

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN *BACILLUS ANTHRACIS*' IN
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Veteriner Hekim İlker GEDİKLİ

Danışman

Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARS 2014

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN *BACILLUS ANTHRACIS*' IN
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Veteriner Hekim İlker GEDİKLİ

Danışman

Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARS 2014

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

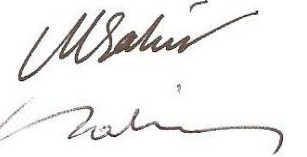
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Veteriner Hekim İlker GEDİKLİ Tarafından hazırlanmış olan **Toprak Örneklerinden *B. anthracis*'in İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20 /06 /2014

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan : Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

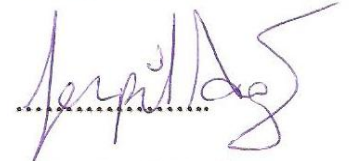


Üye : Prof. Dr. Salih OTLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emsal AYDIN



Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 25/06/2014 gün ve 32/1.83. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Serpil DAĞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Antraks veya diğer ismi ile şarbon esasen ot yiyen hayvanlarda görülen infeksiyöz bir hastalık olmasına rağmen, evcil veya yabancı etçilleri, kanatlıları ve diğer birçok hayvan türünü de etkileyebilmektedir. İnfekte hayvanlarla temas sonrası insanlara bulaşabildiği için zoonotik bir karaktere de sahiptir. Antraksın etiyolojik ajanı *Bacillus anthracis* adlı Gram pozitif bir bakteridir. Etkenin infeksiyondan sorumlu olan formu vejetatif basil formudur, fakat hastalığın epidemiyolojisinden ve ekolojisinden sorumlu olan asıl form zorlu çevre koşullarında uzun yıllar yaşayabilen spor formlarıdır. Başta toprağın yapısı olmak üzere, lokal su hareketliliği, sıcaklık ve yağış gibi doğa olayları ve daha birçok faktörün, sporların yaşamı ile direk ilişkili olduğu birçok kez vurgulanmıştır. Duyarlı hayvanlar etkeni bu tür kontamine alanlarda beslenirken bulaşık ot veya ot kökleri ile sindirim yoluyla almaktadırlar. Hayvandan hayvana bulaşma oldukça nadirdir fakat bu tür vakalarda sokucu ve kan emici sineklerin rol aldığı düşünülmektedir.

İnsanlarda antraks infekte hayvanlarla direk veya indirek temas sonrası bulaşır. Bulaşma kaynaklarına göre antraks; endüstriyel, tarımsal ve laboratuvar kaynaklı olabilir. Endüstriyel kökenli antraks, *B.anthraxis* sporları ile kontamine hayvansal ürünlerin; koyun ve keçi kılı, yün, deri, post ve kemik gibi, sanayide işlenmesi esnasında oluşur. Sporların deriye bulaşması ile deri formu veya inhalasyonu ile akciğer formu ortaya çıkar. Türkiye'nin doğusunda antraks vakalarının büyük çoğunluğu Erzurum ve Kars İllerinde görülmektedir. Bu iki şehir hayvan varlığı bakımından ülkenin büyük bir potansiyelini barındırmakta ve hayvancılığın merkezi konumunda olup ülkenin diğer bölgeleriyle bağlantı kurabilen ve hastalığın yayılması için imkân sağlayacak ortak bir yol güzergâhına sahiptirler. Yörede konuşlanan Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesindeki araştırmacılar tarafından infekte hayvanların gömüldüğü alanlardan yılın

III

her mevsiminde sürekli *B.anthraxis* spor izolasyonu yapılmakta ve kontamine alanlar bu şekilde belirlenebilmektedir.

Bu araştırmada ÷lkemizin en önemli geçim kaynaklarından biri olan hayvancılıkta büyük ekonomik kayıplara neden olan, aynı zamanda zoonotik karakterde olması nedeniyle ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturan, kolay uygulanabilir ve teşhisinin güç olması nedeniyle tehlikeli bir biyolojik silah ajanı olan antraks etkeni *B.anthraxis* sporlarının topraktan izolasyonu, identifikasyonu ve etkenin molek÷ler yöntemlerle karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Lisansüstü öğrenimime başladığım günden itibaren çalışmalarım ve tez yazımı süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mitat şAHİN'e, çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Salih OTLU, Yrd. Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ, Yrd. Doç. Dr. Fatih BÜYÜK, Yrd. Doç. Dr. Aliye GÜLMEZ'e, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Elif TAZEGÜL'e, teşekkür ederim.

Azmi ve hırsı ile her zaman bana destek olan, iyi kötü her günümde beni yalnız bırakmayan, hayatıma en değerli varlığım Armağan Zaferi vererek anlam katan Ziraat Yüksek Mühendisi sevgili eşim Sergül GEDİKLİ'ye şükranlarımı sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan maddi, manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem, babam ve kardeşime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Tablo Listesi	IX
Resim Listesi	X
Figür Listesi	XI
Özet	XII
Summary	XIII
1. GENEL BİLGİLER	
1.1. Giriş	1
1.2. Tarihçe	1
1.3. Etiyoloji	2
1.3.1. Sınıflandırma ve Diğer Türler ile İlişkisi	2
1.3.2. Morfoloji	3
1.3.3. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Direnç	4
1.4. Virülens Faktörler ve Patogenez	4
1.5. Epidemiyoloji	5
1.5.1. Bulaşma	6
1.6. Klinik Belirtiler	7
1.6.1. Hayvanlarda Klinik Bulgular	7
1.6.2. İnsanlarda Klinik Belirtiler	8
1.6.2.1. Deri Formu	9
1.6.2.2. İnhalasyon (Akciğer) Formu	10
1.6.2.3. Gastrointestinal Form	11
1.7. Teşhis	11
1.7.1. Kapsül Boyama	12
1.7.2. İzolasyon ve İdentifikasyon	12
1.7.3. Moleküler Teknikler	13

	<u>Sayfa No.</u>
1.8. Tedavi	13
1.9. Kontrol ve Korunma	14
1.10. Biyoterörizm ve Antraks	15
1.10.1. Biyolojik Silah Kavramı	15
1.10.2. Biyolojik Silahların Tarihçesi	16
1.10.3. Biyolojik Silahların Sınıflandırılması	18
1.10.3.1.Hedeflerine Göre Sınıflandırılma	18
1.10.3.2.Orjinlerine Göre Sınıflandırma	19
1.10.4. Biyolojik Silah Olarak Antraks	22
2. MATERYAL ve METOT	
2.1. Materyal	24
2.1.1. Çalışma Alanı	24
2.1.2. Toprak Örneklerinin Kaynağı	24
2.1.3. Örnekleme Stratejisi ve Örnek Sayısı	25
2.1.4. İzolasyon, İdentifikasyon ve Moleküler Karakterizasyon İçin Gerekli Materyal	28
2.1.4.1. Araç ve Gereçler	28
2.1.4.2. Kimyasallar	29
2.1.4.3. Besiyerleri	29
2.1.4.4. Boya Solüsyonları	30
2.1.4.5. Biyolojik Ürünler	31
2.1.4.6. PZR Malzemeleri	31
2.2. Metot	32
2.2.1. <i>B.anthraxis</i> Spor İzolasyonu	32
2.2.1.1. <i>B.anthraxis</i> Spor Sayısının Hesaplanması	34
2.2.2. İdentifikasyon	34
2.2.2.1. Gama Fajı Duyarlılığı	35
2.2.2.2. Penisilin Duyarlılığı	35

	<u>Sayfa No.</u>
2.2.2.3. Diğer Testler	35
2.2.2.3.1. Gram Boyama	35
2.2.2.3.2. Hareket Muayenesi	36
2.2.2.3.3. Kapsül Üretimi ve MacFadyen Boyama	36
2.2.3. PZR Yöntemi	36
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu	37
2.2.3.2. Primer Seçimi	37
2.2.3.3. PZR Reaksiyonunun Hazırlanışı ve Amplifikasyon Şartları	38
2.2.3.4. Elektroforez ve PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	39
3. BULGULAR	
3.1. İzolasyon Bulguları	40
3.2. İdentifikasyon Bulguları	42
3.3. PZR Bulguları	46
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	58
7. ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER ve KISALTMALAR

<u>Simgeler ve kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
AGP	Agar Jel Presipitasyon (Agar Gel Precipitation)
BIDS	Biyolojik Entegre Algılama Sistemi (Biological Integrated Detection System)
BWC	Biyolojik Silahlar Konvansiyonu (Biological Weapons Convention)
CDC	ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers For Disease Control and Prevention)
EF	Ödem Faktörü (Edema factor)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (The Food and Agriculture Organization)
GATA	Gülhane Askeri Tıp Akademisi
IAEA	Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (International Atomic Energy Agency)
IBAD	Geçici Biyolojik Ajan Algılama (Interim Biological Agent Detection)
ID50	İnfeksiyöz Doz 50
JBPDS	Ortak Biyolojik Puan Sistemi (Joint Biological Point System)
KİS	Kitle İmha Silahları
LD50	Letal Doz 50
LF	Letal Faktör (Lethal Factor)
NATO	Kuzey Atlantik Antlaşması Örgütü (North Atlantic Treaty Organization)
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (World Organisation for Animal Health)

VIII

OPCW	Kimyasal Silahları Yasaklama Örgütü (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons)
PA	Koruyucu Antijen (Protective Antigen)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
SMART	Sensitive Membrane Antigen Rapid Test
TSB	Triptik Soya Buyyon (Trypticase Soy Broth)
TUA	Türk Üniversal Aşı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1	Biyolojik silahların orijinine göre sınıflandırılması	21
Tablo 2	Kontamine odak ve toprak örneklerine ait bilgiler	27
Tablo 3	PZR’de kullanılan primerler ve nükleotid dizilimleri	38
Tablo 4	Toprak örneklerine ait kültür sonuçları ve <i>B.anthraxis</i> spor sayıları	41
Tablo 5	<i>B.anthraxis</i> izolatlarına ait identifikasyon bulguları	45

RESİM LİSTESİ

<u>Resim No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Resim 1	Hayvanlarda antraks	8
Resim 2	Antraksın deri formuna ait insan vakaları	9
Resim 3	Aktif kontamine odakların belirlenmesi	25
Resim 4	Kontamine alanların örneklenmesi ve örneklerin laboratuvar muhafazası	26
Resim 5	Yoğun kontamine toprak örneğine ait pozitif kültür sonucu	40
Resim 6	Kanlı agarda gama fajı ve penisilin duyarlılığı kanıtlanan bir <i>B.anthraxis</i> kolonisi	43
Resim 7	Gram boyama ve yarı katı besiyerinde hareket muayenesi görüntüleri	43
Resim 8	Sodyum bikarbonat besiyerinde kapsül üretim sonuçları	44
Resim 9	MacFadyen yöntemi ile gerçekleştirilen kapsül boyama	44
Resim 10	<i>B.anthraxis</i> izolatlarına ait PA-PZR bulguları	46
Resim 11	<i>B.anthraxis</i> izolatlarına ait CAP-PZR bulguları	47

FIGÜR LİSTESİ

<u>Figür No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Figür 1	Antraksın infeksiyon döngüsü	7
Figür 2	Örnekleme stratejisi	25
Figür 3	Toprak örneklerinden <i>B.anthraxis</i> spor izolasyon yöntemi	33

ÖZET

Toprak Örneklerinden *Bacillus anthracis*' in İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu

Şarbon, etkeni *Bacillus anthracis* olan ve temelde otçul hayvanlardan keçi, koyun, sığır olmak üzere bunun yanı sıra at, domuzlar ve bazı kanatlı türlerini de etkileyen ve insanlarda da görülebilen zoonotik bir hastalıktır. Etken Gram-pozitif, spor formu, hareketsiz ve çubuk şekilli bir bakteridir. Olumsuz çevre koşullarına dayanıksız olan vejetatif formları konak vücudunu terk ettikten sonra hava ile teması sonucu spor formuna dönüşürler. Toprak, enfekte karkaslardan salınan etken sporları ile yoğun bir şekilde kontamine olmakta ve bu tür alanlar aktif odaklar olarak uzun süre tekrarlayan infeksiyonlara yol açmaktadırlar. Bu çalışmada örnekleme Kars İl ve ilçelerinde antraks şüphesi ile ölen hayvanların gömüldüğü odaklardan yapıldı. Toplamda 18 farklı odaktan 90 toprak örneği çalışmaya dahil edildi. Alınan toprak örnekleri OIE'nin "Anthrax in Human and Animals" adlı kaynak kitabında bulunan yöntemlerle işlenmiş olup izole edilen antraks şüpheli kolonilerin değerlendirilmesinde, koloni ve mikroskopik morfolojisi, kapsül varlığı, hareket yeteneği, gama fajı ve penisiline duyarlılık testleri ile PA ve Cap spesifik PZR teknikleri uygulandı. Örneklenen bu 18 farklı odağın 7 (%38,88)'si *B.anthraxis* spor varlığı yönünden pozitif saptandı. Örnek bazında düşünüldüğünde incelenen 90 toprak örneğinin 11 (%12,22)'i pozitif saptanmış oldu. Spor miktarlarının 53 ile 34600 spor/g şeklinde bir dağılım gösterdiği belirlendi. Uygulanan PA ve Cap spesifik PZR yöntemi ile bu 11 izolatın tümünün bu iki geni taşıdığı ve tam virulent *B.anthraxis* suşu oldukları belirlendi. Sonuç olarak hali hazırda hayvan yetiştiriciliği yapılan Kars bölgesinde bu hayvanların yaşam alanı olan meralarda bulunan hayvan mezarlarından *B.anthraxis* sporları yüksek düzeyde bulunmakta ve halen izole edilebilmektedir. Uzun süre canlılığını ve infektivitesini muhafaza eden antraks sporları ile bulaşık bu tür aktif alanların varlığı hayvan ve insan sağlığı açısından büyük bir risk oluşturmaktadır. Sporla bulaşık bu alanların karakterizasyonu ve kontaminasyon boyutunun ortaya çıkartıldığı bu tür çalışmalar Kars Bölgesinde antraks ile mücadele programlarının oluşturması, korunma ve kontrol programlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı umulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *B.anthraxis*, İzolasyon, Kars, Toprak, PZR.

SUMMARY

Isolation of *Bacillus anthracis* From Soil Samples, Identification and Characterization

Anthrax, caused by *Bacillus anthracis*, occurs in domesticated and wild animals, primarily herbivores, including goats, sheep, cattle, horses, and swine. It also affects human with zoonotic aspect. *B.anthraxis* is a large encapsulated, nonmotile, spore-forming Gram-positive rod. Since the vulnerable characteristic of bacterial vegetative forms to adverse environmental conditions it turns into spore form after leaving the host body as a result of contact with air. Soil is being heavily contaminated with spores released from infected carcass and causes recurrent infections for a long period such as the active hotspot for anthrax. In this study, sampling was done in Kars and throughout from the foci that death animals were buried in there with suspicious of anthrax. Totally 90 samples from 18 foci were included in this study. Samples were analysed with the methods in the source book of OIE entitled "Anthrax in Human and Animals". Evaluation of anthrax suspected colonies were conducted with examination of microscopical and colony morphology, capsule production, motility, gamma phage and penicillin susceptibility and PCR with the PA ve Cap specific primers. Seven (38.88%) of these 18 different foci sampled were positive for the *B.anthraxis* spores. When considered on the sample base out of 90 soil samples that were analysed 11 (12.22%) were found positive. Spore distribution was found between 53 and 34600 for per gram soil. Since the application of PA and Cap specific PCR, all these 11 isolates contain both genes and were determined as fully virulent strain of *B.anthraxis*. As a result, *B.anthraxis* spores were found high level and still be isolated from animal buried sites in pastures of animal habitats in Kars region in where animal husbandry has already done. The existence of such active foci contaminated with anthrax spores that maintain the viability and infectivity for a long time poses major risk both animal and human health. Such studies revealed that the characterization of site and size of spore contamination are expected to contribute to the creation of control programs and the development of prevention and control programs in Kars Region.

