection* , 37 (6), 514-521.
- Christova, I., Velinov, T., Kantardjiev, T., Galev, A. (2004). Tularemia outbreak in Bulgaria, *Scand J Infect Dis*, 36 (11-12), 785-789.
- Corsaro, D. ve Venditti, D. (2011). More Acanthamoeba Genotypes: Limits to the Use of rDNA Fragments to Describe New Genotypes, *Acta Protozool*, 50 , 49-54.
- Çelebi, G., Baruönü, F., Ayoğlu, F., Çınar, 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 (4), 229-234.
- Çınar, F. (2009). KBB Pratiğinde Tularemi. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 217-221.
- Dahlstrand, S., Ringertz, O., Zetterberg, B. (1971). Airborne tularemia in Sweden, *Scand J Infect Dis*, 3 (1), 7-16.
- Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friendlander, A.M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S.R., McDade, J.E., Osterholm, M.T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., Tonat, K. (2001). Tularemia as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management, *JAMA* , 285 (21), 2763-2773.
- Dikici, N., Ural, O., Sümer, Ş., Öztürk, K., Yiğit, Ö.A., Katlanır, E., Keleş, B. (2012). Konya Bölgesinde Tularemi, *Mikrobiyol Bul* , 46 (2), 225-235.
- Dirik, K. (1939). Van Gölü Havzasında Tularemi, *Türk Hij Tec Biol Derg*, 2, 193-195.

- El-Etr, S.H., Margolis, J.J., Monack, D., Robison, R.A., Cohen, M., Moore, E., Rasley, A. (2009). *Francisella tularensis* Type A Strains Cause the Rapid Encystment of *Acanthamoeba castellanii* and Survive in Amoebal Cysts for Three Weeks Postinfection, *Appl Environ Microbiol*, 75 (23), 7488-7500.
- 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, *Emerging Infect Dis*, 8 (9), 956-960.
- Eliasson, H., Broman, T., Forsman, M., Back, E. (2006). Tularemia: current epidemiology and disease management, *Infect Dis Clin North Am*, 20 (2), 289-311.
- Ellis, J., Oyston, P.C.F., Green, M., Titbal, R.W. (2002). Tularemia, *Clin Microbiol Rev*, 15 (4), 631-646.
- Engin, A., Altuntaş, E.E., Cankorkmaz, L., Kaya, A., Elaldı, N., Şimşek, H., Dökmetaş, İ., Bakır, M. (2011). Sivas İlinde Saptanan İlk Tularemi Salgını: 29 Olgunun Değerlendirilmesi, *Klimik Dergisi*, 24 (1), 17-23.
- Feldman, K.A., Ensore, R.E., Lathrop, S.L., Matyas, B.T., McGuill, M., Schriefer, M.E., Stiles-Enos, D., Dennis, D.T., Petersen, L.R., Hayes, E.B. (2001). An Outbreak of Primary Pneumonic Tularemia on Martha' Vineyard, *N Engl J Med*, 345 (22), 1601-1606.
- Feldman, K.A., Stiles-Enos, D., Julian, K., Matyas, B.T., Telford, S.R., Chu, M.C., Petersen, L.R., Hayes, E.B. (2003). Tularemia on Martha' Vineyard: Seroprevalance and Occupational Risk, *Emerging Infect Dis*, 9 (3), 350-354.
- Forbes, BA, Sahm, DF., Weissfeld, AS., (eds.) (2007). *Francisella* (Chapter 40), *Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th Edition: Mosby Elsevier Press, St. Louis, Missouri, p.440-443.
- Francis, E. (1921). The occurrence of Tularemia in nature as a disease of man, *Public Health Rep*, 36, 1731-1753.
- Gedikoğlu, S. (1996). *Francisella tularensis* isolation from various clinical specimen, *Clin Microbiol Infect*, 2 (3), 233-235.
- Golem, S.B. (1940). Soğuk Kanlı Hayvanlarda Tularemi, *Türk Hıfzıssıhha ve Tecrübi Biyoloji Mecmuası*, 2 (1), 177-83.
- Golem, S.B. (1945). Lüleburgaz'da yeni bir Tularemi epidemisi, *Türk Hij Tec Biol Derg*, 5, 27-38.
- Gotschlich, E. ve Berkin, T. (1938). 1936 yılında Trakya'da Tularemiye ait yapılan epidemiyolojik ve bakteriyolojik araştırmalar, *Türk Hij Tec Biol Derg*, 1 (1), 115-123.
- Greco, D., Allegrini, G., Tizzi, T., Ninu, E., Lamanna, A., Luzi, S. (1987). A Waterborne Tularemia Outbreak, *Eur J Epidemiol*, 1 (3), 35-38.
- Greub, G. ve Raoult, D. (2004). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae, *Clin Microbiol Rev*, 17 (2), 413-433.
- Grunow, R., Spletstoeser, W., McDonald, S., Otterbein, C., O'Brien, T., Morgan, C., Aldrich, J., Hofer, E., Finke, E.J., Meyer, H. (2000). Detection of *Francisella tularensis* in Biological Specimens Using a Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, an Immunochromatographic Handheld Assay, and a PCR, *Clin Diagn Lab Immunol*, 7 (1), 86-90.
- Gürcan, Ş., Tatman-Otkun, M., Otkun, M., Arıkan, O.K., Ozer, B. (2004). An outbreak of Tularemia in Western Black Sea Region of Turkey, *Yonsei Med J*, 45 (1), 17-22.