Keywords: *B.anthraxis*, Isolation, Kars PCR, Soil.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Bacillus anthracis tarafından oluşturulan antraks (şarbon), otçul hayvanlardan keçi, koyun, sığır, at ve domuzlarda olmak üzere, bazı kanatlı türlerinde ve yabani hayvanlarda görülen ve insanlara da bulaşabilen zoonotik bir hastalıktır (Hugh-Jones ve Vos 2002). Hastalık etkeni *B.anthraxis*, Gram-pozitif, spor oluşturan, hareketsiz ve çubuk şekilli bir bakteridir (Jula ve ark. 2007). Vejetatif formları olumsuz çevre koşullarına dayanıksızdır. Etken hava ile teması sonucu spor formuna geçmektedir. Hayvanlar tarafından antraks sporlarının kontamine kirli su ya da besin maddeleriyle alınması sonucu hastalık bulaşır (Jula ve ark. 2007). Enfeksiyonun insidansı kurak havalarda tozların solunum yoluyla alınması yada yağmurlu havalarda aşırı otlatma ile artabilmektedir. Solunum ve direk temas ile hayvanlar arası bulaşma nadirdir. Bazen sokucu sineklerin direk bulaşmada rol oynayabileceği bildirilmiştir (Jula ve ark. 2004).

İnsanlarda antraks infekte hayvanlarla veya kontamine hayvansal ürünlerle direk veya indirek temas sonrası bulaşır. Etkenin giriş yoluna göre deri, sindirim ve solunum antraksı ve bunlara ait klinik belirtiler ortaya çıkar. En yaygın ve ılımlı seyreden formu deri formudur. Diğer iki form ise nadir şekillenir ve insanların hayatını tehdit edecek boyutlara varan komplikasyonlara neden olabilir (Dixon ve ark. 1999).

1.2. Tarihçe

İnsanlık tarihi ve şarbon arasında uzun bir ilişki bulunmaktadır. Kutsal kitap Exodus'ta tanımlanan beşinci ve altıncı salgının evcil hayvanlarda görülmesi, hastalığın insanlara da bulaşması ve insanlarda deri lezyonlarının oluşması antraksı akla getirmektedir. Virgil, 16-18. yüzyıllar arasında Avrupa'da evcil ve yabani hayvanlarda

görülen şarbonu ekonomik açıdan önemli bir tarım hastalığı olarak nitelendirmiştir (Dirckx 1981, Hugh-Jones ve Vos 2002).

Antraks, mikrobiyal kökenli ilk hastalık olarak nitelendirilmiştir. Robert Koch tarafından 1876 yılında antraksın etkeni tanımlanmıştır. Louis Pasteur'un 1881 yılında antraks aşısını bulması ile canlı ve etkili olarak aşı geliştirilen ilk hastalık olmuştur (Pasteur ve ark. 1881). Ayrıca antraks solunum yolu ile bulaşan ilk meslek hastalığı olarak tanımlanmıştır. İngiltere'de 19. yüzyılın ikinci yarısında keçi kılı ve yün işçileri arasında antraksın daha önceden hiç görülmeyen bir formu olan akciğer formu tespit edilmiştir (LaForce 1978, Carter 2004).

Antraks etkeninin düşük dozlarda etkilerini gösterebilmeleri (Pınar 2010), düşük maliyetlerle kolay ve büyük miktarlarda üretilip depolanabilmeleri (Kılıç 2006), etki alanlarının geniş olması (uygun hava koşullarında çok geniş bir alanlara yayılabilmeleri), uygulanmalarının kolay olması (Kılıç 2006), yüksek mortalite ve morbiditeye sahip olmaları ve zoonotik karakter taşımaları (Pınar 2010) nedeniyle dünyadaki en tehlikeli biyolojik savaş ajanları içerisinde sınıflandırılmıştır.

1.3. Etiyoloji

1.3.1. Sınıflandırma ve Diğer Türler ile İlişkisi

Bacillaceae ailesi içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* türleri olmak üzere iki önemli bakteri grubu yer almaktadır. Eskiden *Bacillus* türleri arasında yer alan bazı bakteriler, DNA yapılarındaki G+C oranlarına göre ayrı cinsler olarak tanımlanmıştır. Bunlardan *Alicyclobacillus* cinsi termoasidofil üç tür kapsamaktadır. *Paenibacillus* cinsi daha önce *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus alvei* olarak isimlendirilen bakterileri, de içeren yaklaşık 20 türü kapsamaktadır. *Brevibacillus* cinsi daha önce *Bacillus brevis* ve *Bacillus laterosporus* olarak isimlendirilen bakterileri içeren 10 türü

kapsamaktadır. Diğerleri ise *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus* ve *Halobacillus* cinsleridir (Logan ve Turnbull 1999).

Bacillaceae ailesi içerisindeki *Bacillus* grubu barındırdığı 50 tür ile ailenin en büyük grubunu oluşturmaktadır. Bu bakteri cinsine ait en iyi bilinen türler; *B.anthraxis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis* olarak sıralanabilir. Bu türlerin rRNA dizisilerine bakılarak ‘*B.subtilis* grup’, ‘*B.cereus* grup’ ve ‘*B.circulans* grup’ olmak üzere üç tür grubu belirlenmiştir (Logan ve Turnbull 1999). Antraks etkeni *B.anthraxis* bu sınıflandırmada *Bacillus cereus* grubu içerisinde yer alır ve bu grup içerisinde bulunan *B.cereus*, *B.mycooides*, *B.pseudomycooides*, *B.thuringiensis* ve *B.weihenstephanensis* adlı diğer 5 tür ile benzer özellikler taşır (Berkeley ve Logan 1997).

Bacillus türlerinin çoğu ve *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* ve *Virgibacillus* türleri tabiatta saprofit olarak bulunmaktadırlar. Bazı türler insanlarda, hayvanlarda, diğer memelilerde ve böceklerde zorunlu patojen veya fırsatçı infeksiyon etkenidirler. İnsan ve hayvanlarda infeksiyon oluşturmaları açısından önemli olanlar *B.anthraxis* ve *B.cereus* türleridir (Logan ve Turnbull 1999).

1.3.2 Morfoloji

Bacillus anthracis, Gram pozitif, çomak şeklinde aerobik veya fakültatif aerobik ortamlarda üreyebilen, 1-2x3-8 mikrometre boyutlarında, hareketsiz, sporlu ve kapsüllü bir bakteridir (Aydın ve ark. 2006, Doğanay 2002).

İzolasyon için uygun klinik örneklerin kanlı besi yerine ekilmesi ve 37 °C’de bir gün inkübasyonu yeterlidir. Koloniler tipik olarak medusa başı ya da çevrelerinin kıvrımlı olmasından dolayı kuyruklu yıldız şeklinde görülür. Beyaz ya da gri koloniler

agardan öze ile kaldırmaya inatçıdırlar ve öze ile temas sonrası çırpılmış yumurta akı görüntüsüne neden olurlar (Öğütlü 2012).

Bacillus anthracis, dış ortamlarda spor formunda, insan veya hayvan vücudunda ise vejetatif halde bulunmaktadır. Vücut içinde gerekli mikroaerob ortam ve bikarbonat sağlanmasına bağlı olarak kapsül oluşumu gözlenir. Polipeptit (poly- γ -D-glutamik asit) bir yapıya sahip olan bu kapsüller yapı etkeni vücudun savunma sistemlerine karşı korur. Kapsülün toksijenik ve immunojenik etkinliği zayıftır. Giemsa ve diğer boyama yöntemleri ile dokulardan yapılan boyamalarda etken kapsüllü olup, tek tek veya 2-8 basillik zincirler şeklinde görülür. Ancak katı ve sıvı kültürlerde birbirine paralel filamentler saç görünümündedirler. Vücut dışına çıkan bakteriler oksijen varlığında elipsoid görünümde, 2-6 mikrometre büyüklüğündeki spor formlarını şekillendirir (Aydın ve ark. 2006).

1.3.3. Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Direnç

Bacillus anthracis'in spor formları ısı, soğuk, ultraviyole, kuruluk, yüksek ve düşük pH ve kimyasal dezenfektanlara daha dirençli olmasından dolayı vejetatif formundan çok daha dayanıklıdır. Vejetatif formu kadavra içerisinde 3-6 gün içerisinde tahrip olur ve dezenfektanlara karşı dirençsizdir (Aydın ve ark. 2006). Fakat spor formu nemli ısıda 121 °C'de 15 dakikada ve kuru ısıda 160 °C'de 60 dakikada inaktif hale gelir. Piyasadaki dezenfektanlara karşı dirençlidirler. Ancak yüksek konsantrasyonlarda formaldehit (%5-10), gluteraldehit (%2-4), hidrojen peroksit ve Merkürü klorit (1/1000) etkilidir. Katalaz pozitif olması ve spesifik gama fajına duyarlı olması ile de diğer türlerden ayırt edilir (Doğanay 2002).

1.4. Virülens Faktörler ve Patogenez

Bacillus anthracis'in hastalık yapma gücü kromozomal DNA'sının yanısıra sahip olduğu pX01 ve pX02 adlı iki küçük plazmidin varlığından kaynaklanmaktadır.

Patogenezinde bu iki plazmid önemli rol oynar. pX02 plazmidi bakteriye antifagositik özellik kazandıran polipeptid yapılu kapsülü kodlarken, pX01 plazmidi de konakta asıl fizyopatolojik değişikliklere yol açar iki ekzotoksin ve bunların prekürsörünün kodlanmasından sorumludur. pX01 plazmidi, koruyucu antijen (protective antigen, PA), ödem faktörü (edema factor, EF) ve letal faktör (lethal factor, LF) olmak üzere biyolojik olarak her biri inaktif üç bileşeni kodlar. PA ile EF bir araya geldiğinde aktif ödem toksinini oluşturur. Ödem toksini adenilat siklaz aktivitesi göstererek hücre içi siklik AMP (cAMP) seviyesini artırır (Öğütlü 2012). Buda su homeostazisi ile sonuçlanarak klinik olarak sıvı birikimine (ödeme) neden olmaktadır. Ödem faktörünün birinci hedefi fonksiyonlarını büyük ölçüde inhibe ettiği nötrofillerdir (Aydın ve ark. 2006). PA ile birlikte LF ise letal toksini oluşturur. Bu toksin kalmodilin bağımlı çinko metalloproteaz yapısındadır, mitojenlerle aktive edilen protein kinazları inaktive eder ve sinyal iletimini bozar, yangı mediatörlerinin salınımını artırır, makrofaj lizisini başlatır ve septik şok sonrası ani ölüme yol açar (Öğütlü 2012).

1.5. Epidemiyoloji

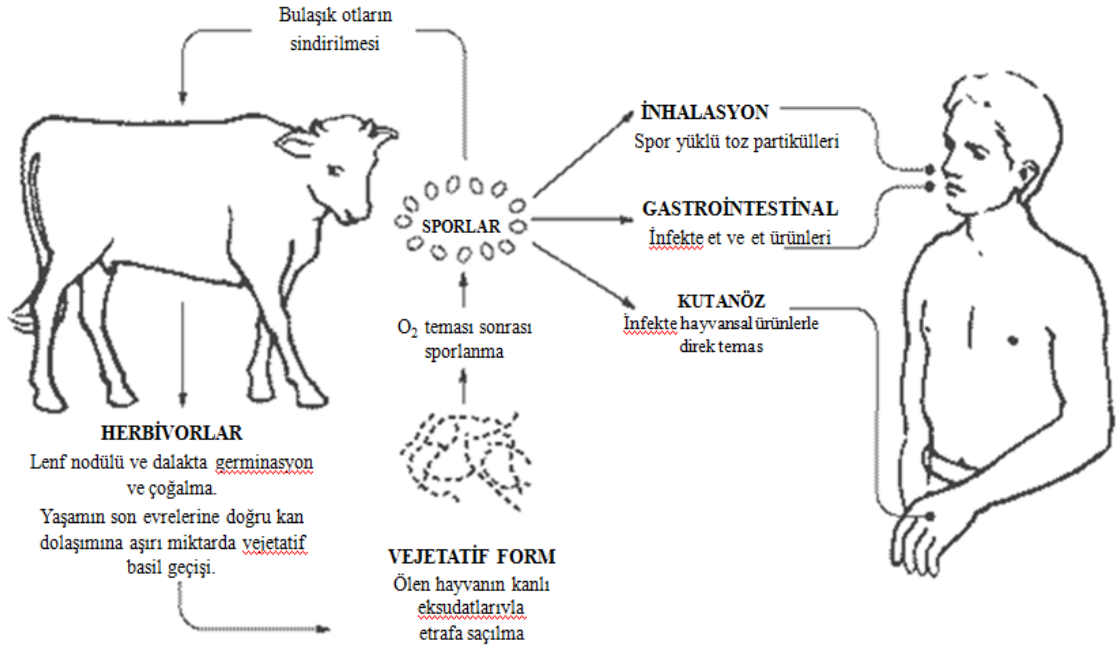
Antraks otçul hayvanlarda görülmekte olup, Orta Asya, Afrika ve Latin Amerika'da gelişmiş ülkelere oranla daha yaygındır. Birçok Avrupa ülkesinde ve Kuzey Amerika'da insan ve hayvanlarda antraksa sporadik olgular şeklinde rastlanılmaktadır. Ancak yapılan kontamine sevkiyatlar sırasında hastalık etkeni bu ülkelere de taşınmakta ve bu ülkeler için risk oluşturduğu bilinmektedir. Antraks ülkemizde halen endemik bir hastalıktır. Görülme sıklığı gittikçe azalmasına rağmen halen ciddi bir tehlike olarak karşımıza çıkmaktadır (Beyer ve Turnbull 2009).

Dünya üzerindeki antraks vakalarına bakıldığında, 1923'de Güney Afrika'da 30.000-60.000 hayvanın öldüğü tahmin edilmektedir. En büyük insan kaynaklı şarbon salgını 1979-1985 yılları arasında Zimbabve'de yaşanmıştır. Bu salgından 10.000 kişi etkilenmiş ve 182 ölümlerle sonuçlanmıştır (Öğütlü 2012). 1979 yılında Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliğinin Sverdlovsk eyaletinde askeri mikrobiyoloji ünitesinde kaza ile

antraks sporlarının solunmasıyla yaklaşık 96 vaka görülmüş, gastrointestinal şarbon diye bildirilmesine rağmen yıllar sonra raporlardan solunum yoluyla bulaş olduğu ortaya çıkmıştır (Sternbach 2003). Amerika Birleşik Devletleri'nin posta servisine 2001 yılında gönderilen antraks sporları sonrası 22 antraks vakası ve 5 ölüm gerçekleşmesi dikkatleri çekmiş ve antraks yeniden ön plana çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre yıllık 2000-20000 insan antraks vakası tahmin edilmektedir (Öğütü 2012).

1.5.1. Bulaşma

Antraksta bulaşma etkenin vücuda giriş yoluna göre sindirim, solunum ve deri yoluyla olabilir. Ölen hayvanlardan sızan kan, burun akıntısı, idrar, vb. sıvılar, infekte hayvanların karkasları ile otlaklar, etken sporları ile bulaşık hale gelmektedir. Bu tür kontamine alanlarda otlayan hayvanlarda sporları sindirim yoluyla alırlar. Solunum yoluyla bulaşma nadirdir, fakat antraks sporları ile yüklü toz partiküllerinin aerosol yolla alınması sonucu etken bulaşabilmektedir. Hayvanlar arasında deri yoluyla direk bulaşma nadir olmasına rağmen mümkündür. Bu tür bulaşmada sokucu sinekler (Afrika'da *Tabanus* ya da *Stomoxys* türleri, Amerika'da ısırıcı olmayan *Chrysoma* türleri) sorumlu tutulmaktadır (Figür 1) (Beyer ve Turnbull 2009).



Figür 1. Antraksın infeksiyon döngüsü (World Health Organization (WHO): Anthrax in human and animals, 4 th edition, 2008).

Antraks insanlara infekte hayvan veya hayvansal ürünlerle temas sonrası deri yoluyla veya nadiren bu tür kontamine ürünlerin tüketilmesi sonucu sindirim yoluyla ve spor taşıyan toz partiküllerinin alınması sonucu solunum yoluyla bulaşma meydana gelir. Bu nedenle hayvancılıkla uğraşanlar, kasaplarda, çoban yada veteriner hekimler risk grubunu oluşturmaktadır (Demetrius 2002).

1.6. Klinik Belirtiler

1.6.1 Hayvanlarda Klinik Belirtiler

Hayvanlarda hastalık özellikle geniş getirenlerde perakut ve akut seyredir. Perakut olgularda etken vücutta çabuk üreyerek hiçbir klinik belirti oluşturmadan ani ölümle son bulur. Bu seyir sırasında sendeleme, solunum güçlüğü, ayakta duramama, titreme, halsizlik, yere düştükten kısa süre sonra koma ve ölüm şekillenir. Konakçı direncinin daha yüksek olduğu akut olgularda ise vücut ısısı artar ve ölüm 3-4 gün

içerisinde gerçekleşir. Bu tür olgularda, hayvanlarda huzursuzluk, iştahsızlık, aralıklı ishal veya tam tersi kabızlık, gebe hayvanlarda abort gibi belirtilere rastlanmaktadır (Sterne 1959).



Resim 1. Hayvanlarda antraks; açık alanda bırakılmış boğa (sol) ve şişkin, çamur kıvamında ve kolay parçalanabilen dalak (sağ) (Prof. Dr. Mitat Şahin'in arşivinden alınmıştır).

Antrakstan ölen hayvanlarda kadavranın çok çabuk kokuştugu ve şiddetli timpani şekillendiği, ölüm sertliğinin (rigor mortis) geç ve tam şekillenmediği, doğal deliklerden (ağız, burun, anüs vb.) koyu renkli kan geldiği, nekropside ise dalağın çamur kıvamında ve normalin 3-4 katı büyümüş, şişmiş olduğu göze çarpar (Resim 1) (Vos 1994).

1.6.2 İnsanlarda Klinik Belirtiler

İnsanlarda antraks etkenin vücuda giriş yoluna göre deri, gastrointestinal ve inhalasyon (akciğer) formu olmak üzere üç şekilde gerçekleşir. Yine inkübasyon süresi etkenin giriş yoluna göre değişmektedir (Pınar 2010). Deri yoluyla bulaşmada 3-7 gün, solunum yoluyla bulaşmada 1-6 gün (Franz ve ark. 2001, Spencer 2003) ve sindirim yoluyla bulaşmada 1-7 gün sonra hastalık belirtileri görülmeye başlar. İnfekte edici doz (ID₅₀ yaklaşık 10000 spordur) ile ilişkili olarak inhalasyon antraksı 1.5 ay sonra bile ortaya çıkabilmektedir (Pınar 2010).

1.6.2.1 Deri Formu

Doğal yollardan oluşan antraks olgularının %95' inden fazlası deri formu şeklindedir. *B.anthraxis* sporlarının basit bir travmayı takiben deriyle temasından sonra etkenin giriş yerinde 1-7 günlük kuluçka süresinden sonra küçük kaşıntılı bir papül oluşur. Lezyonlar daha çok açıkta olan baş, boyun ve ekstremitelerde görülür (Aydın ve ark. 2006). Eşlik eden kaşıntı nedeniyle bu ağrısız lezyon böcek ya da örümcek ısırığı ile karıştırılır (Öğütü 2012). Papülden 1-2 gün sonra lezyonun etrafında vezikül oluşur ve 1-2 cm'ye ulaşır. Vezikül seröz bir sıvı içerir. Lezyonda irinleşme ve ağrı olmaz. Vezikül ince duvarlı ve kolayca parçalanabilir. Ardından ülser zemininde koyu kahverenginden siyaha dönen bir skar gelişir. Lezyonu çevreleyen ödemli doku üzerinde küçük veziküller gelişir. Bunlar da nekroze olur, siyahlaşır ve primer lezyonla birleşir. Bu genişlemiş lezyona “şarbon püstülü” adı verilir (eski adı pustula malign). Çapı 6-9 cm'ye kadar ulaşabilir. Skarı çevreleyen doku geniş ödemli ve kırmızıdır. Hastalığın şiddetine göre yüksek ateş, bölgesel lenfanjit ve lenfadenit vardır. Lenf düğümleri şiş ve ağrılıdır (Öğütü 2012).



Resim 2. Antraksın deri formuna ait insan vakaları (Prof. Dr. Mitat Şahin'in arşivinden alınmıştır).

Deride nekroz yerinde ağrı ve apseleşme olmaz. Ancak, sekonder enfeksiyon gelişirse ağrı ve apseleşme olabilir. Deri şarbonu ağır veya ılımlı seyredebilir. Ülser olgunlaştıkça tabanı karakteristik olarak siyah renk alır ve Yunanca'da buna kömür anlamına gelen 'antrakisten' türeyen 'antraks' adı verilmiştir (Resim 2). Komplike

olmayan (sekonder yayılım göstermeyen) lezyonlar 1-3 haftalık süre içinde yavaş yavaş iyileşir, iz bırakmadan kaybolur (Öğütlü 2012).

1.6.2.2 İnhalasyon (Akciğer) Formu

Doğal yoldan gelişen inhalasyon antraksı günümüzde oldukça nadirdir. Eğer görülürse planlı bir şarbon spor yayılım ihtimali hemen akla gelmelidir. İnhalasyon ile 5µm den daha küçük partiküller halinde terminal bronşiolere ve alveollere ulaşan sporlar, alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilir ve mediastinal lenf düğümlerine taşınır. İnkubasyon periyodu 1-6 gündür. Bir haftayı nadiren geçen inkübasyon periyodu, biyoterör saldırısı gibi maruziyetlerde spor miktarı düşük olacağından 60 gün ya da daha uzun süreli olabilmektedir. İlk semptomlar iki-beş gün içinde hafif ateş, kırgınlık, miyalji ve yorgunluk gibi grip benzeri hastalık bulguları ile karakterize erken prodrom bulguları ile başlar. Bazı olgularda belirgin baş ağrısı, yorgunluk, bulanık görme, fotofobi, kuru öksürük ve göğüste hafif rahatsızlık hissi görülebilir. Önce 2-3 gün hafif prodromal başlangıç belirti ve bulguları görülür. Ardından orta-şiddetli akut hastalık tablosuna ilerler. Hastanın ateşi yükselir, nabızı süratlenir, öksürük, dispne ve siyanoz gelişir. Hastada solunum sıkıntısı, plörotik göğüs ağrısı, aşırı terleme, toksemi, şuur bulanıklığı, konfüzyon ve koma gelişerek ölümle sonuçlanır. Dinlemekle akciğerlerde yaş raller duyulabilir ancak balgam oluşumu pek görülmez. Bulantı, kusma, solgunluk veya siyanoz, aşırı terleme, mental durum değişiklikleri ve hemokonsantrasyon bulguları grip benzeri hastalıklardan ziyade akciğer şarbonu ile birlikte sık görülür. Bu evrede kan kültür pozitifliği tipiktir. Hastalar tedavi olsa da geç fulminan evreye (eski ismiyle fulminan akut faz) girebilirler. Bu hastalar ağır bakteriyemi ve toksemi nedeniyle entubasyon gerektiren solunum yetmezliği, sepsis, menenjit ve çoklu organ yetmezliğine girer. Ölüm sıklıkla 24 saat içinde gelişir (Öğütlü 2012).

1.6.2.3 Gastrointestinal Form

Gastrointestinal antraksı orofarengal ve barsak formu şeklinde meydana gelir ve insanlarda oldukça nadir görülür. Gelişmekte olan ülkelerde özellikle kırsal bölgelerde antraks olgularının yaklaşık %1'ini oluşturur. İnkübasyon periyodu 3-7 gündür. Kontamine gıda tüketimini takiben gastrointestinal mukozada lezyonlar oluşur. Bu lezyonlar gastrointestinal kanalın her yerinde görülebilir. Gastrointestinal formu akciğer formunda olduğu gibi sekonder bakteriyemi, sepsis ve organ tutulumları sık görülür. Ağır toksemi, sepsis ve septik şok gelişerek hastalar kaybedilir. Orofarengal ve bağırsak formu aynı bireyde birlikte görülebilir (Öğütlü 2012).

1.7. Teşhis

Antraks şüpheli hayvanlarda antemortem muayenede 42 °C'ye kadar yükselen ateş, depresyon, abort, subkutan ödem ve kanlı mukuslu bir ishal; postmortem muayenede ise tam olmayan rigor mortis, ödem, katran renginde koyu pıhtılaşmamış kan ve kanlı vücut boşlukları görülür. Antraks şüpheli ölümlerde otopsi yapılmaz. Şayet otopsi yapılmışsa aşırı derecede büyümüş çamur kıvamında dalak en önemli bulgudur. Fakat ne antemortem ne de postmortem bulgular antraksın kesin teşhisi için yeterli değildir.

Antraksın kesin teşhisi laboratuvar muayeneleri ile yapılır. Bu amaçla otopsi veya muayene sırasında alınan numuneler soğuk zincirde ve güvenli bir şekilde laboratuvara sevk edilmesi gerekir. Antrakstan ölmüş taze karkaslardan alınacak kan ve benzeri vücut sıvıları, lenf nodülü ve dalak gibi doku parçaları etkenin direk incelenmesinde ve kültürünün yapılmasında laboratuvara gönderilecek en uygun örneklerdir. Bunun yanı sıra su, toprak gibi çevresel ürünler ile kontamine olduğu düşünülen bazı gıda ürünleri de teşhis amaçlı incelenecek örnekler arasında sayılabilir (Aydın ve ark. 2006).

1.7.1 Kapsül Boyama

Virüent bir *B.anthraxis*, ölen hayvanların kan ve benzeri dokularından taze olarak hazırlanan sürme preparatlarda kapsüllü olarak görülür. Bu tür dokulardan hazırlanıp, fikse edilen preparat Giemsa veya polikrom metilen mavisi (MacFadyean boyama yöntemi) ile boyandığında *B.anthraxis*'in vejetatif yapısı koyu mavi/mor boyanırken, kapsül ise bakteri hücresi etrafını saran pembe bir katman olarak karşımıza çıkar (M'Fadyean 1903).

1.7.2 İzolasyon ve İdentifikasyon

Bacillus anthracis çoğu nutrient agar türünde ürer, fakat taze ve kontamine olmayan materyallerden etken izolasyonunda genellikle %5-7 koyun kanı içeren kanlı agar kullanılır. Kan ve benzeri vücut sıvıları veya diğer dokulardan alınan svap örnekleri kanlı agara sürme tarzında ekim yapılır ve 37 °C' de aerob ortamda bir gece inkübasyondan sonra 0,3-0,5 cm çaplarında grimsi beyaz, hemoliz yapmayan ve tipik medusa başı olarak adlandırılan rough (R) koloniler elde edilir (51).

Bacillus anthracis'in eskimiş veya bozulmuş örneklerden, işlenmiş materyallerden veya toprak gibi çevresel örneklerden saptanmasında bu tür örnekler beraberinde kontaminant bakterileri de getireceği için kanlı agar gibi selektif olmayan besiyerleri yetersiz kalmaktadır. Bu tür örneklerin işlenmesinde uygulanacak prosedür WHO'nun 'Anthrax in Humans and Animals' adlı referans kitabında detaylı bir şekilde verilmiştir. Özetle bu tür örneklerden hazırlanacak süspansiyonlar 62,5-63 °C ve 30-60 dk ön ısı uygulamasından sonra kanlı agara göre daha selektif olan PLET (polimiksin, lizozim, EDTA agar) besiyerine ekim yapılır 37 °C' de 24-48 saatlik inkübasyonu takiben koloniler elde edilir (World Organisation for Animal Health (OIE) 2012).

Bacillus anthracis'in identifikasyonu tipik mikroskobik ve makroskobik morfolojilerine ve bazı özel testler ile yapılır. Koloni yapısı ve mikroskop sahasındaki

tipik görüntüsünün yanı sıra kapsül ve spor üretimi, gram boyanma özelliği, hareketsiz oluşu, gama fajı ile pozitif reaksiyonu varlığı, penisilin duyarlılığı ve diğer birçok biyokimyasal test identifikasyonda yeterlidir. Bunların yanı sıra hem identifikasyon hem de virülens değerlendirmesinde kobay, tavşan vb deneme hayvanlarına inokülasyon da yapılmaktadır. Antraks basiline ait çeşitli antijenik yapıların test edildiği askoli reaksiyonu ve diğer immunofloresan teknikler teşhis amaç kullanılabilmektedir. Hastalığın retrospektif yorumlanmasına yönelik ELISA gibi duyarlılığı yüksek tekniklerde vardır. Ayrıca bazı ülkelerde insanlarda AnthraxinT gibi aşırı duyarlılık mekanizmasına dayalı alerjik testlerden de faydalanılmaktadır (OIE 2012).

1.7.3. Moleküler Teknikler

Antraksın teşhisinde izole edilen suşların tanımlanması, virülens analizinin yapılması veya izolasyonun zor olduğu toprak ve benzeri kontamine çevresel örneklerden *B.anthraxis* etkeninin direk belirlenmesi amacıyla moleküler bazlı teknik olan PZR' den çok sıklıkla faydalanılmaktadır. PZR kullanılan primerler etkenin protektif antijen geni (*pag*), lethal faktör geni (*lef*), ödem faktör geni (*cya*) ve kapsül genleri (*capA*, *capB*, *capC*) ve kapsül depolimerazyon geni (*dep*) gibi hedef bölgelerin saptanmasına yönelik dizayn edilmektedirler (Ramisse ve ark. 1999, Beyer 1999, Ellerbrok 2002).

1.8. Tedavi

Çoğu zaman antraksa yakalanmış hayvanlar tedavi edilmeden itlaf edilirler. Ancak çok kıymetli hayvanlar ya da pet hayvanlarında etkene yönelik spesifik antibiyotik tedavisinin yanı sıra, destekleyici tedavi yöntemlerinde uygulanması gerekir.

İnsanlarda antraksın tedavisinde ilk akla gelen ve uygulanabilecek preparat penisilindir. Mutasyona uğramamış çoğu *B.anthraxis* suşu bu grup ilaçlara duyarlıdır.

Fakat ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) tarafından özellikle sistemik infeksiyonlarda süşun antibiyotik duyarlılığı belirleninceye kadar uygulanabilecek diğer alternatif preparatları da sunmuşlardır. Bunlar içerisinde tetrasiklin, makrolid, aminoglikozit, florokinolon, karbapenem, klindamisin, rifampisin, kloramfenikol ve 1. kuşak sefalosporin gibi geniş bir yelpazedeki birçok antibiyotik sayılabilir. Ancak biyoterör etkeni olarak kullanılan şarbon süşlarının penisiline azalmış duyarlılık gösterebileceği unutulmamalıdır. Bu gibi şüpheli durumlarda şarbon enfeksiyonlarında siprofloksasin ve doksisisiklinin ilk seçenek olmalıdır (Öğütü 2012).

1.9. Kontrol ve Korunma

Bacillus anthracis'in çevresel koşullara dayanıklılığının çok fazla olması nedeniyle en etkin korunma tarım alanlarında, antraksın endemik bulunduğu bölgelerde hayvanların ve risk altında olan insanların aşılansıdır. Aşılama alanındaki ilk gelişme Pasteur'un 1881 yılında koyunlar için zayıflatılmış sporlar ile ilk antraks aşısını geliştirmesi olmuştur (Whitney ve Jamie 2002). Ülkemizde, Cumhuriyetin ilk yıllarında Türk Üniversal Aşı (TUA)'sından yararlanılmış olup günümüzde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Veteriner Merkez Kontrol Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen Max-Sterne aşısı kullanılmaktadır. Aşı hayvanlara 2-6 aylık dönemlerde uygulanmakta ve yaklaşık 6-12 ay bağışıklık sağlayabilmektedir (Aydın ve ark. 2006).