- Gürcan, Ş., Eskiocak, M., Varol, G., Uzun, C., Tatman-Otkun, M., Şakru, N., Karadenizli, A., Karagöl, Ç., Otkun, M. (2006). Tularemia reemerging in European Part of Turkey after 60 Years, *Jpn J Infect Dis*, (59), 391-393.
- Gürcan, Ş. (2007). *Francisella tularensis* ve Türkiye’de Tularemi, *Mikrobiyol Bül*, 41 (4), 621-636.
- Gürcan, Ş., Karabay, O., Karadenizli, A., Karagöl, Ç., Kantardjiev, T., Ivanov, I.N. (2008). Characteristics of the Turkish Isolates of *Francisella tularensis*. *Jpn J Infect Dis*, 61 (3), 223-225.
- Gürcan, Ş. (2009a). Serumda Tularemi Antikorlarının Dinamiği. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 201-203.
- Gürcan, Ş. (2009b). Serolojik Tanı Yöntemleri. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 269-272.
- Gürcan, Ş., Saraçoğlu, G.V., Karadenizli, A., Özkayın, E.N., Öztürk, Ş.Z., Çiçek, C., Vatanserver, B. (2012). Tularemia as a result of outdoor activities for children in the countryside, *Turk J Med Sci*, 42 (6), 1044-1049.
- Harris, S. (1992). Japanese biological warfare research on humans: a case study of microbiology and ethics, *Ann N Y Acad Sci*, 31 (666), 21-52.
- Helvacı, S. (2009). Tularemi Klinik Özellikler. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 205-207.
- Helvacı, S., Gedikoğlu, S., Akalın, H., Oral, HB. (2000). Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years, *Eur J Epidemiol*, 16 (3), 271-276.
- Higgins, J.A., Hubalek, Z., Halouzka, J., Elkins, K.L., Sjöstedt, A., Shipley, M., Ibrahim, M.S. (2000). Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction, *Am J Trop Med Hyg*, 62 (2), 310-318.
- Hopla, C.E. (1974). The ecology of tularemia, *Adv Vet Sci Comp Med*, 18, 25-53.
- Huang, S.W. ve Hsu, B.M. (2010). Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR, *Acta Trop*, 115 (3), 282-287.
- Hubalek, Z., Treml, F., Halouzka, J., Juricova, Z., Hunady, M., Janik, V. (1996). Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularemia, *Med Vet Entomol*, 10 (3), 241-246.
- Hubalek, Z., Sixl, W., Halouzka, J. (1998). *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic and Austria, *Wien Klin Wochenschr*, 110 (24), 909-910.
- Isherwood, K.E., Titball, R.W., Davies, D.H., Felgner, P.L., Morrow, W.J. (2005). Vaccination strategies for *Francisella tularensis*, *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (9), 1403-1414.
- Jensen, W.A. ve Kirsch, C.M. (2003). Tularemia, *Semin Respir Infect*, 18 (3), 146-158.
- Jeong, H.J. ve Yu, H.S. (2005). The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea, *Korean J Parasitol*, 43 (2), 47-50.
- Johansson, A., Ibrahim, A., Göransson, I., Eriksson, U., Gurycova, D., Clarridge, J.E., Sjöstedt, A. (2000). Evaluation of PCR-Based Methods for Discrimination of *Francisella* Species and Subspecies and Development of a Specific PCR That Distinguishes the Two Major Subspecies of *Francisella tularensis*, *J Clin Microbiol*, 38 (11), 4180-4185.
- Johansson, A., Forsman, M., Sjöstedt, A. (2004). The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. *APMIS* 112 (11-12), 898-907.

- John, D.T. (1998). Opportunistic Amoebae, "Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections" içinde, 9th ed, Vol.5, Edward Arnold Ltd. London. p. 179-192.
- Kantardjiev, T. ve Velinov, T. (1995). Interaction between Protozoa and microorganisms of the Genus *Francisella*, Problems of Infectious Disease, 22, 34-35.
- Kantardjiev, T., Ivanov, I., Velinov, T., Padeshki, P., Popov, B., Nenova, R., Mincheff, M. (2006). Tularemia Outbreak Bulgaria 1997-2005, Emerg Infect Dis , 12 (4), 678-680.
- Kao, P.M., Hsu, B.M., Chen, N.H., Huang, K.H., Huang, C.C., Ji, D.D., Chen, J.S., Lin, W.C., Huang, S.W., Chiu, Y.C. (2012). Molecular detection and comparison of *Acanthamoeba* genotypes in different functions of watersheds in Taiwan, Environ Monit Assess , 184 (7), 4335-4344.
- Karadenizli, A., Gürcan, Ş., Kolaylı, F., Vahaboğlu, H. (2005). Outbreak of tularemia in Golcuk, Turkey in 2005: Report of 5 cases and overview of literature from Turkey, Scand J Infect Dis, 37 (10), 712-726.
- Karadenizli, A. (2009). Moleküler Tanı ve Tiplendirme Yöntemleri. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 283-288.
- Karahan, Z.C. ve Kılıç, S. (2009). Tanı için Örneklerin Alınması, Saklanması ve Taşınması. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 259-268.
- Kaygusuz, S., Arikan, O., Azkur, K., Simsek, H., Gazyagci, S., Muluk, N., Taner, M., Gozutok, S., Toyran, K., Meydaneri, E., Ediz, C., Erol, O., Cirpar, O.C., Ecemis, K., Celebi, B., Agalar, C., Ertek, M. (2010). Epidemia of Tularemia in Central Anatolia, J Anim Vet Adv, 9 (12), 1702-1706.
- Khan, N.A. (2006). Acanthamoeba :biology and increasing importance in human health, FEMS Microbiol Rev, 30(4), 564-595.
- Kılıç, S. (2005). Tularemi, RSHM Aylık Epidemiyoloji Raporu, 4 (4), 146-1499.
- Kılıç, S. (2006). Biyolojik Silah Olarak Bakteriler: "Kategori A Ajanlar", Türk Hij Den Biyol Derg, 63 (1,2,3), 37-46.
- Kılıç, S. (2009). Tularemi Türkiye'nin Hedefi ve Beklentileri. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 311-316.
- Kılıç, S. (2010). A General Overview of *Francisella tularensis* and the Epidemiology of Tularemia in Turkey, FLORA , 15 (2), 37-58.
- Kılıç, S. ve Yeşilyurt, M. (2011). Tularemi: Güncel Tedavi Seçeneklerine Genel Bir Bakış, Klimik Dergisi , 24 (1), 2-10.
- Kilic, A., Tanyuksel, M., Sissons, J., Jayasekera, S., Khan, N. (2004). Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey, Acta Parasitologica , 49 (3), 246-252.
- Kilvington, S. ve Price, J. (1990). Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure, J Appl Bacteriol , 68 (5), 519-25.
- Klock, L.E., Olsen, P.F., Fukushima, T. (1973). Tularemia epidemic associated with the deerfly, JAMA, 226 (2), 149-52.
- Kolaylı, F. (2009). *Francisella tularensis* Kültürü ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 273-281.
- Koskela, P., Salminen, A. (1985). Humoral immunity against *Francisella tularensis* after Natural Infection, J Clin Microbiol, 22 (6), 973-979.

- Kuk, S., Yazar, S., Dogan, S., Cetinkaya, U., Sakalar, C. (2012). Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water, Turk J Med Sci, (Yayın aşamasında).
- Larsen, K.W., Afset, J.E., Heier, B.T., Krogh, T., Handeland, K., Vikoren, T., Bergh, K. (2011). Outbreak of tularaemia in central Norway, January to March 2011, Euro Surveill, 16 (13), 1-3.
- Leblebicioglu, 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 (3), 265-269.
- Leiva, B., Cladotter, E., Linder, E., Winiecka-Krusnell, J. (2008). Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of León, Nicaragua, Rev Biol Trop, 56 (2), 439-446.
- Liles, W.C. ve Burger, R.J. (1993). Tularemia from domestic cats, West J Med, 158 (6), 619-622.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martinez, E., Valladares, B. (2005). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources, Parasitol Res, 95 (4), 273-277.
- Maral, I., Eskiocak, M., Kurt, A. (2012). Bulaşıcı Hastalıklar Bölümü. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği Türkiye Halk Sağlığı Raporu, Ertem, M., İnandı, T., Çan, G., Ergör, A., Şaşmaz, T., Ayoğlu, F., Kaya, M. (Eds.), HASUDER.
- Marciano-Cabral, F. ve Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans, Clin Microbiol Rev, 16 (2), 273-307.
- Martinez, A.J., Visvesvara, G.S. (1997). Free-living, amphizoic and opportunistic amebas, Brain Pathol, 7(1), 583-598.
- McChesney, T.C. ve Narain, J. (1983). A five-year evaluation of tularemia in Arkansas, J Ark Med Soc, 80 (6), 257-262.
- McLendon, M.K., Apicella, M.A., Allen, L.A. (2006). *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics and Immunopathogenesis of a Potential Agent, Annu Rev Microbiol, 60, 167-185.
- Meric, M., Sayan, M., Dünder, D., Willke, A. (2010). Tularaemia outbreaks in Sakarya, Turkey: case-control and environmental studies, Singapore Med J, 51 (8), 655-659.
- Meriç, M., Sayan, M., Wilke, A., Gedikoğlu, S. (2008). Su kaynaklı küçük bir tularemi salgını, Mikrobiol Bul, 42, 49-59.
- Meriç, M. (2009). Aşı Çalışmaları. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 306-310.
- Mikalsen J, Olsen, A.B., Tengs, T., Colguhoun, D.J. (2007). *F.philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp nov., isolated from farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.), Int J Syst Evol Microbiol, 57 (9), 1960-1965.
- Mörner, T. (1992). The ecology of tularemia, Rev Sci Tech, 11 (4), 1123-1130.
- Münnich, D. ve Lakatos, M. (1979). Clinical, epidemiological and therapeutical experience with human tularemia: the role of hamster hunters, Infection, 7 (2), 61-63.
- Neumeister, B., Schöniger, S., Faigle, M., Eichner, M., Dietz, K. (1997). Multiplication of different Legionella species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*, Appl Environ Microbiol, 63 (4), 1219-1224.
- Nigroviç, L.E. ve Wingerter, S.L. (2008). Tularemia, Infect Dis Clin North Am, 22 (3), 489-504.
- Ohara, H. (1926). Experimental inoculation of disease of wild rabbits into the human body and its bacteriological study, Jpn Med World, 6, 299-304.