Bildirimi zorunlu bir hastalık olan antrakstan korunmada aşılamanın yanısıra karantina, infekte hayvana ait karkasın uygun bir şekilde imhası (gömmeye veya yakma gibi), sporlar ile bulaşık alanların uygun ajanlarla (hidrojen peroksit, parasetik asit, çamaşır suyu vb.) dekontaminasyonu gibi uygulamaların da önemi büyüktür (Aydın ve ark. 2006).

İnsanlarda antrakstan korunmanın temel şartı hayvanları hastalıktan korumak, infekte hayvan ve kontamine hayvansal ürünlerden uzak durmaktır. Bazı ülkelerde özellikle risk altındaki meslek gruplarında antraksa karşı çeşitli aşılar kullanılmaktadır.

Ülkemizde insanlar için yürülükte olan herhangi bir antraks aşısı yoktur. Ayrıca insanlarda özellikle aerosol yolla sporlara maruziyeti takiben koruma amaçlı antibiyotik tedavisi de uygulanmaktadır.

1.10. Biyoterörizm ve Antraks

1.10.1 Biyolojik Silah Kavramı

İnsanlığın var oluşundan bugüne kadar devletler ve toplumlar arasında süregelen bir rekabet vardır. Jeopolitik, siyasi ve ekonomik her türlü alanda devletler ve toplumlar birbirini üzerinde egemenlik kurmak ve güçlerini kabullendirmek amacıyla zamanın teknolojilerini kullanmaktan çekinmemişlerdir. 20. yüzyıla kadar ilkel ve patlayıcı kökenli silahlar kullanılırken bilim ve teknolojinin hızla ilerlemesiyle beraber kullanılan silahlarda değişmiştir. Son yıllarda kimya, mikrobiyoloji ve fizik alanındaki ilerlemelere bağlı olarak kimyasal, biyolojik ve nükleer silahlar geliştirilmiştir. Geçmişe göz atıldığında ilkel insanlar hayvan ve bitki zehirlerini kullanarak avlanmışlar; aynı okları savaşlarda kullanmışlar, kimi zaman da düşmanlarının kuyularına kadavra ve hayvan leşlerini atarak su kaynaklarını kirletme yoluna gitmişlerdir (Yenen ve Doğanay 2008).

Kişiler, gruplar veya hükümetler tarafından gerek ideolojik, gerekse politik veya finansal kazanç sağlamak amacıyla hastalık yapıcı mikroorganizma veya ürünlerinin (biyolojik silahların) insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde hastalık oluşturmak ve/veya ölüme neden olmak amacıyla açık veya gizli şekilde yayılması biyoterörizm olarak tanımlanabilir. Bu amaçla kullanılan mikroorganizma, toksin, arakonak hayvanlar, bitki ekstraktları, zararlı haşereler ve hayvanlara da biyolojik silah adı verilir (Özüçelik ve ark. 2004).

1.10.2 Biyolojik Silahların Tarihçesi

Biyolojik silahların kullanımının insanlık tarihi kadar eski olduğu düşünülmektedir. Geçmişten günümüze insan hayatını olumsuz etkileyen ve birçok insanın hayatına mal olan biyolojik savaş denemelerine yönelik bilgiler aşağıda sunulmuştur.

M.Ö. 400 Scthyian okçularının eski tarihte, oklarını çürüten cesetler ya da kanla karıştırılmış hayvan gübrelereine daldırarak enfekte hale getirerek kullanması (Kılıç 2006).

M.Ö. 300 Romalılar, Persler ve Yunanlıların hayvan leşlerini kuyular ve diğer kaynaklara atmak suretiyle içme sularını kirletmesi (Kılıç 2006).

M.Ö. 184 Hannibal ve Yunan Kralı Eumenes arasındaki deniz savaşında, Hannibal'ın denizcileri tarafından yunan gemi güvertelerine içi zehirli yılanlarla dolu testilerin atılması (Kıbaroğlu 2002).

1155 Kral Barborosa tarafından İtalya Tortona'daki su kaynaklarının insan cesetleriyle kirletilmesi (Kıbaroğlu 2002).

1346 Tatar ordusunun günümüzde Ukrayna sınırlarında yer alan Feodossia (Kaffa) kentini kuşatmaları esnasında mancınıkla vebadan ölmüş insan ve hayvan cesetleri atması. Takip eden yıllarda veba, gemilerdeki fareler aracılığı ile Avrupa kıtasına taşınmış ve 1348-1352 yılları arasında pandemi oluşturarak 25-30 milyon insanın ölümüne neden olmuştur (Kıbaroğlu 2002).

1495 İspanyollar tarafından Napoli'de Fransızlara lepralı hasta kanı ile karıştırılmış şarapların verilmesi (Kıbaroğlu 2002).

1500'ler İspanyol kaşif Pizarro'nun Orta ve Güney Amerika'da yerlilere çiçek virüsüyle kontamine kıyafetleri vermesi (Kibaroglu 2002).

1650 Polonya ordusu tarafından kuduz köpek salyası içeren kürelerin düşman birliklerine atılması (Kibaroglu 2002).

1710 Rus ordusu tarafından Estonya'da İsveçlilere karşı vebalı cesetlerin kullanılması (Kibaroglu 2002).

1763 Kuzey Amerika'da İngiliz ve Fransızlar arasındaki savaşta Fransa tarafında yer alan Kızılderililere, Kuzey Amerika'daki İngiliz Kuvvetlerinin komutanı olan Sir Jeffrey Amherst tarafından çiçek hastalarının yattığı hastaneden alınan kontamine battaniyeler ve mendillerin dağıtılması. Bu uygulamadan ilham alan kaptan Ecuyer 1763'de çiçek virüsü ile enfekte mendil ve battaniyeler hediye ettiği Ohio Vadisi yerlilerinde büyük bir epidemi çıkmasını sağlamıştır. Bu epidemi daha önce çiçek virusuyla hiç karşılaşmamış ve immunolojik açıdan tamamen korunmasız durumdaki yerli kabilelerde büyük kayıplara neden olmuş ve %90'a varan ölümler görülmüştür (Kibaroglu 2002).

1797 Napolyonun İtalya seferinde kuşattığı Mantua şehrinde yaşayanlara sıtma hastalığı bulaştırmaya çalışması (Kibaroglu 2002).

1862 Amerikan İç Savaşı sırasında çiçek ve sarıhumma virüsü içeren kıyafetlerin dağıtılması (Kibaroglu 2002).

1900 Birinci Dünya Savaşında Alman ordusunun şarbon, glanders, kolera ve buğday mantarlarını biyolojik harp maksadıyla kullanması (Kılıç 2006).

1925 Kimyasal ve biyolojik ajanları yasaklayan ilk çok uluslu anlaşmanın 108 ülke tarafından imzalanması (Kılıç 2006).

İkinci Dünya Savaşında Japonların Mançurya’da kurdukları Gizli Biyolojik Harp Araştırma Enstitüsü’nde tutuklu insanların üzerinde denemeler yapması, 3000’den fazla insana veba, şarbon, syphilis ve diğer ajanları enjekte ederek hastalıkların etkilerini görmeleri ve geliştirmeleri (Kılıç 2006).

1942 ABD Savaş Araştırmaları Servisinin kurulması (Kılıç 2006).

1942-1943 İngilizlerin İskoçya’nın güney batısındaki Gruinard Adasında denemeler yapması ve şarbon bombalarının stoklanması (Kılıç 2006).

1979 Sverdlosk (Yekaterinburg)-SSCB’deki biyolojik harp araştırma merkezinden kaza ile şarbon sporlarının yayılması sonucu en az 66 kişinin yaşamını yitirmesi (Kılıç 2006).

1985 Irak’ın şarbon, botulinum ve aflatoksini başta olmak üzere saldırı maksatlı silahları geliştirmeye başlaması (Kılıç 2006).

1994 Aum Shinrikyo örgütünün Tokyo’da binaların üzerinden şarbon yaymaya çalışması (Kılıç 2006).

2001 ABD basını ve hükümetine yönelik şarbonlu mektup saldırılarının yapılması (Kılıç 2006).

1.10.3 Biyolojik Silahların Sınıflandırılması

1.10.3.1 Hedeflerine Göre Sınıflandırılma

Hedeflerine göre biyolojik savaş ajanları; anti personal (personele karşı), anti animal (hayvanlara karşı), anti plant (bitkilere karşı) ve teçhizata karşı kullanılanlar olmak üzere 4 gruba ayrılır (Özüçelik ve ark. 2004).

Anti personal yani personele karşı kullanılan ajanlarda insanlarda ölüm, hasar, kargaşa ve stres oluşturmak amacıyla kullanılırlar. İnsanlara karşı kullanılan biyolojik savaş ajanları doğrudan doğruya insanlara karşı etkili olup, hastalık yoluyla ölüme sebebiyet verme ölçülerine göre sınıflandırılırlar. Günümüzde insanlara karşı biyolojik savaş ajanı olarak tüberküloz, tetanoz, veba, antraks gibi bakteriyel ajanlar; çocuk felci, kuduz, kızamık gibi viral ajanlar ve koksidiyosis, histoplasmosis gibi mantarlar kullanılmaktadır (Özüçelik ve ark. 2004).

Anti animal yani hayvanlara karşı kullanılan biyolojik silahlar hedef kitlelerine göre öncelikli olarak insanların en çok faydalandığı ve beslenmek amacıyla kullandığı koyun, keçi, sığır, at ve kümes hayvanlarına karşı kullanılmaktadır. Kullanılan en etkili biyolojik ajanlar bakteriler, virüsler ve riketsialardır. Özellikle ekonomik değeri olan hayvanlarda; şarbon, şap, veba, tularemi gibi geniş dağılım alanlarına sahip hastalıkları oluştururlar. Hastalık etkenleri biyolojik tekniklerle dağıtılabileceği gibi hayvandan hayvana direk temas, yemleme, su ve dışkı ile de bulaşabilir (Özüçelik ve ark. 2004).

Anti plant yani bitkilere karşı kullanılan biyolojik savaş ajanları funguslar, bakteriler, virüsler, parazitler ve haşerelerdir. Patates çürümesi, pas hastalığı ve tütün mozaik hastalığı gibi birçok hastalık ajanı buna örnek olarak verilebilir (Özüçelik ve ark. 2004).

Teçhizata karşı kullanılan biyolojik maddeler teçhizatı bozan, kırılmasına neden olan organizmalardır. Kauçuk maddeler, binalar, deri veya benzeri dokuma ürünlerine zarar veren funguslar, petrol ürünlerini kendi yararına kullanarak mekanik bariyer oluşturan bakteriler buna örnek verilebilir (Özüçelik ve ark. 2004).

1.10.3.2 Orijinlerine Göre Sınıflandırma

İnsan, hayvan ve bitkiler gibi yaşayan organizmalarda sağlık problemleri ve ölümlere yol açan biyolojik savaş ajanları etki mekanizmaları, uygulanış şekilleri,

oluşturduğu klinik semptomlar gibi biręok yönden sınıflandırılabilceği gibi orijinlerine göre de sınıflandırılmaktadır. Buna göre biyolojik savaş ajanları bakteri, virüs, mantar ve bunların toksik ürünlerinden oluşmaktadır. CDC tarafından bulaşanlar A, B ve C olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Serinken ve Kutlu 2009).

A grubundaki ajanlar yüksek öncelikli ajanlar olarak adlandırılır, ulusal güvenlik riski taşırlar, kolayca bulaşır ve yayılırlar, yüksek mortaliteye sahiptirler, halk sağlığı açısından potansiyel önemi vardır, ulusal bir paniğe neden olabilir ve halk sağlığı açısından özel bir hazırlık gerektirir (Serinken ve Kutlu 2009).

B grubu ajanlar yayılmaları nispeten daha kolaydır ve A grubuna oranla düşük morbidite ve mortaliteye sahiptirler (Serinken ve Kutlu 2009).

C grubu ajanların, erişim, üretim ve yayılımları kolaydır, yüksek mortaliteye sahiptirler ve önemli halk sağlığı problemleri yaparlar. Önceden beri var olan bu ajanlar bu tür biyolojik saldırı amaçlı yeniden tasarlanan ve ortaya ęıkarılabilen hastalık ajanları olarak bilinir (Serinken ve Kutlu 2009).

Tablo 1. Biyolojik silahların orijinine göre sınıflandırılması (Pınar 2010).

KATEGORİ	AJANLAR
Grup A	<i>Variola major</i> (smallpox, çiçek) <i>Bacillus anthracis</i> (şarbon) <i>Yersinia pestis</i> (veba) <i>Clostridium botulinum</i> toksini <i>Francisella tularensis</i> (tularemi) <i>Filovirüs</i> (viral hemorajik ateş); Ebola hemorajik ateşi, Marburg hemorajik ateşi <i>Arenavirüs</i> ; Lassa, Junin vb.
Grup B	<i>Coxiella burnetti</i> (Q humması) <i>Brucella</i> sp. <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Alpha virüs</i> Venezuela ensefalomiyeliti Doğu- Batı equine ensefalomiyeliti Ricin toksini <i>Clostridium perfringens</i> epsilon toksin <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Eschericia coli</i> O157:H7 <i>Vibrio cholerae</i> <i>Staphylococcus</i> enterotoksin B
Grup C	<i>Nipah virüs</i> <i>Hanta virüs</i> Tickborne hemorajik ateş virüsü Tickborne ensefalit virüsü Sarı humma virüsü Ricin toksini Stafilokokkal enterotoksin B <i>Rickettsia prowazekii</i> (Tifüs humması) <i>Vibrio cholerae</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> Çoğul ilaç dirençli tüberküloz

1.10.4 Biyolojik Silah Olarak Antraks

Biyolojik silah olarak birçok bakteriyel hastalık etkeni sayılabilir. Bunların arasında yer alan antraks etkeni *B.anthraxis*' in fazla teknik koşul gerektirmeden kolay kültürünün yapılabilmesi, sporlarının çevre koşullarına dayanıklı olması, kolayca stoklanabilmesi, taşınabilmesi, spor çaplarının inhalasyon için uygun olması, kolaylıkla küçük partiküllere bağlanabilmesi ve konak üzerindeki mutlak etkisinden dolayı biyolojik silah etkeni olarak dikkatleri çekmektedir (Doğanay 2002).

Antraksın biyolojik silah olarak kullanımına yönelik çalışmalar 80 yıl öncesine dayanmaktadır. Bugün en az 18 ülkenin saldırı amaçlı biyolojik silah programları olduğu bilinmekle birlikte bunların kaçının antraks ile ilgili olduğu belirlenememiştir. Ancak Irak'ın antraksı etkenini biyolojik silah olarak ürettiği yönünde bilgiler vardır (Doğanay 2002).

Bacillus anthracis ilk defa Birinci Dünya Savaşı'nda hayvanlara karşı, İkinci Dünya Savaşı'nda ise özellikle İngiltere tarafından geliştirilerek hayvanlara ilaveten insanlara karşı da kullanılabilecek bir silah haline getirilmiştir (Bacon 2003). Biyolojik savaş tarihi açısından 1979 yılında eski Sovyetler Birliği'nde bulunan Sverdlovsk'de (şimdiki Ukrayna' nın Yekaterinburg şehrinde) 19 nolu Sovyet Askeri Birliği Biyolojik Araştırma Laboratuvarı'nda meydana gelen ölümcül kaza önemli bir antraks vakası sonucu olmuştur. Şarbon sporlarının bulunduğu laboratuvardan yayılan bakteriler, rüzgarın etkisiyle 79 sivilin akciğer formuna yakalanmasına ve 68'inin ölümüne yol açmıştır (Inglesby ve ark. 2002). Ekim 2001'den Ocak 2002'ye kadar olan bir zaman aralığında antraks sporu içeren mektuplar ile yapılan saldırılar sonucunda ABD'de toplam 22 antraks vakası (11 akciğer, 11 deri formu) tespit edilmiş ve bu vakalardan 5 tanesi hayatını kaybetmiştir (Karayılıanoğlu ve ark. 2006). Diğer binlerce insan antibiyotik tedavisi görmüş ayrıca aşılanmışlardır. Bu olay Amerika Birleşik Devletleri içindeki kolluk kuvvetlerini, bilimsel çevreyi ve tıbbi toplulukları derinden etkilemiştir. Saldırılar sonucunda, *B.anthraxis* ve diğer patojenlerin, aerosol yolla enfeksiyon

oluşturma potansiyeli, özellikle devlet ve kamuda yarattığı tehdit konusunda farkındalık artmıştır. Yeni alışmalar antraksın hızlı tanı ve dekontaminasyon yöntemlerine odaklanmıştır. Çünkü devam eden terörizm tehdidi tedavi, aşı, teşhis, tıbbi önlemler ve cihazların geliştirilmesi konusunda bir aciliyet ortaya çıkarmıştır (Purcell ve ark. 2007).