- Ohara, Y., Sato, T., Homma, M. (1996). Epidemiological analysis of tularemia in Japan (yato-byo), *FEMS Immunol Med Microbiol*, 13 (3), 185-189.
- Ohara, Y., Sato, T., Homma, M. (1998). Arthropod-borne tularemia in Japan: clinical analysis of 1374 cases observed between 1924 and 1996, *J Med Entomol*, 35 (4), 471-473.
- Ohara, Y., Sato, T., Fujita, H., Ueno, T., Homma, M. (1991). Clinical manifestations of tularemia in Japan analysis of 1355 cases observed between 1924 and 1987, *Infection*, 19 (1), 14-17.
- ONUL, B. (1980). Tularemi, İnfeksiyon Hastalıkları, Ankara Üniversitesi Basımevi, Sayı:391, 6. Baskı, Ankara.
- Oral, B. (2009). Tularemi İmmünopatogenezi ve Patolojisi. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 193-200.
- Otkun, M.T., Akçalı, A., Karadenizli, A., Özbey, N., Gazel, D., Şener, A., Güçlü, O., Tanrıöver, A., Otkun, M. (2011). Çanakkale’de Hızla Önlenebilir Bir Tularemi Salgınının Epidemiyolojik Olarak Değerlendirilmesi, *Mikrobiyol Bul*, 45 (1), 48-57.
- Ottom KF, Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Moller, A., Krossoy, B., Knappskog, D. (2007). New Species in the Genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. Isolated from Cod (Gadus Morhua), *Arch Microbiol*, 188 (5), 547-550.
- Özçelik, S., Coşkun, K., Yünlü, Ö., Alim, A. (2011). Potansiyel Patojen Serbest Yaşayan Amip Türlerinin Çevresel Su Kaynaklarından İzolasyonu Yaygınlığı ve Morfotiplendirmesi, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Parazit Hastalıklar Sempozyumu Program ve Özet Kitabı, Kafkas Üniversitesi, 4-10 Eylül, (s. 193), Kars/Türkiye.
- Özel, G., Arslan, İ.B., Yeşilyurt, M., Çelebi, B., Kılıç, S. (2010). *Francisella tularensis*'in İnsan Kanlı Agarda İzole Edilmesiyle Tanımlanan Bir Orofarengeal Tularemi Olgusu, *Mikrobiyol Bul*, 44 (4), 657-63.
- Özel, T. (1938). Talat Vasfi özel'in 1937 yılı yazında Trakya'da tularemi tetkikatı. *Türk Hij Tec Biyol Derg*, 1 (1), 158-184.
- Pazdiora, P., Moravkova, I., Nocarova, D., Velkoborska, M., Valeckova, K. (2002). A water-borne epidemic of tularemia in Chlumcany, *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 51 (1), 23-25.
- Penland, R.L. ve Wilhelmus, K.R. (1997). Comparison of Axenic and Monoxenic Media for Isolation of *Acanthamoeba*, *J Clin Microbiol*, 35(4), 915-922.
- Penland, RL. ve Wilhelmus, KR. (1998). Laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using buffered charcoal-yeast extract agar, *Am J Ophthalmol*, 126 (4), 590-592.
- Penn R.L. (2005). *Francisella tularensis* (Tularemia). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell, G.L, Bennett, J.E, Dolin, R. (eds.) 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 2674-2685.
- Petersen, J.M. ve Schriefer, M.E. (2005). Tularemia: emergence/reemergence, *Vet Res*, 36 (3), 455-467.
- Porsch-Özcürümez, M., Kischel, N., Priebe, H., Splettstösser, W., Finke, E.J., Grunow, R. (2004). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia, *Clin Diagn Lab Immunol*, 11 (6), 1008-1015.

- Reintjes, R., Dedushaj, I., Gjini, A., Jorgensen, T.R., Cotter, B., Lieftucht, A., D'Ancona, F., Dennis, D.T., Kosoy, M.A., Mulligi-Osmeni, G., Grunow, R., Kalaveshi, A., Gashi, L., Humolli, I. (2002). Tularemia Outbreak Investigation in Kosovo: Case Control and Environmental Studies, *Emerg Infect Dis*, 8 (1), 69-73.
- Sağlık Bakanlığı. (2005). Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Sağlık Bakanlığı. (2011). Tularemi Hastalığının Kontrolü için Saha Rehberi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı. Ankara.
- Sarıcı, G. ve Altınyazar, C. (2009). Tulareminin Deri Bulguları. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 209-212.
- Saygı, G. ve Polat, Z. (2003). Özgür Yaşayan Amipler ve Neden Oldukları Parazitler (Primer Amibik Meningoensefalit-Granülomatöz Amibik Ensefalit-Keratit), C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 25 (3), 140-149.
- Scheel, O., Sandvik, T., Hoel, T., Aasen, S. (1992). Tularemia in Norway: a clinical and epidemiological review, *Tidsskr Nor Laegeforen*, 112(5), 635-637.
- Scheel, O., Hoel, T., Sandvik, T., Berdal, B.P. (1993). Susceptibility pattern of Scandinavian *Francisella tularensis* isolates with regard to oral and parenteral antimicrobial agents, *APMIS*, 101 (1), 33-36.
- Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J. (2001). Use of Subgenetic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge, *J Clin Microbiol*, 39 (5), 1903-1911.
- Schuster, F.L. (2002). Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas, *Clin Microbiol Rev*, 15(3), 342-354.
- Shanan, S., Abd, H., Hedenström, I., Saeed, A., Sanström, G. (2011). Detection of *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba* species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan, *BMC Res Notes*, 4 (109), 1-4.
- Sivas Sağlık Müdürlüğü. (2012). Sivas Sağlık Müdürlüğü, Bulaşıcı Hastalıklar Şubesi Verileri (Yayınlanmamış veri)
- Sjöstedt, A., Eriksson, U., Berglund, L., Törnvik, A. (1997). Detection of *Francisella tularensis* in Ulcers of Patients with Tularemia by PCR, *J Clin Microbiol*, 35 (5), 1045-1048.
- Sjöstedt, A. (2007). Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology and clinical manifestations, *Ann N Y Acad Sci*, 1105, 1-29.
- Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F. (1998). *Mycobacterium avium* Bacilli Growth Saprozoically in Coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and Survive within Cyst Walls, *Appl Environ Microbiol*, 64(6), 2256-2261.
- Stockman, L.J., Wright, C.J., Visvesvara, G.S., Fields, B.S., Beach, M.J. (2011). Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA--1990-1992, *Parasitol Res*, 108(3), 621-627.
- Syrjala, H., Kujala, P., Myllyla, V., Salminen, A. (1985). Airborne transmission of tularemia in farmers, *Scand J Infect Dis*, 17(4), 371-375.
- Şahin, İ. (2009). Tulareminin Genel Epidemiyolojik Özellikleri. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 89-93.