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Alanı

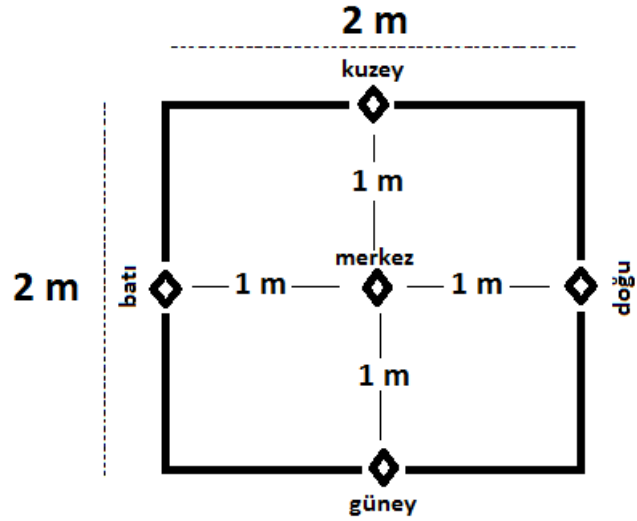
Bu çalışma coğrafik olarak Kuzey-Doğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Kars İl'inde gerçekleştirilmiştir. Rakımı ortalama 2000 m'yi bulan Kars ili topraklarının büyük bölümü yaylalardan oluşur. Akarsu vadileriyle yer yer parçalanan ilde yaylalar dalgalı düzlüklerden oluşur. Kars ilinde karasal iklim hâkimdir. Kışları kurak, yazları ise yağışlı geçen ilde kışın sıcaklıklar -39°C 'ye kadar düşer. Karla kaplı gün sayısı 120'den fazladır. Kars ili kırsalındaki en temel ekonomik sektör hayvancılıktır. Çayır ve mera arazileri %39,2 ile tarımsal araziden daha geniştir. Bu oranın büyük oluşu ilde özellikle küçükbaş ve büyükbaş hayvancılığının gelişimine büyük katkı sağlamaktadır. İl merkezinde 2012 yılı verilerine göre 93.261 sığır ve 72.480 koyun bulunmaktadır (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Kars>, Erişim tarihi: 19 Mart 2013, www.karstarim.gov.tr, Erişim tarihi: 19 Mart 2013).

2.1.2. Toprak Örneklerinin Kaynağı

Toprak örneklerinin kaynağını Kars İli sınırları içerisinde bulunan ve şarbon şüphesiyle ölmüş hayvanların (sığır, koyun) gömüldüğü hayvan mezarları, kan ve benzeri vücut sıvılarının bulaştığı toprak zeminli alanlar ve karkaslarının bırakıldığı sınırlı açık mera alanları oluşturdu. Bu alanların aktif kontamine alanlar olduğu hayvan yetiştiricileri ve infekte hayvanlara ait karkasların imhasını gerçekleştiren insanlar tarafından doğrulandı (Resim 3).

2.1.3. Örnekleme Stratejisi ve Örnek Sayısı

Çevresel örneklerde aranan bakteriler çoğu zaman odağa eşit şekilde veya rastgele dağılmış şekildedir. Özellikle toprak örneklerindeki mikrobiyal floranın dağılımı toprak derinliği ve çeşitli lokal sıvı hareketliliği gibi birçok çevresel faktörün etkisi altındadır. Bu tür yerlerden yapılacak örneklemenin istatistiksel olarak anlam ifade edebilmesi için birçok araştırmacı tarafından değişik hesaplamalar yapılmış ve farklı örnek sayıları ve örnek metodları öne sürülmüştür. Fakat örneklemede önemli olan en ekonomik şekilde en doğru örnekleme yapmak ve ideal sayıda örnek almaktır. Bu nedenle bazı durumlarda örnek sayısı azaltılabilir. Burada belirleyici olan örneklenen odağın zemin yapısı (toprak, beton veya ahır zemini vb.), kontaminasyonun boyutu ve kullanım amacıdır. Kontaminasyonun bizzat hayvan yetiştiricileri veya imha eden kişiler tarafından doğrulandığı durumlarda bu tür odaklar aktif nokta olarak kabul edilir ve örnek sayısı minimum düzeye indirilebilir (WHO 2008).



Resim 3, Figür 2. Aktif kontamine odakların belirlenmesi ve örnekleme stratejisi (Prof. Dr. Mitat Şahin'in arşivinden alınmıştır).

Bu çalışmada örnekleme 20-24 Ekim 2013 tarihleri arasında Kars İl ve ilçelerinde belirlenmiş 18 farklı odaktan yapıldı. Aktif nokta olarak belirlenmiş kontamine odaklara ait yaklaşık 4 m²'lik bir alanda merkez ve merkeze 1 metre uzaklıkta kuzey, güney, doğu ve batı yönlerinden 1'er adet örnek olmak üzere her bir odağı temsilen toplam 5 adet toprak örneği alındı (Resim 3, Figür 2). Böylece 18 farklı odaktan toplam 90 toprak örneği çalışmaya dâhil edilmiş oldu. Tümü yumuşak mera toprağı özelliğı taşıyan bu alanlardan yaklaşık 20 cm'lik derinlikten tek kullanımlık steril plastik kürekler aracılığı ile steril poşetlere 0,5-1 kg toprak alındı. Örnekler kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı ve 2-3 litre hacmindeki steril plastik kavanozlara aktarılarak etiketlendi ve analiz yapılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi (Resim 4). Örneklerin lokasyonuna ait veriler Tablo 2' de gösterilmiştir.



Resim 4. Kontamine alanların örnekleme ve örneklerin laboratuvar muhafazası (Prof. Dr. Mitat Şahin'in arşivinden alınmıştır).

Tablo 2: Kontamine odak ve toprak örneklerine ait bilgiler.

Odak no	Odak ismi	Kontaminasyon tarihi	Örnekleme tarihi	Örnek Sayısı	Örnek miktarı (gr)
1	Digor Dağpınar	Eylül, 2013	22.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
2	Digor Karakale	Eylül, 2013	22.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
3	Kars Merkez	Haziran, 2013	20.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
4	Kars Hacıveli 1	2013	24.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
5	Kars Hacıveli 2	2013	24.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
6	Digor Hanevler 1	Temmuz, 2009	22.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
7	Digor Hanevler 2	Temmuz, 2009	22.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
8	Digor Hanevler 3	Temmuz, 2009	22.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
9	Kars Külveren	2013	24.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
10	Selim Merkez 3	Haziran, 2006	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
11	Selim Merkez 4	Haziran, 2006	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
12	Selim Merkez 5	Haziran, 2006	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
13	Selim Merkez 6	Haziran, 2006	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
14	Selim Merkez 7	Haziran, 2006	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
15	Selim Merkez 8	Haziran, 2006	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
16	Kars Subatan	2012	24.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
17	Susuz İncesu 1	2013	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000
18	Susuz İncesu 2	2013	23.10.2013	5 (M, K, G, D, B)	500-1000

M: merkez, K: kuzey, G: güney, D: doğu, B: batı

2.1.4. İzolasyon, İdentifikasyon ve Moleküler Karakterizasyon İçin Gerekli Materyal

2.1.4.1. Araç ve Gereçler

- Lam ve lamel (Lamtek)
- Asetat kalem (Edding 140S)
- Lam taşıyıcı
- Piset (LP Italiana)
- Distile su
- İmmersiyon yağı (Merc İmmersiyon Yağı)
- Boyama sehpası
- Plastik Pasteur pipeti (Labor-Teknik)
- Kağıt havlu (Selpak)
- Pens (Semken)
- Otoklav poşeti (Hazardous Waste)
- Otomatik Pipet Seti (Gilson)
- Tek kullanımlık pipet uçları (mavi, sarı, beyaz) (Ependorf/Universal type)
- Tek kullanımlık drigalski (LP Italiana spa)
- Tek kullanımlık öze (Biosigma)
- Petri kutusu (LP Italiana spa)
- Tek kullanımlık plastik kürek (Tuna)
- Steril plastik kavanoz (2-3 L) (Nurpet)
- Steril poşet (Sigma)
- Dijital terazi (Sartorius)
- Otoklav (Nüve OT32)
- Su banyosu(Nüve)
- Penisilin G (10 U, Oxoid CT0043B)
- Beher (Prolab)
- Anaerobik jar (Aldrich)

ve inaktive edilmiş at serumundan (Sigma H0146) 7 ml eklenerek toplamda 100 ml hacminde besiyeri elde edildi. Petri kutularına dökülen bikarbonat besiyerleri kuruduktan sonra kullanılmak üzere +4 °C' saklandı. Besiyerleri, izolatların kapsül oluşturma yeteneğini test etmek amacıyla kullanıldı.

Yarı-katı besiyeri (Himedia 1191): 12 g yarı katı nutrient agardan 1000 ml distile suya katılarak sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra steril vida kapaklı tüplere 10'ar ml aktarıldı ve +4 °C'de buzdolabında saklandı. Besiyerleri, izolatların hareket etme yeteneklerini değerlendirmek amacıyla kullanıldı.

%20 Gliserin'li Brucella Broth: 2.8 g Brucella Broth Base (Sigma B3051) tartılıp 80 ml distile su ilave edilerek sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi. Üzerine 20 ml gliserin (Sigma G2289) ilave edildi ve +4 °C'de buzdolabında saklandı. Besiyeri, örneklerden izole edilen *B.anthraxis* suşlarının saklanması amacıyla kullanıldı.

2.1.4.4. Boya Solüsyonları

Gram boyama solüsyonu: İzolatların identifikasyonu amacıyla uygulanan Gram boyama metodunda ticari olarak temin edilen gram boyama seti kullanıldı (Merck M111885000).

MacFadyen boya solüsyonu: Kapsül varlığını göstermek amacıyla kullanılan ve polikrom metilen mavisi içerikli bu boya solüsyonu ticari olarak temin edildi (TCS Biosciences HS520).

2.1.4.5. Biyolojik Ürünler

Defibrine koyun kanı: Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

At serumu: Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

Gamma fajı: Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

Referans bakteri suşları: *B.anthraxis* Sterne, *E.coli* OP50 bakteri standart suşları, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

2.1.4.6. PZR Malzemeleri

- Otomatik Pipet Seti (Gilson)
- Tek kullanımlık pipet uçları (mavi, sarı, beyaz) (Ependorf/Universal type)
- Ependorf tüpü (0,2 ml, 1,5 ml) (Isolab)
- Mikrosantrifüj (pikofüj)
- Vortex (Biosan)
- Blok ısıtıcı (Heidolph)
- Gradient PZR cihazı (thermal cycler)
- Elektroforez ünitesi
- Laminar flow kabin
- Eppendorf santrifüj

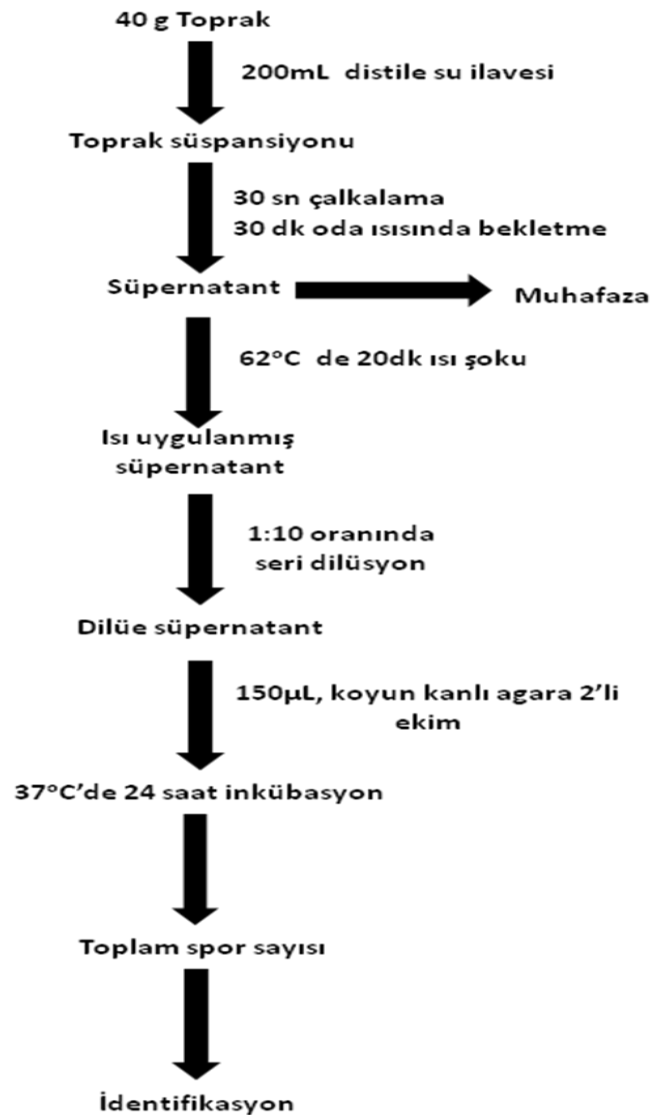
2.2. Metot

2.2.1. *B.anthraxis* Spor İzolasyonu

Toprak örneklerinden *B.anthraxis* spor izolasyonu ve etken identifikasyonu için Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 'Anthrax in Animal and Human' adlı referans kitabındaki yöntemler modifiye edilerek yapıldı (Figür 3) (50). Her bir örnek için izolasyon denemesi 2 kez yapıldı. Topraktan *B.anthraxis* sporlarının elde edilmiş yöntemi özetle şu şekildedir:

1. Hassas terazi ile toprak örneğinden 40 gram tartıldı ve 1 litrelik steril cam kavanozlara aktarıldı.
2. Kavanozdaki toprak üzerlerine 200'er ml steril edilmiş ılık distile su eklendi.
3. Cam kavanoz yaklaşık 30 sn süre hafifçe çalkalanarak homojen toprak solüsyonu elde edildi.
4. Toprak solüsyonu süpernatant ve tortu kısmının ayrılması için oda ısısında 30 dakika süreyle bekletildi.
5. Süre sonunda üstteki süpernatanttan 15 ml'lik steril Falkon tüplerine 10'ar ml alınarak stoklandı.
6. Spor izolasyonu için bu stoktan steril eppendorfa 1 ml alındı, kalan kısım test tekrarlarında kullanılmak üzere kısa süreli +4 °C' de saklandı.
7. Eppendorf tüpündeki süpernantant 62,5-63 °C' de 15-20 dakika süre ile su banyosunda ısıya tabi tutuldu.
8. Süre sonunda eppendorftaki süpernatantın 10 katlı alt dilüsyonları hazırlandı.
9. Farklı eppendorf tüplerine 900'er µl steril distile konuldu. İlk stok tüpten başlamak suretiyle 100'er µl alınıp diğer tüplere aktarılarak 10⁻⁴' e kadar alt dilüsyonlar hazırlanmış oldu.
10. Hazırlanan her bir dilüsyondan 150'er µl alınarak ve %7'lik kanlı agar 2'li olarak ekildi ve baget ile yayıldı.
11. Besiyerleri aerob ortamda, 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

12. Süre sonunda bakteri kolonileri değerlendirildi. Kanlı agarda hemolitik olmayan, 2-4 mm çapında beyaz veya grimsi beyaz, medusa başı görümlü Rough kolonilerin *B.anthraxis* kolonisi olarak değerlendirildi. Bu şekildeki üniform koloniler sayıldı ve spor sayısının hesaplanmasında kullanılmak amacıyla not edildi.
13. İdentifikasyonu amaçlı %7 koyun kanlı taze kanlı agara kolonilerin pasajları yapıldı ve elde edilen saf koloniler identifikasyon amaçlı kullanıldı.



Figür 3. Toprak örneklerinden *B.anthraxis* spor izolasyon yöntemi (WHO 2008).

2.2.1.1. *B.anthraxis* Spor Sayısının Hesaplanması

Toprak örneklerinden izole edilen *B.anthraxis*'in spor sayısını hesaplanması için aşağıdaki formüller (Formül 1, 2 ve 3) kullanıldı.

Formül 1: Distile suyun her bir mililitresindeki gram cinsinden toprak miktarı (g/ml).

$$c = a/b$$

a: toprak süspansiyonun hazırlanması için başlangıçta kullanılan distile su miktarı (ml).

b: toprak süspansiyonunun hazırlanması için başlangıçta kullanılan toprak miktarı (g).

c: mililitredeki toprak miktarı (g/ml).

Formül 2: Distile suyun her bir mililitresindeki *B.anthraxis* spor sayısı (spor/ml).

$$g = d/(exf)$$

d: identifikasyon testleri ile *B.anthraxis* olarak doğrulanmış toplam koloni sayısı.

e: koyun kanlı agara ekimi yapılan dilüsyon miktarı (150ul).

f: koyun kanlı agara ekilen örneğin dilüsyon oranı (10 ve alt katları).

g: mililitredeki *B.anthraxis* spor sayısı (spor/ml).

Formül 3: Toprağın her bir gramındaki *B.anthraxis* spor sayısı (spor/g).

$$h = \frac{d/(exf)}{a/b} = \frac{g}{c}$$

h: her 1 gram topraktaki *B.anthraxis* spor sayısı (spor/g).

2.2.2. İdentifikasyon

İnkübasyonu takiben kanlı agardaki hemolitik olmayan, 2-4 mm çapında beyaz veya grimsi beyaz, medusa başı görünümlü Rough koloniler olası *B.anthraxis* kolonisi olarak değerlendirildi ve identifikasyonu amaçlı aşağıdaki yöntemler uygulandı (OIE 2012).

2.2.2.1. Gama Fajı Duyarlılığı

Şüpheli koloniler %7 koyun kanı ilaveli taze agarlara pasajlandı ve üzerine 20 ul Gama fajı damlatılarak aerob ortamda, 37 °C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bakteri üremesinin olmadığı litik alan faj duyarlılığı olarak kabul edildi. Testler *B.anthraxis* Sterne kontrol suşu eşliğinde gerçekleştirildi (OIE 2012).

2.2.2.2. Penisilin Duyarlılığı

Şüpheli koloniler %7 koyun kanı ilaveli taze agarlara pasajlandı. Penisilin duyarlılığını belirlemek amacıyla antibiyotik diski (10 U, Oxoid CT0043B) bakteri ekilen agar üzerine yerleştirildi ve aerob ortamda, 37 °C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bakteri üremesinin gerçekleşmediği inhibisyon alanları penisilin duyarlılığı olarak kabul edildi. Testler *B.anthraxis* Sterne kontrol suşu eşliğinde gerçekleştirildi (OIE 2012).

2.2.2.3. Diğer Testler

Bu testler gama fajı ve penisilin duyarlılığında herhangi bir tereddüt yaşandığı identifikasyonu teyit amaçlı uygulanan testlerdir. Bu amaçla yapılan testler aşağıda sıralanmıştır.

2.2.2.3.1. Gram Boyama

Şüpheli kolonilerinden usulüne uygun preparat hazırlandı, kurutuldu ve tespit edildi. Kristal violet boyası ile preparat 2-3 dk boyandı. Kalan boya döküldü ve preparat üzerine lugol solüsyonu konarak 1-2 dakika beklendi. Kalan lugol solüsyonu döküldü ve preparat absolut alkolde dekolere edildi. Su ile yıkanan preparat safranin boyası ile 5-10 saniye boyandı ve su ile yıkanarak kalan boya giderildi. Kurutma kâğıdında kurutulan preparat üzerine sedir yağı konarak immersiyon objektifinde (100X) incelendi.

Mikroskop sahasında gram pozitif, 1-2x3-8 mikrometre boyutlarında, çomak şeklinde ve kısmen sporlu bakteriler *B.anthraxis* olarak kabul edildi (OIE 2012).

2.2.2.3.2. Hareket Muayenesi

Şüpheli bakteri kolonisinin BHI Broth'da taze saf sıvı kültürü hazırlandı. Steril iğne uçlu öze bu bakteri kültürüne daldırıldı ve daha sonra yarı katı besiyerine (%0,5 agarlı) tekbir hizada dikey daldırılıp ve çıkartılarak ekim yapıldı. Besi yeri 37 °C 'de 24 saat inkübasyondan sonra sonuçlar gözle değerlendirildi. Sadece ekim hattı boyunca üremelerin varlığında bakteri hareketsiz, sağa veya sola doğru bir dallanma ve yayılma tarzı üremelerin varlığında ise bakteri hareketli olarak değerlendirildi. Testler hareketli olan *E.coli* OP50 kontrol suşu eşliğinde gerçekleştirildi (OIE 2012).

2.2.2.3.3. Kapsül Üretimi ve MacFadyen Boyama

Kapsül üretimini test etmek amacıyla şüpheli kolonilerin BHI Broth'daki sıvı kültüründen bikarbonat besiyerine ekim yapıldı ve besiyerleri 37 °C'de ve %5-10 CO₂ içeren ortamda bir gece inkübasyona bırakıldı. Mukoid koloniye sahip bakteriler kapsüllü olarak değerlendirildi. Bu tür koloniler MacFadyen yöntemi ile boyanarak kapsül varlığı araştırıldı. Mavi-mor renkli basili çevreleyen pembe renkli katman bakterinin kapsül tabakası olarak değerlendirildi. Testler kapsül negatif *B.anthraxis* Sterne kontrol suşu eşliğinde gerçekleştirildi (OIE 2012).

2.2.3. PZR Yöntemi

Konvansiyonel identifikasyon metotları ile karşılaştırıldığında daha kısa sürede ve daha güvenilir sonuçlar veren PZR yöntemi izole edilen saf bakteri kültürleri üzerine denenebileceği gibi izolasyonun gerçekleştirilemediği örnekler üzerine direk uygulanarak da teşhis sağlar. *B.anthraxis* izolatlarının identifikasyonunda sadece kapsül varlığını göstermek için *capB* geninin analizi değil, aynı zamanda izole edilen tüm

B.anthraxis suşlarının virulent olup olmadıklarını araştırmak amacıyla letal ve ödem faktörünün prokürsörü olan koruyucu antijenin (PA) varlığı da test edildi. Her biri ayrı single-step PZR şeklinde gerçekleştirilen bu yöntem Beyler ve ark., (1995) metodu modifiye edilerek yapıldı. Her iki PZR yönteminde de PA geni ihtiva eden ve *capB* geni bulunmayan *B.anthraxis* Sterne suşu kontrol suş olarak kullanıldı.

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

1. Kanlı agarda taze kültürü yapılan bakterilere ait üniform kolonilerden 1-2 adet alınıp 100ul PZR buffer içerisine 0,5 ml'lik eppendorf tüplere konuldu.
2. Eppendorflar parafilm ile kapatılıp hafifçe vortekslendikten sonra blok ısıtıcıda 95 °C'nin üzerinde ısıda 10 dk tutuldu ve süre sonunda buz kalıpları üzerine kısa sürede sağıtıldı.
3. Eppendorf tüpleri 7500 devirde 10 dk santrifüj edildi.
4. 20 ul supernatant steril eppendorflara aktarılıp PZR reaksiyonunda template DNA olarak kullanıldı (Englen ve Kelley 2000).

2.2.3.2. Primer Seçimi

Topraktan izole edilen *B.anthraxis* şüpheli kolonilerin identifikasyonu amacıyla yapılan PZR'de koruyucu antijeni (PA) kodlayan *pag* geninin amplifikasyonunu hedef alan ve 596 bp boyutunda ürün oluşturan PA5/8 primer çifti ve kapsülü kodlayan genlerden biri olan *capB* geninin amplifikasyonunu hedef alan ve 1035 bp boyutunda ürün oluşturan CAP 6/103 primer çifti kullanılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. PZR’de kullanılan primerler ve nükleotid dizilimleri (Englen ve Kelley 2000).

Primer	Dizilim (5’-3’)	Hedef	Hedef plazmid	Ürün boyutu (bp)	Kaynak
CAP 6	TACTGACGAGGAGCAACCGA	506-525	pX02	1035	Beyer ve ark., (1995)
CAP 103	GGCTCAGTGTAACCTCCTAAT	1541-1522			
PA 8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	2452-2471	pX01	596	
PA 5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	3048-3029			

2.2.3.3. PZR Reaksiyonunun Hazırlanışı ve Amplifikasyon Şartları

Her bir örnek için 50ul’lik toplam hacimde hazırlanan PZR karışımı aşağıdaki konsantrasyonlarda bileşenleri içermektedir (Englen ve Kelley 2000).

<u>PZR bileşenleri</u>	<u>1X (50 ul)</u>
dNPTs (10mM)	1 ul
Buffer (10x)	5 ul
Primer karışımı (F ve R)	5 ul
Taq polimeraz	0,5 ul
Nükleaz içermeyen su	33,5 ul
DNA	5 ul

Gradient PZR cihazına (thermal cyler cihazın) yerleştirilen örneklerin PZR reaksiyon döngüsü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi (Englen ve Kelley 2000).

- 94 °C’de 3 dk
- 35 siklus aşağıdaki gibi gerçekleştirilir:

- 94 °C'de 1 dk
- 55 °C'de 1,5 dk
- 73 °C'de 1,5 dk
- 72 °C'de 9 dk
- 8 °C'de isteğe bağlı süre ayarlaması yapılabilir.

2.2.3.4. Elektroforez ve PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

1. Amplifiye PZR ürünlerinin elektroforezi için Tris-Borik asit-EDTA (TBE) buffer kullanılarak %1'lik agarose jel hazırlandı ve içerisine ultraviyole ışık altında flöresan renk veren SafeView DNA boyasından 0.02µL/mL konsantrasyonunda katılarak tank düzeneğine döküldü ve yaklaşık 30 dk jelin donması beklendi.
2. Aynı SafeView DNA boyası yaklaşık 400 ml TBE buffer içeren elektroforez tankına da 0.04µL/ml konsantrasyonunda ilave edildi.
3. Jeldeki kuyucuklara moleküler markırdan (HyperLadder, BIO-33053, Bioline) 6µL (5 ul markır ve 1ul yükleme boyası) ve PZR ürünlerinden 9ul (7,5 ul PZR ürünü ve 1,5ul yükleme boyası) yüklendi.
4. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra jel 55 volt ve 30 miliamper ilk 10 dk yürütüldükten sonra, 80 volt ve 30 miliamperde yaklaşık 40dk daha yürütülerek elektroforez işlemi tamamlandı.
5. Jeldeki PZR ürünleri UV-transillüminatör cihazında değerlendirildi ve görüntüler fotoğraflandı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

Çalışmada, Kars İli sınırları içerisinde şarbon şüphesiyle ölmüş hayvanların (sığır ve koyun) gömüldüğü, kan ve benzeri vücut sıvılarının bulaştığı toprak zeminli alanlar ve karkaslarının bırakıldığı sınırlı açık mera alanları olmak üzere 18 farklı odaktan toplam 90 toprak örneği alındı ve *B.anthraxis* spor varlığı yönünden incelendi. Farklı mikroorganizmalara ait koloni formasyonlarının var olduğu kanlı agarda hemolitik olmayan, 2-4 mm çapında beyaz veya grimsi beyaz, medusa başı görümlü Rough koloniler *B.anthraxis* kolonisi olarak değerlendirildi (Resim 5). Hem spor sayısının hesaplanmasında hemde identifikasyon testlerinde bu tipik görümlü üniform koloniler değerlendirildi. Örneklenen bu 18 farklı odağın 7 (%38,88)'si *B.anthraxis* spor varlığı yönünden pozitif saptandı. Örnek bazında düşünüldüğünde incelenen 90 toprak örneğinin 11 (%12,22)'i pozitif saptanmış oldu (Tablo 4).



Resim 5. Yoğun kontamine toprak örneğine ait pozitif kültür sonucu; mavi oklar *B.anthraxis*'in %7 koyun kanlı agarda hemolitik olmayan tipik kuyruklu R koloni yapısını göstermektedir.

Bacillus anthracis spor varlığı yönünden pozitif saptanan odaklara bakıldığında Kars Külveren adlı odak tüm örnekleriyle (5 örnek) pozitiflik vererek dikkat çekerken, diğer pozitif 6 odağın ise birer örneği pozitif olarak saptandı. Çalışmaya dahil edilen 11 (%61,12) odağa ait toprak örnekleri *B.anthraxis* sporları yönünden negatif saptandı (Tablo 4).

Tablo 4. Toprak örneklerine ait kültür sonuçları ve *B.anthraxis* spor sayısı.

Odak No	Odak İsmi	Örnek Kodları	Kültür Sonucu	Spor Miktarı (spor/g)
1	Digor Dağpınar	M, K, G, D, B	Negatif	-
2	Digor Karakale	M, K, G, D, B	Negatif	-
3	Kars Merkez	M, K, G, D, B	Negatif	-
4	Kars Hacıveli 1	M, K, G, D, B	Negatif	-
5	Kars Hacıveli 2	K, G, D, B	Negatif	-
		M	Pozitif	1,32x10²
6	Digor Hanevler 1	M, K, G, D, B	Negatif	-
7	Digor Hanevler 2	M, K, G, D, B	Negatif	-
8	Digor Hanevler 3	M, K, G, D, B	Negatif	-
9	Kars Külveren	M	Pozitif	3,46x10⁴
		K	Pozitif	6,64x10²
		G	Pozitif	5,3x10¹
		D	Pozitif	1,32x10²
		B	Pozitif	2,64x10³
10	Selim Merkez 3	K, G, D, B	Negatif	-
		M	Pozitif	1,32x10²
11	Selim Merkez 4	K, G, D, B	Negatif	-
		M	Pozitif	1,32x10³
12	Selim Merkez 5	K, G, D, B	Negatif	-
		M	Pozitif	1,32x10³
13	Selim Merkez 6	K, G, D, B	Negatif	-
		M	Pozitif	1,32x10³
14	Selim Merkez 7	M, K, G,D, B	Negatif	-
15	Selim Merkez 8	M, K, G,D, B	Negatif	-
16	Kars Subatan	K, G, D, B	Negatif	-
		M	Pozitif	1,32x10³
17	Susuz İncesu 1	M, K, G,D, B	Negatif	-
18	Susuz İncesu 2	M, K, G,D, B	Negatif	-

Topraktaki spor kontaminasyonunun boyutuna bakıldığında toprağın her gramındaki minimum spor miktarı 53 (Kars Külveren güney örneği) ve maksimum spor miktarı 34600 (Kars Külveren merkez örneği) olarak saptandı. Birden fazla örneği pozitif olan odaklarda örnekler arası spor miktarları farklılıklar gösterdi. Özellikle Kars Külveren'e ait odağın örnekleri arasındaki fark oldukça belirgindi.

Çalışmada örnek odaklarının olası *B.anthraxis* sporları ile kontaminasyon tarihleri 2006 ile 2013 yılları arasında değişmekteydi. Spor varlığı ile bu kontaminasyon tarihleri kıyaslandığında 2006 yılına ait 6 odaktan 4 (%66,66)'ü, 2012 yılına ait 1 (%100) odak ve 2013 yılına ait 8 odaktan 2 (%25)'si pozitif saptandı. Pozitif alanların yıllara göre dağılımı örnek bazında düşünüldüğünde 2006 yılına ait 30 örnekten 4 (%13,13)'ü, 2012 yılına ait 5 örnekten 1 (%20)'i ve 2013 yılına ait 40 örnekten 6 (%15,55)'sında spor kontaminasyonu saptandı.