- Şahin, M. (2009). *Francisella tularensis*'in Vektörleri ve Doğal Rezervuarları. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 139-160.
- Şeyda, T. (1996). Kars Bölgesinde Koyunlarda Tularemi İnfeksiyonunun İnsidensi Üzerinde Serolojik ve Kültürel Çalışmalar, *Kafkas Üniv Veteriner Fak Derg*, 2 (1), 49-60.
- Şimşek, 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), 2353-2357.
- Tarnvik, A. ve Berglund, L. (2003). Tularemia, *Eur Respir J*, 21(2), 361-373.
- Tarnvik, A., Priebe, H.S., Grunow, R. (2004). Tularemia in Europe: an epidemiological overview, *Scand J Infect Dis*, 36(5), 350-355.
- Tarnvik, A. ve Chu, M.C. (2007). New approaches to diagnosis and therapy of tularemia, *Ann N Y Acad Sci*, 1105, 378-404.
- Tokgöz, SK. ve Golem, SB. (1938). Tularemi laboratuvar araştırmaları, *Türk Hıfzıssıhha ve Tecrübi Biyoloji Mecmuası*, 1 (1), 137-54.
- Ulu-Kılıç, A., Çiçek-Şentürk, G., Tütüncü, E.E., Kılıç, S., Altay, F.A., Gürbüz, Y., Şencan, I. (2010). Atipik Bulgularla Seyreden İki Tularemi Olgusu, *Klinik Dergisi*, 23 (3), 120-123.
- Ulu-Kılıç, A., Kılıç, S., Şencan, İ., Şentürk, G.Ç., Gürbüz, Y., Tütüncü, E.E., Çelebi, B., Kıcıman, Ö., Ergönül, Ö. (2011). İç Anadolu Bölgesinde *Francisella tularensis* alt tür *halorctica*'ya Bağlı Su Kaynaklı Bir Tularemi Salgını, *Mikrobiyol Bul*, 45(2), 234-247.
- Utku, İ.E. (1954). Antalya'da Tularemi epidemisi ve hususiyetleri, *Türk Hij Tec Biol Der*, 14(2), 288-291.
- Uyar, M., Cengiz, B., Ünlü, M., Çelebi, B., Kılıç, S., Eryılmaz, A. (2011). Orta Anadolu Bölgesi İllerinden Hastanemize Başvuran Orofaringeal Tularemi Olgularının Değerlendirilmesi, *Mikrobiyol Bul*, 45(1), 58-66.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 50 (1), 1-26.
- Wang, Y., Hai, R., Zhang, Z., Xia, L., Cai, H., Liang, Y., Shen, X., Yu, D. (2010). Genetic Relationship between *Francisella tularensis* Strains from China and from Other Countries, *Biomed Environ Sci*, 24(3), 310-314.
- Whitehouse, C.A. ve Hottel, H.E. (2007). Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples, *Mol Cell Probes*, 21(2), 92-96.
- WHO. (2007). WHO Guidelines on Tularemia, World Health Organization, WHO/CDS/EPR/2007.7.
- Wilke, A. (2006). Tularemi, *ANKEM Derg*, 20(Ek 2), 222-226.
- Wilke, A., Meriç, M., Grunow, R., Sayan, M., Finke, E.J., Spletstöber, W., Seibold, E., Erdogan, S., Ergonul, O., Yumuk, Z., Gedikoglu, S. (2009). An outbreak of oropharyngeal tularemia linked to natural spring water, *J Med Microbiol*, 58(1), 112-116.
- Wilke-Topçu, A. (2009). Bursa ve Kocaeli Yöresi Salgınları. *Francisella tularensis* ve Tularemi, Gürcan, Ş. (Ed.), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 115-116.
- Winck, M.A., Caumo, K., Rott, M.B. (2011). Prevalence of acanthamoeba from tap water in rio grande do Sul, Brazil, *Curr Microbiol*, 63(5), 464-469.

- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L., (eds). (2006). *Francisella tularensis*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 491-497.
- Yeşilyurt, M., Kılıç, S., Çağaşar, Ö., Çelebi, B., Gül, S. (2011). Yozgat İlinde Kene Kaynaklı İki Tularemi Olgusu, Mikrobiyol Bul, 45(4), 746-754.