3.2. İdentifikasyon Bulguları

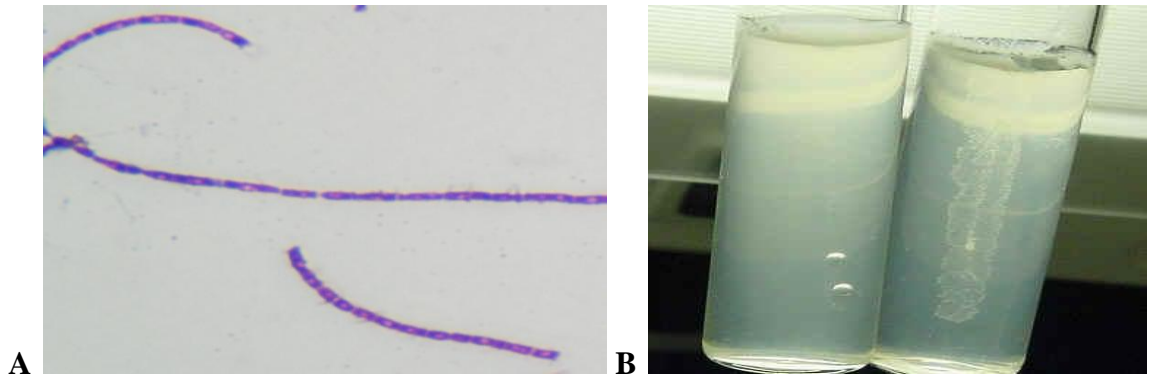
Çalışmada 18 farklı odaktan 7 (%38.88)'si pozitif saptanmış ve alınan toplam 90 örnekten 11 (%12.22)'inde *B.anthraxis* benzeri koloniler elde edilmiştir. Bu koloniler %7 koyun kanlı agarda seri pasajları sonucu saflaştırılmış ve gama fajı ve penisilin duyarlılık testlerine tabi tutulmuştur. Bu 11 izolata ait tüm identifikasyon bulguları Tablo 5'de sunulmuştur.

Gama fajının damlatıldığı alanda tam lizis varlığı ve penisilin duyarlılık testindeki geniş inhibisyon alanlarının varlığının saptanması sonucu bu 11 izolatin tümünün gama fajı ve penisiline duyarlı oldukları saptandı (Resim 6).

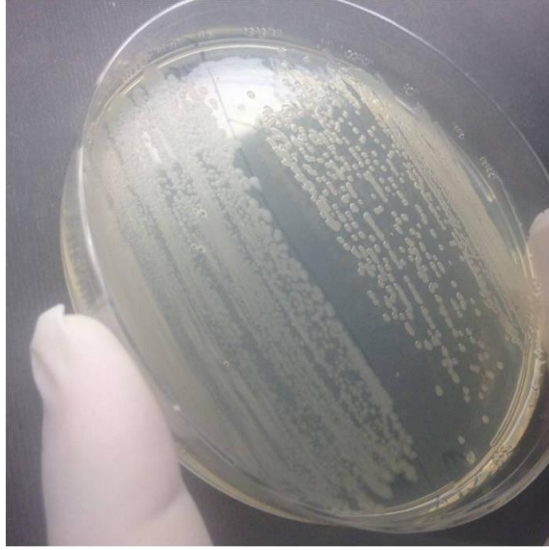


Resim 6. Kanlı agarda gama fajı ve penisilin duyarlılığı kanıtlanan bir *B.anthraxis* kolonisi.

Topraktan elde edilen 11 *B.anthraxis* izolatının yapılan Gram boyama yöntemi ile mikroskopik morfolojisi ve yarı katı besiyerine inokülasyonu ile hareket muayenesi gerçekleştirilmiştir. Bu kolonilerden hazırlanan tüm preparatlarda mikroskop sahasında Gram pozitif, 1-2x3-8µm boyutlarında, çomak şeklinde ve kısmen sentral ve subterminal sporlu bakterilere rastlanırken, yarıkatı besiyerinde sadece ekim hattı boyunca üremenin varlığı ile bu 11 izolatın tümünün hareketsiz olduğu belirlendi (Resim 7).

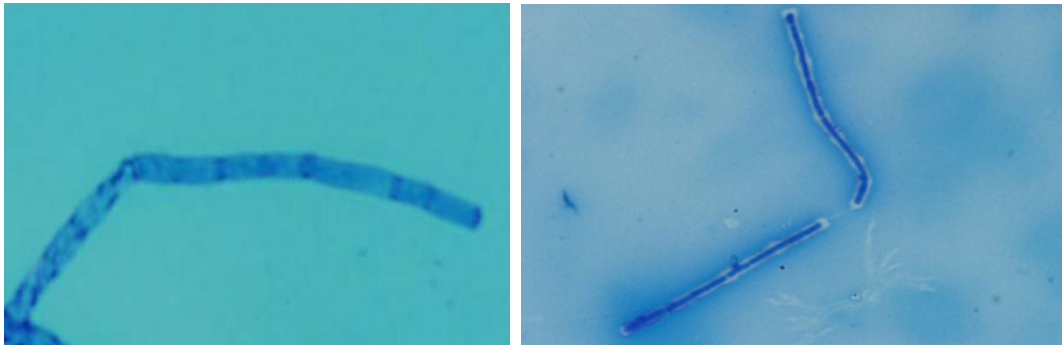


Resim 7. Gram boyama (A) ve yarı katı besiyerinde hareket muayenesi (B) görüntüleri. Yarı katı besiyerinde hareketli *E.coli* OP50 (sol)'ye ait geniş üreme alanı ve hareketsiz *B.anthraxis* toprak izolatına ait sadece ekim hattındaki üreme alanı (sağ).



Resim 8. Sodyum bikarbonat besiyerinde kapsül üretim sonuçları. *B.anthraxis* Sterne suşuna ait mukoid olmayan koloni (sol), *B.anthraxis* saha suşlarına ait mukoid koloni (sağ).

Topraktan elde edilen 11 *B.anthraxis* izolatının kapsül üretebilme yeteneği bu izolatlara ait saf kolonilerin BHI Broth'daki sıvı kültüründen sonra sodyum bikarbonat besiyerine ekimi ve besiyerlerinin 37 °C'de ve %5-10 CO₂ içeren ortamda bir gece inkübasyonunu takiben kolonilerin incelenmesi ve bu mukoid kolonilerin MacFadyen yöntemi ile boyanarak mikroskop sahasında incelenmesi ile konulmuştur.



Resim 9. MacFadyen yöntemi ile gerçekleştirilen kapsül boyama. *B.anthraxis* Sterne suşuna ait kapsülsüz basil (sol), *B.anthraxis* saha suşlarına ait kapsüllü basil (sağ).

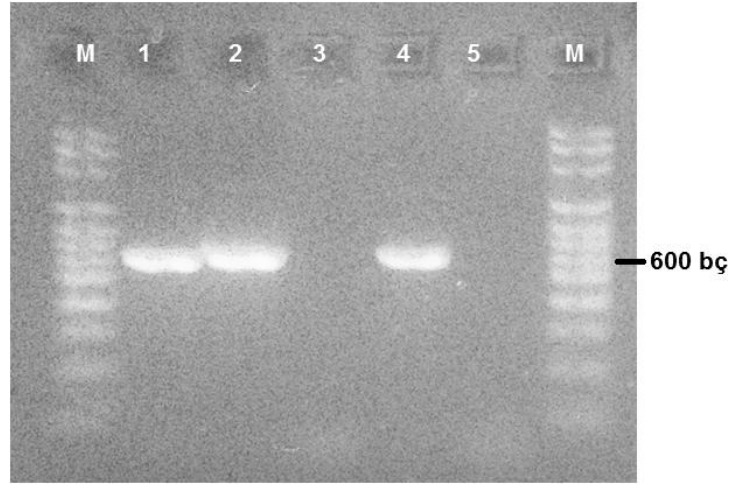
Sodyum bikarbonat besiyerinde 37 °C’de ve %5-10 CO₂ içeren ortamda bir gece inkübasyonunu takiben 11 izolatın tümü kapsül üretebilme yeteneğini simgeleyen mukoid koloni oluşturdu (Resim 8). MacFadyen yöntemi ile boyanarak mikroskop sahasında incelenmesi sonucu mukoid kolonilere sahip izolatların tümü mavi-mor renkli basili çevreleyen pembe renkli kapsül tabakasına sahip oldukları belirlendi. Mukoid olmayan Sterne suşu ise yalnızca mavi-mor renkli kapsülsüz basil olarak gözlendi (Resim 9).

Tablo 5. *B.anthraxis* izolatlarına ait identifikasyon bulguları.

Örnek kodu	Gama fajı	Penisilin	Gram boyama	Hareket	Kapsül oluşturma	PZR	
						PA	CAP
5M	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
9M	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
9K	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
9G	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
9D	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
9B	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
10M	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
11M	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
12M	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
13M	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+
16M	Duyarlı	Duyarlı	Gr (+) basil	-	+	+	+

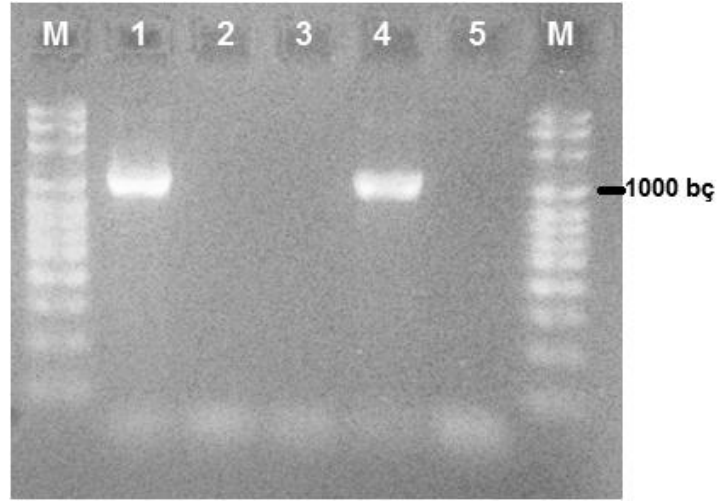
3.3. PZR Bulguları

Topraktan izole edilen 11 *B.anthraxis* izolatının identifikasyonu ve bu izolatların virulent olup olmadıklarını anlamak amacıyla yürütülen PZR yönteminde *B.anthraxis*'in koruyucu antijenini (PA) kodlayan *pag* geni için primer çifti PA5/8 ve kapsülü kodlayan *capB* geni için primer çifti CAP 6/103 kullanılmıştır.



Resim 10. *B.anthraxis* izolatlarına ait PA-PZR bulguları. M: moleküler markır (HyperLadder, 1kb), 1: mukoid saha suşu, 2: Sterne suşu, 3: negatif kontrol (*E.coli* OP50), 4: pozitif kontrol (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu-RSHM), 5: negatif kontrol (DNase ari su).

PZR analizi gerçekleştirilen 11 *B.anthraxis* izolatının tümü PA5/8 primer çiftinin kullanıldığı PA-PZR ile 596 bp boyutunda amplifiye ürün (Resim 10), CAP 6/103 primer çiftinin kullanıldığı CAP-PZR ile 11 izolatın tümünün 1035 bp boyutunda amplifiye ürün verdiği saptandı.



Resim 11. *B.anthraxis* izolatlarına ait CAP-PZR bulguları. M: moleküler markır (HyperLadder, 1kb), 1: mukoid saha suşu, 2: Sterne suşu, 3: negatif kontrol (*E.coli* OP50), 4: pozitif kontrol (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu-RSHM), 5: negatif kontrol (DNase ari su).

Özetle; PA-PZR bulguları ile 11 örneğin tümünün *B.anthraxis* toksinlerinin prokürsörü olan koruyucu antijen (PA) genine sahip olduğu belirlenmiş oldu. CAP-PZR ile elde edilen sonuçlarla 11 *B.anthraxis* izolatının tümünün kapsül genine yani kapsül üretme yeteneğine sahip olduğu görüldü. İzole edilen bu 11 *B.anthraxis* suşunun tamamı (%100)'ü tam virulent *B.anthraxis* olarak saptandı.

4. TARTIŞMA

Antraks, *B.anthraxis* tarafından oluşturulan otçul hayvanlarda, bazı kanatlı türlerinde ve yabani hayvanlarda görülen bir hastalıktır. Gram-pozitif, hareketsiz ve çubuk şekilli olan antraks etkeni konak vücudunu terkettikten sonra hava ile teması sonucu spor formuna geçmektedir. Olumsuz çevre şartlarında uzun yıllar canlı ve infekte kalabilen sporlar geniş mera kontaminasyonlarına yol açmaktadır (Purchell ve ark. 2007). Duyarlı hayvanların bu tür kontamine alanlarda nasıl infekte olduklarına yönelik bilgi çok azdır. Ama bulaşık otlar veya ot kökleri ile sporların vücuda girdiği ve özellikle bu tür otların dikensi veya sert kısımlarının ağızdan başlamak üzere mideye kadar sindirim sistemi yolunun çeşitli yerlerinde etkenin alınması için giriş kapıları şeklinde küçük lezyonlar oluşturduğu ve etkenin buralardan sindirim sistemine geçtiği düşünülmektedir (Watson ve Keir 1994). Solunum ile bulaşma hayvanlar arasında nadirdir. Özellikle kurak alanlarda antraks sporları ile kontamine alanlara yakın yerlerde otlayan hayvanlarda veya kum banyosu yapan fillerde şarbon sporlarıyla yüklü toz partiküllerinin solunumuyla alınması sonucu bir tür bulaşma gerçekleşebilmektedir. Hayvandan hayvana bulaşma oldukça nadirdir fakat bu tür vakalarda sokucu ve kan emici sineklerin rol aldığı düşünülmektedir (Jula ve ark. 2004).

İnsanlarda antraks; infekte hayvanlarla veya kontamine hayvansal ürünlerle direk veya indirek temas sonrası bulaşır. Etkenin giriş yoluna göre deri, sindirim ve solunum antraksı ve bunlara ait klinik belirtiler ortaya çıkar. En yaygın form vücuttaki herhangi bir lezyondan etkenin alınması sonucu şekillenen deri şarbonudur. Diğer iki form ise nadir şekillenir ve insanların hayatını tehdit edecek boyutlara varan komplikasyonlara neden olabilir (Dixon ve ark. 1999). Gastrointestinal antraks infekte etlerin tüketilmesi sonucu oluşur ve ciddi hastalık tablolarına yol açar (Heyworth ve ark. 1975). İnfekte hayvanlara ait et ve benzeri ürünlerle temas sonrası şekillenen enfeksiyona yönelik birçok araştırma mevcuttur (Harrison ve ark. 1989, Ozkurt ve ark. 2005, Baykam ve ark. 2009). İnhalasyon antraksı ise nadirdir ve genellikle sporların solunum yoluyla alınması sonucu meydana gelir (Plotkin ve ark. 1960). Antraks sporları ile kontamine yün işleyen

imalathanelerde; klinik belirtiler görülmesede aerosol yolla infeksiyonun bulaştığı bilinmektedir (Norman ve ark. 1960, Wattiau ve ark. 2009).

Çevresel spor kontaminasyonunun insan sağlığı için oluşturduğu tehdidi önceden tahmin etmek oldukça zordur. İnfeksiyon dozu etkilenen türe ve etkenin giriş yoluna bağlıdır. İnsanlarında dahil olduğu primatlarda inhalasyon antraksında LD50'nin 2500 ile 55000 spor arasında olduğu tahmin edilmektedir (Inglesby ve ark. 2002). Gastrointestinal antraksta bu sayı tam olarak bilinmemesine rağmen inhalasyon antraks dozundan daha düşük olduğu tahmin edilmektedir. Kutanöz antraksta ise yaklaşık 10 sporun yeterli olduğu bilinmektedir (Watson ve Keir, 1994). Cohen ve Whalen tarafından yayınlanan bir başka çalışmaya göre insanlarda inhalasyon antraksı için en az 600 adet sporun alınması ve bu spor boyutlarının 5 mikrondan küçük olması gerektiği vurgulanmıştır (Cohen ve Whalen 2007). Layshock ve ark., antraks sporlarının araç trafiği, yaya trafiği ve mekanik koşullar altında rüzgarla birlikte aeroselleştirilebilir olduğunu belirtmişlerdir (Layshock ve ark. 2012). 2001 yılında ABD'deki posta servisiyle düzenlenen aerosol şarbon salgını esas alınarak (10000 insanın maruz kaldığı düşünülürse) yapılan matematiksel modellemede maruziyet oranı 18 ile 863 spor olarak belirlenmiş hatta bu sayının 2 ile 9 spora düşebileceği bildirilmiştir (Fennelly ve ark. 2004). Bu çalışmada pozitif saptanan 11 odadaki spor dağılımı 53 (Kars Külveren G) ile 34600 (Kars Külveren M) spor/g arasında değişmektedir. Bu oranlar yukarıda farklı araştırmacılar tarafından bildirilen infektif ve letal dozların çoğundan daha fazladır ve örneklemin yapıldığı bu 7 pozitif odak olası bir anthraks salgını aktif infeksiyona yol açacak yeterli sayıda spor barındırdıkları için potansiyel infeksiyon kaynakları olarak düşünülebilir.