EK-1
TULAREMİ OLGUSU GÖRÜLMİYEN BÖLGELERDEN ALINAN SU
ÖRNEKLERİ

Tularemi Olgusu Görülmeyen Bölgelerden Alınan Su Örneklerinin Listesi

Örnek No	Alındığı Yer	Cinsi	Miktar	Alınış Tarihi
1	Merkez Durdulu köyü köy içi çeşme	Kaynak	2 lt	01.06.2011
2	Merkez Yaramış köyü Nurettin Elmalı evi	Şebeke	2 lt	04.06.2011
3	Merkez Olukman yol ayrımı sonrası çeşme	Kaynak	2 lt	04.06.2011
4	KANGAL Arpalı köyü Halis Yılmaz evi	Şebeke	2 lt	10.06.2011
5	KANGAL Humarlı köyü Mehmet Keskin evi	Şebeke	2 lt	10.06.2011
6	KANGAL Şekerpinar köyü Battal Doğu evi	Şebeke	2 lt	14.06.2011
7	KANGAL Sipahikayağı köyü Dursun Irmak evi	Şebeke	2 lt	14.06.2011
8	KANGAL Mısırören köyü Hasan Hüseyin Durak evi	Şebeke	2 lt	22.06.2011
9	KANGAL Karacaören köyü Adnan Coşkun evi	Şebeke	2 lt	25.06.2011
10	KANGAL Yeşilkale köyü Salih Yeşilkaya evi	Şebeke	2 lt	30.06.2011
11	KANGAL Akçaşehir köyü Mehmet Ali Çevik evi	Şebeke	2 lt	06.07.2011
12	KANGAL İğdelidere köyü Ali Çalışkan evi	Şebeke	2 lt	09.07.2011
13	SUŞEHRİ Sağpazar köyü muhtar evi	Şebeke	2 lt	13.07.2011
14	SUŞEHRİ Gündeli köyü Ahmet Uyanık evi	Şebeke	2 lt	13.07.2011
15	SUŞEHRİ TSM	Şebeke	2 lt	13.07.2011
16	ŞARKIŞLA Çamlıca köyü Hanım Ötügen evi	Şebeke	2 lt	20.07.2011
17	YILDIZELİ Çukursaray köyü Ömer Aydın evi	Şebeke	2 lt	24.07.2011
18	Merkez Haydarlı köyü Salim Aslan evi	Şebeke	2 lt	26.07.2011
19	YILDIZELİ Yukarıçakmak köyü İbrahim Gülhan evi	Şebeke	2 lt	29.07.2011
20	YILDIZELİ Yukarıkecek köyü İbrahim Şahinbaş evi	Şebeke	2 lt	29.07.2011
21	Merkez Körtuzla köyü Eyüp Emren evi	Şebeke	2 lt	03.08.2011
22	Merkez Karayün köyü Calil Tunçbaş evi	Şebeke	2 lt	05.08.2011
23	Merkez Hıdıralı köyü Mehmet Yıldırım evi	Şebeke	2 lt	07.08.2011
24	YILDIZELİ Aşağıçakmak köyü Mustafa Bulut evi	Şebeke	2 lt	09.08.2011
25	YILDIZELİ Cumhuriyet köyü Burak Temiz evi	Şebeke	2 lt	09.08.2011
26	YILDIZELİ Yağlıdere köyü Duran Koçtaş evi	Şebeke	2 lt	11.08.2011
27	YILDIZELİ Yeniyan köyü Elvan Kaya evi	Şebeke	2 lt	21.08.2011
28	YILDIZELİ Kadı köyü İsmail Gökmen evi	Şebeke	2 lt	23.08.2011
29	YILDIZELİ Sandal köyü Şaban Kök evi	Şebeke	2 lt	26.08.2011
30	Merkez Aydoğmuş köyü muhtar evi	Şebeke	2 lt	28.08.2011
31	Merkez Çelebiler köyü Muhtar evi	Şebeke	2 lt	02.09.2011
32	Merkez Akçahan köyü Kuzubey Ertük evi	Şebeke	2 lt	02.09.2011
33	ZARA Yoğunpelit köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	07.09.2011
34	ZARA Yeşildere köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	07.09.2011
35	ZARA Aşağımescit köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	07.09.2011
36	DİVRİĞİ Uzunkaya köyü	Şebeke	2 lt	10.09.2011
37	ZARA Aşağıkavacık köyü	Şebeke	2 lt	16.09.2011
38	ZARA Yeşimli köyü	Şebeke	2 lt	18.09.2011
39	ZARA Yılkan köyü	Şebeke	2 lt	21.09.2011
40	Zara Kuruçayır köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	21.09.2011
41	ZARA Büyükkaya köyü	Şebeke	2 lt	09.10.2011
42	ZARA Atkıran köyü	Şebeke	2 lt	09.10.2011
43	ŞARKIŞLA Yahyalı köyü Taşpınar çeşmesi	Kaynak	2 lt	15.10.2011
44	DİVRİĞİ Kırkgöz köyü şebeke	Şebeke	2 lt	18.10.2011
45	HAFİK Bayramtepe köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	20.10.2011
46	DİVRİĞİ Çitme köyü Yaşar Akdağ evi	Şebeke	2 lt	22.10.2011
47	HAFİK Bayıraltı köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	24.10.2011
48	ŞARKIŞLA Benlihasan köyü cami önü çeşme	Kaynak	2 lt	28.10.2011
49	ŞARKIŞLA Faraşderesi Kasım Ağa Çeşmesi	Kaynak	2 lt	28.10.2011
50	HAFİK Durulmuş köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	30.10.2011
51	HAFİK Üzeyir köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.11.2011
52	HAFİK Akkaya köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.11.2011
53	ŞARKIŞLA Hocabey köyü Büyükpınar çeşmesi	Kaynak	2 lt	13.11.2011

Örnek No	Alındığı Yer	Cinsi	Miktar	Alınış Tarihi
54	ŞARKIŞLA E.Karacaören köyü Yahya Yılmaz çeşmesi	Kaynak	2 lt	13.11.2011
55	HAFİK Eymür köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	16.11.2011
56	HAFİK Düzyayla köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	16.11.2011
57	DİVRİĞİ Karaman köyü köy içi çeşme	Kaynak	2 lt	20.11.2011
58	DİVRİĞİ Sırçalı köyü köy önü çeşme	Kaynak	2 lt	20.11.2011
59	DİVRİĞİ Yağbasan köyü Hüseyin Korkmaz evi	Şebeke	2 lt	20.11.2011
60	DİVRİĞİ Çayören köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	20.11.2011
61	ŞARKIŞLA Saritekke köyü Yukarıpınar çeşmesi	Kaynak	2 lt	01.12.2011
62	ŞARKIŞLA Alaman köyü Eskipınar çeşmesi	Kaynak	2 lt	04.12.2011
63	HAFİK Karlı köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.12.2011
64	HAFİK Düger köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.12.2011
65	GEMEREK İkizce köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	09.12.2011
66	GEMEREK Örenyurt köyü şebeke 1	Şebeke	2 lt	11.12.2011
67	GEMEREK Dendil köyü çeşme	Kaynak	2 lt	11.12.2011
68	GEMEREK Osmanuşağı köyü çeşme 2	Kaynak	2 lt	24.12.2011
69	GEMEREK Bulhasan köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	25.12.2011
70	GÜRÜN Konakpınar Böğrüdelik köyü su şebekesi	Şebeke	2 lt	27.12.2011
71	GEMEREK Örenyurt şebeke 2	Şebeke	2 lt	05.01.2012
72	GEMEREK Beştepeler köyü cami	Şebeke	2 lt	05.01.2012
73	GEMEREK Çepni Ş.Bnb Aras mahallesi çeşmesi	Kaynak	2 lt	05.01.2012
74	GEMEREK Yeniçubuk Y.Doğan cami çeşmesi	Kaynak	2 lt	05.01.2012
75	GÜRÜN Bozhöyük köyü köy içi çeşme	Kaynak	2 lt	12.01.2012
76	DİVRİĞİ Güneş köyü şebeke	Şebeke	2 lt	16.01.2012
77	DİVRİĞİ Dökmeçay köyü şebeke	Şebeke	2 lt	16.01.2012
78	KOYULHİSAR Gökdere köyü Göldere çeşmesi	Kaynak	2 lt	21.01.2012
79	KOYULHİSAR Karaçam köyü cami yanı çeşme	Kaynak	2 lt	21.01.2012
80	KOYULHİSAR Yeşilyurt köyü Hacı Bayram çeşmesi	Kaynak	2 lt	21.01.2012
81	KOYULHİSAR Ortaseki köyü Tahir çeşmesi	Kaynak	2 lt	08.02.2012
82	KOYULHİSAR Kadife köyü okul çeşmesi	Şebeke	2 lt	08.02.2012
83	KOYULHİSAR Karaçam köyü Sokuran çeşmesi	Kaynak	2 lt	08.02.2012
84	KOYULHİSAR Sarıkaya köyü Pınar çeşmesi	Kaynak	2 lt	08.02.2012
85	KOYULHİSAR Boyalı köyü Hacı Bekir Yamaç çeşmesi	Kaynak	2 lt	08.02.2012
86	KOYULHİSAR Gölcük köyü Çukurpınar mevki çeşme	Kaynak	2 lt	08.02.2012
87	SUŞEHRİ Y.Çitlice köyü köy girişi çeşme	Kaynak	2 lt	19.02.2012
88	SUŞEHRİ A.Akören köyü şebeke	Şebeke	2 lt	19.02.2012
89	SUŞEHRİ Y.Akören köyü şebeke	Şebeke	2 lt	19.02.2012
90	SUŞEHRİ Balkara köyü Bedilli mahallesi köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	19.02.2012
91	ŞARKIŞLA Karakız köyü Aşağıpınar köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	01.03.2012
92	SUŞEHRİ Kozçukur köyü köy konağı yanı çeşme	Kaynak	2 lt	01.03.2012
93	SUŞEHRİ A.Çitlice köyü cami yanı köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	01.03.2012
94	GÜRÜN Kızılıpınar köyü Tacettin Kızılıpınar evi	Şebeke	2 lt	12.03.2012
95	GÜRÜN Kızılburun köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	12.03.2012
96	GÜRÜN Sularbaşı köyü su şebekesi	Şebeke	2 lt	12.03.2012
97	GÜRÜN İncesu köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	21.03.2012
98	GÜRÜN Çamlıca köyü su şebekesi	Şebeke	2 lt	21.03.2012
99	GÜRÜN Davulhüyük köyü su şebekesi	Şebeke	2 lt	25.03.2012
100	GÜRÜN Kızılören köyü su şebekesi	Şebeke	2 lt	25.03.2012

EK-2

TULAREMİ OLGUSU GÖRÜLEN BÖLGELERDEN ALINAN SU ÖRNEKLERİ

Tularemî Olgusu Görülen Bölgelerden Alınan Su Örneklerinin Listesi

Örnek No	Alındığı Yer	Cinsi	Miktar	Alınış Tarihi
T1	ZARA Kayadibi köyü camii yanı çeşme	Kaynak	2 lt	05.06.2011
T2	ZARA Kayadibi köyü Tarihi Çeşme	Kaynak	2 lt	05.06.2011
T3	ZARA Kayadibi köyü depoya gelen kaynak	Kaynak	2 lt	05.06.2011
T4	ZARA Kayadibi köyü Muhtarın evi	Şebeke	2 lt	05.06.2011
T5	SUŞEHRİ Aşağısarıca köyü kullanma suyu depo	Şebeke	2 lt	12.06.2011
T6	SUŞEHRİ Aşağısarıca köyü Salise Çalışlar evi	Şebeke	2 lt	12.06.2011
T7	SUŞEHRİ Aşağısarıca köyü köy çeşmesi	Şebeke	2 lt	12.06.2011
T8	SUŞEHRİ Aşağısarıca köyü köy meydanı çeşmesi	Şebeke	2 lt	12.06.2011
T9	YILDIZELİ Çavuşlu köyü köy içi pınar	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T10	YILDIZELİ Çavuşlu köyü köy içi pınar kürün	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T11	YILDIZELİ Çavuşlu köyü çeşme karşısı şebeke	Şebeke	2 lt	25.06.2011
T12	YILDIZELİ Sarıkaya köyü Satılmış Kavak çeşmesi 1	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T13	YILDIZELİ Sarıkaya köyü Satılmış Kavak çeşmesi 2	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T14	YILDIZELİ Sarıkaya köyü Köy içi YSE-1966 çeşmesi 1	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T15	YILDIZELİ Sarıkaya köyü Köy içi YSE-1966 çeşmesi 2	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T16	YILDIZELİ Sarıkaya köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T17	YILDIZELİ Sarıkaya köyü köy çeşmesi kürün	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T18	YILDIZELİ Sarıkaya köyü köy çeşmesi yukarısı çeşme 1	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T19	YILDIZELİ Sarıkaya köyü köy çeşmesi yukarısı çeşme 2	Kaynak	2 lt	25.06.2011
T20	Yıldız beldesi köy içi çeşme	Kaynak	2 lt	02.07.2011
T21	Yıldız beldesi çıkışı YSE-1970 çeşme	Kaynak	2 lt	02.07.2011
T22	Yıldızeli Yusufoğlan köyü yolu Aşık İbrahim oğlu çeşm.	Kaynak	2 lt	02.07.2011
T23	Yıldızeli Yusufoğlan köyü yolu Fatma Ulucan hayratı	Kaynak	2 lt	02.07.2011
T24	Yıldızeli Yusufoğlan köyü Hacı Cemal Çınar çeşmesi	Kaynak	2 lt	02.07.2011
T25	Yıldızeli Yusufoğlan köyü köy içi şebeke	Şebeke	2 lt	02.07.2011
T26	Yıldızeli Yusufoğlan köyü Okul bahçesi çeşme	Şebeke	2 lt	02.07.2011
T27	Yıldızeli Yusufoğlan köyü morg önü çeşme	Şebeke	2 lt	02.07.2011
T28	Yusufoğlan köyü mezarlık yanı çeşme	Şebeke	2 lt	02.07.2011
T29	Yıldızeli Yusufoğlan köyü içi Salih Demirkan çeşme	Kaynak	2 lt	02.07.2011
T30	SUŞEHRİ Yeşilyayla Yıldırım Yılmaz evi	Kaynak	2 lt	16.07.2011
T31	SUŞEHRİ Gökçekaş köyü Süreyya Çelik evi	Kaynak	2 lt	16.07.2011
T32	SUŞEHRİ Aşağısarıca köy meydanı kullanma suyu	Kaynak	2 lt	16.07.2011
T33	SUŞEHRİ Yeşilyayla Ahmet Ören evi	Şebeke	2 lt	16.07.2011
T34	SUŞEHRİ Aşağısarıca köy meydanı içme suyu	Şebeke	2 lt	16.07.2011
T35	SUŞEHRİ Gökçekaş köyü Niyazi Işkın evi	Şebeke	2 lt	16.07.2011
T36	ŞARKIŞLA Merkez Şehitler parkı çeşmesi	Kaynak	2 lt	18.07.2011
T37	Sivas Merkez Yenidoğan mahallesi	Şebeke	2 lt	21.07.2011
T38	GÜRÜN Güneş köyü 2.depo	Kaynak	2 lt	23.07.2011
T39	GÜRÜN Güneş köyü 1.depo	Kaynak	2 lt	23.07.2011
T40	Hayırbey köyü Rafet Erdoğan evi şebeke	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T41	Hayırbey köyü Rafet Erdoğan evi kaynak	Kaynak	2 lt	12.08.2012
T42	Yıldız beldesi Necip Aktaş evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T43	Yıldız beldesi Kuzören köyü karşısı çeşme kürün	Kaynak	2 lt	12.08.2012
T44	Yıldız beldesi Zekerîya Yılmaz evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T45	Yıldız beldesi Ömer Öztürk evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T46	Yıldız beldesi Mustafa Danış evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T47	Yıldız beldesi Kuzören köyü karşısı çeşme	Kaynak	2 lt	12.08.2012
T48	Yıldız beldesi köy çeşmesi kürün	Kaynak	2 lt	12.08.2012
T49	Yıldız beldesi camii şadırvan	Kaynak	2 lt	12.08.2012
T50	Yıldız beldesi camii yanı çeşme	Kaynak	2 lt	12.08.2012
T51	Yıldız beldesi Ömer Çınar evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T52	Yıldız beldesi Duran Erten evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T53	Yıldız beldesi köy çeşmesi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T54	Yıldız beldesi İbrahim Öztürk evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T55	Yıldız beldesi Ali Taçyıldız evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012

Örnek No	Alındığı Yer	Cinsi	Miktar	Alınış Tarihi
T56	Yıldız beldesi Mehmet Dorma evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T57	Yıldız beldesi Halil İbrahim Öztürk evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T58	Yıldız beldesi Ömer Yazgan evi	Şebeke	2 lt	12.08.2012
T59	GÜRÜN Güneş köyü	Şebeke	2 lt	23.08.2011
T60	Hayırbey köyü Mehmet AKTAŞ evi	Şebeke	2 lt	23.08.2011
T61	ZARA Kayadibi köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.09.2011
T62	ZARA Kürünlü köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.09.2011
T63	GEMEREK Akçaşar köyü cami şadırvanı	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T64	GEMEREK Çiçekoğlu köyü köy çeşmesi 3	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T65	GEMEREK Çiçekoğlu köyü köy çeşmesi 2	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T66	GEMEREK Çiçekoğlu köyü köy çeşmesi kürün	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T67	GEMEREK Kocaoğlu Efraim Yalçınkaya evi	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T68	GEMEREK Kocaoğlu Köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T69	GEMEREK Akçaşar köyü Büyükpınar çeşmesi	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T70	GEMEREK Çiçekoğlu köy camii	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T71	GEMEREK Çiçekoğlu köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T72	GEMEREK Kocaoğlu Musafa Korkmaz evi	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T73	GEMEREK Akçaşar köyü teyzenin evi	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T74	GEMEREK Çiçekoğlu köyü okul	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T75	GEMEREK Akçaşar cami altı çeşme	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T76	ZARA Kürünlü köyü yukarı çeşme	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T77	ZARA Kürünlü köyü okul çeşmesi	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T78	ZARA Kürünlü köyü Mehmet Ali Şahin evi	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T79	ZARA Kürünlü köyü depo giriş	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T80	ZARA Kürünlü köyü köy ortası çeşme	Kaynak	2 lt	13.09.2011
T81	ZARA Kürünlü köyü muhtarın evi 1	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T82	ZARA Kürünlü köyü muhtarın evi 2	Şebeke	2 lt	13.09.2011
T83	ŞARKIŞLA Döllük köyü	Şebeke	2 lt	05.10.2011
T84	ŞARKIŞLA höyük köyü Şükrü Şekeroğlu çeşmesi	Kaynak	2 lt	07.10.2011
T85	ZARA Yapak köyü İzzet Yılmaz çeşmesi	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T86	ZARA Yapak köyü köy ortası çeşme	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T87	ZARA Yapak köyü İlköğretim karşısı çeşme	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T88	ZARA Yapak köyü Tahir Topçu evi	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T89	ZARA Yapak köyü okul erkek tuvaleti	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T90	ZARA Yapak köyü okul kız tuvaleti	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T91	ZARA Yapak köyü Hubuyar Çaydavul evi	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T92	ZARA Yapak köyü Ali Osman Yüksel evi	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T93	ZARA Yapak köyü Cemal Zencir evi	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T94	ZARA Yapak köyü Hacı İbrahim Kaba evi	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T95	ZARA Yapak köyü cami çeşmesi	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T96	ZARA Yapak köyü köy üstü çeşme	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T97	ZARA Yapak köyü Hasbi Kütük evi	Şebeke	2 lt	15.10.2011
T98	ZARA Yapak köyü depo suyu	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T99	ZARA Yapak köyü 2 nolu depo suyu	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T100	ZARA Yapak köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	15.10.2011
T101	ZARA Yapak köyü Gürcü Yakıcı evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T102	ZARA Yapak köyü Keziban Ünal evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T103	ZARA Yapak köyü Zeki Kaba evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T104	ZARA Yapak köyü Ali Osman Yakıcı evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T105	ZARA Yapak köyü depo suyu	Kaynak	2 lt	12.11.2011
T106	ZARA Yapak köyü İlköğretim okulu	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T107	ZARA Yapak köyü Hasbi Kütük evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T108	ZARA Yapak köyü Namiye Akkaya evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T109	ZARA Yapak köyü Şerife Özkan evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T110	ZARA Yapak köyü Cemal Zencir evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T111	ZARA Yapak köyü Kıymet Karaca evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T112	ZARA Yapak köyü Hacı İbrahim Kaba evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011

Örnek No	Alındığı Yer	Cinsi	Miktar	Alınış Tarihi
T113	ZARA Yapak köyü Hasan Öztemur evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T114	ZARA Yapak köyü Mehmet Akif Öztürk evi	Şebeke	2 lt	12.11.2011
T115	ZARA Yapak köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	12.11.2011
T116	GEMEREK Çiçekoğlu köyü imam evi	Şebeke	2 lt	14.11.2011
T117	GEMEREK Çiçekoğlu köyü Dursun Yıldırım evi	Şebeke	2 lt	14.11.2011
T118	GEMEREK Çiçekoğlu köyü okul altı çeşme	Kaynak	2 lt	14.11.2011
T119	GEMEREK Kocaoğlu köyü cami	Şebeke	2 lt	14.11.2011
T120	GEMEREK Ağcaşar köyü cami	Şebeke	2 lt	14.11.2011
T121	ZARA Yapak köyü köy içi sarı ev yanı çeşme	Kaynak	2 lt	16.11.2011
T122	ZARA Yapak köyü İ.Ö.O erkek lavabo	Şebeke	2 lt	16.11.2011
T123	ZARA Yapak köyü köy ortası çeşme	Kaynak	2 lt	16.11.2011
T124	ZARA Kürünlü köyü köy ortası çeşme	Kaynak	2 lt	16.11.2011
T125	ZARA Yapak köyü İ.Ö.O kız lavabo	Şebeke	2 lt	16.11.2011
T126	ZARA Yapak köyü İzzet Yılmaz çeşmesi	Kaynak	2 lt	16.11.2011
T127	ZARA Kürünlü köyü Ahmet Öztürk evi	Şebeke	2 lt	16.11.2011
T128	ZARA Yapak köyü Ali Osman Yakıcı evi	Şebeke	2 lt	16.11.2011
T129	GEMEREK Çiçekoğlu köyü kaynak	Kaynak	2 lt	18.11.2011
T130	GEMEREK Kocaoğlu köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	18.11.2011
T131	GEMEREK Çiçekoğlu köyü şebeke	Şebeke	2 lt	18.11.2011
T132	YILDIZELİ Üyükaylası köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	01.12.2011
T133	YILDIZELİ Üyük köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	01.12.2011
T134	GEMEREK Ağcaşar köyü	Şebeke	2 lt	01.12.2011
T135	GÜRÜN Bahçeici köyü su şebekesi	Şebeke	2 lt	06.12.2011
T136	YILIDIZ Beldesi çeşme	Kaynak	2 lt	09.12.2011
T137	YILIDIZ Beldesi Teslime Dölek evi	Şebeke	2 lt	09.12.2011
T138	GEMEREK Ağcaşar köyü cami	Şebeke	2 lt	09.12.2011
T139	GEMEREK Kocaoğlu köyü cami	Şebeke	2 lt	09.12.2011
T140	GEMEREK Çiçekoğlu köyü cami	Şebeke	2 lt	09.12.2011
T141	ZARA Kürünlü köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	09.12.2011
T142	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Cengiz Soysal evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T143	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Durmuş Akıncı evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T144	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Adnan Temizöz evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T145	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Ali Şentürk evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T146	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Ercan Özer evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T147	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Yaşar Beyazıt evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T148	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü su deposu	Kaynak	2 lt	14.12.2011
T149	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Yıldırım Akıncı evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T150	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü cami önü çeşme	Kaynak	2 lt	14.12.2011
T151	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Murat Soysal evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T152	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Serdal Soysal evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T153	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü M.Mustafa Soysal evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T154	ŞARKIŞLA Merkez Hüyük köyü Cengiz Beyazıt evi	Şebeke	2 lt	14.12.2011
T155	GÜRÜN Bahçeici köyü Hamurkesen cami	Şebeke	2 lt	16.12.2011
T156	GÜRÜN Bahçeici köyü Lütfü Çorak evi	Şebeke	2 lt	16.12.2011
T157	GÜRÜN Bahçeici köyü Kışla cami	Şebeke	2 lt	16.12.2011
T158	GÜRÜN Bahçeici köyü Köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	16.12.2011
T159	GÜRÜN Bahçeici köyü mevlüt Kaplanbaba evi	Şebeke	2 lt	16.12.2011
T160	GÜRÜN Bahçeici köyü Velioğlu dinlenme tesisleri	Şebeke	2 lt	16.12.2011
T161	GÜRÜN Bahçeici köyü Mehmet Ali Rençber evi	Şebeke	2 lt	16.12.2011
T162	GÜRÜN Bahçeici köyü Hasan Selçuk evi	Şebeke	2 lt	16.12.2011
T163	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü Ercan Özer evi önü çeşme	Kaynak	2 lt	21.12.2011
T164	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü Serdal Soysal evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T165	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü Durmuş Akıncı evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T166	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü Yaşar Beyazıt evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T167	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü Adnan Temiz evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T168	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü Cengiz Beyazıt evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T169	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü M.Mustafa Soysal evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011

Örnek No	Alındığı Yer	Cinsi	Miktar	Alınış Tarihi
T170	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü M.Ali Şentürk evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T171	ŞARKIŞLA M.Hüyük köyü Cengiz Soysal evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T172	GÜRÜN Konakpınar Karaören köyü köy çeşmesi 1	Kaynak	2 lt	21.12.2011
T173	GÜRÜN Konakpınar Karaören köyü köy çeşmesi 2	Kaynak	2 lt	21.12.2011
T174	GÜRÜN Konakpınar Karaören köyü orta çeşme	Kaynak	2 lt	21.12.2011
T175	GÜRÜN Karaören köyü Salman Karademir evi	Şebeke	2 lt	21.12.2011
T176	Şarkışla Cemel Beldesi Sağlık Ocağı Yanı çeşme	Kaynak	2 lt	04.01.2012
T177	Şarkışla Cemel Beldesi Minare Yanı çeşme	Kaynak	2 lt	04.01.2012
T178	Şarkışla M.Hüyük köyü su deposu	Kaynak	2 lt	05.01.2012
T179	Şarkışla M.Hüyük köyü 1 nolu kaynak	Kaynak	2 lt	05.01.2012
T180	Şarkışla M.Hüyük köyü 2 nolu kaynak	Kaynak	2 lt	05.01.2012
T181	GÜRÜN Karaören köyü orta çeşme	Kaynak	2 lt	05.01.2012
T182	GÜRÜN Karaören köyü Salman Karademir evi	Şebeke	2 lt	05.01.2012
T183	GÜRÜN Karaören köyü su deposu	Şebeke	2 lt	05.01.2012
T184	ŞARKIŞLA Maksutlu köyü depo suyu	Şebeke	2 lt	06.01.2012
T185	ŞARKIŞLA Maksutlu köyü muhtar evi	Kaynak	2 lt	06.01.2012
T186	ŞARKIŞLA Döllük köyü Ömer Yılmaz evi	Şebeke	2 lt	06.01.2012
T187	ŞARKIŞLA Merkez Belkent çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.01.2012
T188	ŞARKIŞLA Döllük köyü köy çeşmesi	Kaynak	2 lt	06.01.2012
T189	ŞARKIŞLA Ortaköy su deposu 1	Kaynak	2 lt	12.01.2012
T190	ŞARKIŞLA Ortaköy su deposu 2	Kaynak	2 lt	12.01.2012
T191	ŞARKIŞLA Ortaköy Kadir Hakverdi evi	Kaynak	2 lt	12.01.2012
T192	ŞARKIŞLA Ortaköy Dilaver Türegür evi	Kaynak	2 lt	12.01.2012
T193	Şarkışla M.Hüyük M.Mustafa Soysal evi	Kaynak	2 lt	12.01.2012
T194	Şarkışla Gümüştepe köyü Yasin Güneş evi	Şebeke	2 lt	23.01.2012
T195	Şarkışla Abdallı Köyü Mezarlık çeşmesi	Kaynak	2 lt	15.02.2012
T196	Şarkışla Abdallı Köyü Bekir Kartal evi	Şebeke	2 lt	15.02.2012
T197	Şarkışla Abdallı köyü köy içi köprü çeşmesi	Kaynak	2 lt	15.02.2012
T198	Şarkışla Gazi köyü su deposu	Şebeke	2 lt	20.03.2012
T199	Şarkışla Gazi köyü kuyu suyu	Kaynak	2 lt	20.03.2012
T200	Şarkışla Gazi köyü Ahmet Özgen çeşmesi	Kaynak	2 lt	20.03.2012

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Mehmet ATAŞ
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 21/07/1975
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Sivas Halk Sağlığı Müdürlüğü, İl Halk Sağlığı Laboratuvarı, Mevlana Caddesi-SİVAS
E-posta Adresi	atasmehmet@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas İHL, 1993
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 1998
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2006

İş Tecrübesi

Özel Dershane	Biyoloji Öğretmeni, 2000-2001
Sağlık Bakanlığı	Biyolog, 2001-2012

Ödüller, Teşvikler ve Üyelikler