Antraks, Gürcistan, Ermenistan, Azerbaycan ve Türkiye gibi Kafkas Bölgesi ülkelerinde hem insanlarda hemde hayvanlarda görülmekte ve halk sağlığı açısından büyük tehlike arz etmektedir. Türkiye'nin kuzeydoğusunda yer alan Kars İli'nde her yıl çok sayıda insan ve hayvan şarbon vakası bildirilmektedir (Doganay ve Metan 2009). 1992 ile 2004 yılları arasında Türkiye'nin doğusundaki hayvan ve insan vakaları

incelendiğinde antraksın büyük bir çoğunlukla Erzurum ve Kars illeri çevresinde görüldüğü saptanmıştır. Bu iki şehir hayvancılığın merkezi konumunda olup ülkenin diğer bölgeleriyle bağlantı kurabilen, hastalığın yayılması için ortak bir yol rotasına da sahiptir. Bu verilere bakıldığında Kars yöresinde 103 insan ve 94 hayvan olgusu bildirilmiştir. Gelişmiş bilgilendirme sisteminin eksikliği nedeniyle birçok vakanında bildirilmediği düşünülmektedir (Özkurt ve ark. 2005).

Antraks sporları; toprakta uzun süre kalabilmeleri ve duyarlı hayvanları infekte edebilmeleri, organik materyallerin varlığı, kalsiyum iyonlarının yoğunluğu, pH değişiklikleri ($pH > 6.0$), ortamın sıcaklığı (> 15.5 C), sporları yüzeye taşıyan lokal su akıntıları gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir (Dragon ve Renie 1995, Smith ve ark. 1999, Himsworth 2008, Hugh-Jones ve Blackburn 2009). Lokal su hareketliliği, dipteki suyun yeryüzüne çıkmasına ve derinlerde yer alan antraks sporlarını da beraberinde toprak yüzeyine çıkarmasına ve yüzeydeki bitkilerin sporlarla kontamine olmasına yol açmaktadır (Hugh-Jones ve Blackburn 2009). Bu durum özellikle bahar aylarında, sulak çayır alanlarında otlayan hayvanlarda neden antraks vakalarının daha fazla görüldüğünü açıkça göstermektedir (Turner ve ark. 1999). Toprağın gübrenmesi de spor miktarını artırabilmekte ve bazen aktif kontamine alanların oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Hugh-Jones ve Blackburn 2009). Kuzey Devon'daki bir çalışmada 58 yıl önce ölmüş bir boğanın gömüldüğü alandan antraks sporları başarıyla izole edilmiştir (Kaynak 1). Bir başka çalışmada, Namibia'daki Etosha oyun parkında hayvan gömülü alanlardaki sporların canlılığını kısa sürede kaybettiği ve bunun nedeninin sporların kontamine toprağın doğal yapısından etkilenmiş olabileceği şeklinde açıklanmıştır (Lindeque ve Turnbull 1994). Manchee ve ark.'na göre (1981) İkinci Dünya Savaşı sırasında kasıtlı olarak kontamine edilen Gruinard Adasında 40 yıl boyunca düzenli örnekleme yapıldığını ve toprak yüzeyinin 6 cm lik bölümünde şarbon sporlarının izole edildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada pozitif 7 odağın; 4'ü 2006 yılına, 1'i 2012 yılına ve 2'si 2013 yılına ait taze odaklardan oluşmaktaydı. Çalışılan bu 7 odaktan antraks sporları başarıyla izole edilmiştir. Diğer araştırmacıların bildirdiklerine (Manchee ve ark. 1981, Lindeque

ve Turnbull 1994) paralel olarak bu çalışmada da yaklaşık 8 yıl önce konağı terk etmiş ve sporlanarak günümüze kadar canlı ve tam virüent kalmayı başarmış antraks etkeni saptanmış olup daha ne kadar süre bu şekilde canlılığını devam ettireceği merak konusudur. Ayrıca hastalık için aktif alanlar oluşturan bu tür odakların uzun yıllar takip edilmesine ihtiyaç vardır.

Heterojen olmayan spor dağılımı nedeniyle şüpheli kontamine alanlardan birden fazla numune toplanması *B.anthraxis* sporları ile kontamine pozitif odakların saptanma olasılığını arttığı bildirilmiştir. Dikkate alınması gereken bir başka husus ise numunelerin toplandığı zaman aralığıdır. Lindeque ve Turnbull (1994) Namibia Etosha oyun parkı içinde şarbon sporlarını soğuk ve kuru sezon olan Ocak-Nisan aylarında alınan örneklerden %1.4, sıcak ve nemli sezon olan Mayıs ve Ağustos aylarında ise %5.7 olarak belirlemişlerdir (Dragon ve ark. 2005, Lindeque ve Turnbull 1994). İzolasyon metotlarına bakıldığında *B.anthraxis*'in en düşük saptanabilir limitinin 20 spor/g olduğu kabul edilmektedir. Ancak Dragon ve ark.' na (2005) göre, 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada alt limitin 10 spor/g olduğunu bildirmişlerdir. Hassasiyet düzeyinin belirlenmesi tüm sporların kültür üzerinde yeniden %100 üremesi varsayımına dayanmaktadır. Buna göre bir alan üzerinde tek bir toprak örneği değil birden fazla toprak numunesi alınarak şarbon sporlarının izolasyonu yapılmalıdır. Bu çalışmada, çalışma alanı olarak belirlenen 18 odağın her birinden 5 örnek alınmış olup toplamda incelenen 90 örneğin 11'i pozitif saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen pozitiflik oranı odak bazında %38.88, örnek bazında ise %12.22 olarak belirlenmiştir. Toplamda 7 pozitif odağın 6'sının sadece bir örneği pozitif saptanırken, Kars Külveren'e ait 5 örneğin tümünde *B.anthraxis* sporları saptanmıştır. Böylece spor dağılımı homojen olmayan her odaktan sadece bir örnek almak yerine 5'er örnek alınarak pozitiflik oranı artırılmış oldu.

Dragon ve ark.' ları (2001) Kuzey Kanada'daki çalışmalarında 588 toprak örneği toplamışlardır. Toplanan toprak numunelerini yüzdürme metodu ile işlemiş ve elde edilen süpernatant kısmı seçici besiyeri olan PLET agara ekmişlerdir. Değerlendirmeler

sonucunda 11 örneğin (%1,9) pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Ramachandran ve ark.' ları (1988) Güney Sudan'da yapmış oldukları çalışmalarında yeterli azot ve organik madde içeren alkali topraklarda değişken hava koşullarında (kuru hava, bol yağış) *B.anthraxis* için önemli birer etken olduklarını belirtmişlerdir. Bu ve bunun gibi koşulların oluşması ile bakterinin vejetatif formdan spor forma geçtiğini belirtmişlerdir. Spor yoğunluğunun yüksek konsantrasyonlarda olduğu topraklarda otlatmaya bağlı olarak hastalığın zaman zaman salgınlar halinde yeniden görüldüğü, Güney Avrupa, Asya, Afrika, Orta Doğu gibi bölgedeki ülkelerde halen insanlarda görülmekte olduğu rapor edilmiştir. Tamamen eradike edilemesede gelişmiş ülkelerde insan ve hayvanlar için üretilmiş etkili aşuların geliştirilmesi ile önemini yitirmektedir. Ancak İran gibi ülkelerde halen insanlar ve hayvanlar için en riskli hastalıklar grubunda yer aldığını ortaya koymuşlardır. Hastalığı önleme ve kontrol programlarının planlanabilmesi için hastalığın epidemiyolojisinin bilinmesi ve ülkenin farklı bölgelerinde şarbon odaklarının tespit edilmesi gerektiği hususları üzerinde durmuşlardır. Bu konu ile paralel olarak Güney Sudanda yaptıkları bir araştırmada da 5 toprak örneğinin 2 (%40)'sinde şarbon sporlarını izole etmişlerdir. Jula ve ark.' ları (2007) 2003-2004 yıllarında İran'ın farklı bölgelerinde şarbon sporlarının izolasyonu ve şarbon odaklarını bulmak maksadıyla 668 çevresel örnek toplamışlardır. Bakteri sporlarını toprak örneklerinden; toprak numunelerinin distile su içerisinde çözdürülmesi ve flotasyonu, oda ısısında inkübasyonu, süzülmesi, ısı şoku uygulaması ve seçici besiyeri olan PLET agara ekilmesi sonucunda izole etmişlerdir. Tespit ettikleri etkeni konvansiyonel bakteriyolojik testler, biyokimyasal ve biyolojik testlerle tanımlamışlardır. Toplam 668 çevresel örnekten 61 (%9,13) örnekte aktif şarbon sporlarını izole etmiş ve tanımlamışlardır. Bunların 21 (%34,42) tanesinin çok yüksek ve düşük virulent etkiye sahip olan kapsüllü formları ve diğer 40 tanesinin de kapsülsüz formları olduğunu ifade etmişlerdir. İzole edilen bakterilerin patojenitesini deneme hayvanlarına inokulasyon ve PZR ile PA ve Cap spesifik primerleri kullanarak teyit etmişlerdir. Vahedi ve ark.' ları (2009) İran İslam Cumhuriyeti'ne bağlı İsfahan'da şarbonun endemik olduğu bölgelerden rastgele 60 çevresel örnek toplamışlardır. Toplam 60 numunedan 25 (%41.66)'inde *B.anthraxis*'i izole etmişlerdir. Dragon ve ark.' ları (2005) 2001 yazında

aktif şarbon salgınının görüldüğü Wood Buffalo Ulusal Parkından taze ve eski bizon leşlerinin bulunduğu bölgeden 250 toprak örneği toplamışlardır. Toplam 250 örneğin 71 (%28,4) adedinin *B.anthraxis* yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Jula ve ark.' ları (2004) 2003 yılında İsfahan ve İranın farklı bölgelerinden şarbon sporlarını tespit etmek için 60 toprak örneği toplamışlardır. Uygun yöntemlerle işlenen 60 numuneden 9 (%15) numunede *B.anthraxis*'i tespit etmişler ve bunlardan 6 tanesinin kapsüllü olduğunu rapor etmişlerdir. Mohamed ve ark.' ları (2007) Mısır'ın kuzeybatısında yeralan El-Omayed bölgesinden 5 doğal rezervuardan 2-5 cm derinlikten 40 toprak örneği toplamışlardır. PZR ile yapılan çalışmalar sonunda 18 (%45) toprak örneğini antraks sporları yönünden pozitif bulmuşlardır. Chikerema ve ark.' ları (2012) yaptıkları çalışmalarında Zimbabwe' de yüksek riskli bölgelerde bulunan hayvan mezarlarından *B.anthraxis*' i izole etmek amacıyla aldıkları 81 toprak örneğinin 9 (%11.11)'unu pozitif saptamışlardır. Ahsan ve ark.' ları (2013) Ocak-Kasım 2012 döneminde Sirajganj'da yaptıkları çalışmada şüpheli karkasların gömüldüğü hayvan mezarları ve hayvan otlaklarından yaklaşık 400'er gr olmak üzere toplam 48 toprak örneği toplamışlardır. İncelenen 48 toprak örneğinin 14 (%29.16)' ü *B.anthraxis* yönünden pozitif bulunmuştur. Gerçekleştirilen bu çalışmada, Kars İli sınırları içerisinde şarbon şüphesiyle ölmüş hayvanların (sığır ve koyun) gömüldüğü, kan ve benzeri vücut sıvılarının bulaştığı toprak zeminli alanlar ve karkaslarının bırakıldığı sınırlı açık mera alanları olmak üzere 18 farklı odaktan toplam 90 toprak örneği alındı ve *B.anthraxis* spor varlığı yönünden incelendi. Metot bölümünde açıklanan yöntemlerle izolasyonu gerçekleştirilen *B.anthraxis* şüpheli kolonilere konvansiyonel identifikasyon metodları uygulandı. Hem spor sayısının hesaplanmasında hemde identifikasyon testlerinde bu tipik görünümlü üniform koloniler değerlendirildi. Örneklenen bu 18 farklı odağın 7 (%38,88)'si *B.anthraxis* spor varlığı yönünden pozitif saptandı. Örnek bazında düşünüldüğünde incelenen 90 toprak örneğinin 11 (%12,22)'i pozitif saptanmış oldu. Topraktan izole edilen 11 *B.anthraxis* izolatının identifikasyonu ve bu izolatların virulent olup olmadıklarını anlamak amacıyla PZR yönteminde *B.anthraxis*'in koruyucu antijenini (PA) kodlayan *pag* geni primer çifti PA5/8 ve kapsülü kodlayan *capB* geni primer çifti CAP 6/103 kullanıldı. PA-PZR bulguları ile 11 örneğin tümünün *B.anthraxis*

toksinlerinin prokürsörü olan koruyucu antijen (PA) genine sahip olduğu belirlenmiş oldu. CAP-PZR ile elde edilen sonuçlarla da 11 *B.anthraxis* izolatının tamamının kapsül genine yani kapsül üretme yeteneğine sahip olduğu konvansiyonel identifikasyon metodlarından (sodyum bikarbonat besiyerinde üretme ve kapsül boyama) sonra bir kez daha teyit edilmiş oldu. İzole edilen bu 11 *B.anthraxis* suşunun tamamı tam virulent *B.anthraxis* olarak saptandı. Topraktaki spor kontaminasyonunun boyutuna bakıldığında toprağın her gramındaki minimum spor miktarı 53 (Kars Külveren güney örneği) ve maksimum spor miktarı 34600 (Kars Külveren merkez örneği) olarak saptandı. Çalışmaya dahil edilen diğer 11 (%61,11) odak *B.anthraxis* sporları yönünden negatif bulundu. Yukarıdaki çalışmalar ile kıyaslandığında bu izolasyon oranları ve spor miktarları birçoğu (Jula ve ark. 2004, Jula ve ark. 2007, , Chikerema ve ark. 2012) ile paralellik gösterirken diğerleri (Dragon ve ark. 2005, Mohamed ve ark. 2007, Vahedi ve ark. 2009, Ahsan ve ark. 2013) ile büyük farklılıklar da arz etmektedir. Bu farklılıkların, incelenen toprağın yapısı, kontaminasyonun tarihi, boyutu ve uygulanan tekniklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Başka bir nokta sporların canlılığı ve virulensi arasındaki bağlantıdır. *B.anthraxis* gibi bakteriler dirençli sporlar oluşturarak ortamda canlı kalabilmektedirler ve uzun süre sonra tekrar enfeksiyon oluşturabilmektedirler. Turnbull ve ark.'ları (1992), 1992 yılında uzun yıllar önce şarbondan ölmüş hayvan mezarlarının bulunduğu meralarda aşırı otlatma sonucu hayvanların tekrar şarbon hastalığına yakalanabileceğini belirtmişlerdir. Buna bağlı olarak bir toprak örneğinde yüksek sayıda etken bulunabilir. Ancak çevresel koşullara maruz kalmaları sonucu hepsinin patojen olduğu kabul edilemez. Zamanla patojenik bakterilerin azalması söz konusu olabilir. Jula ve ark.'ları (2007) 2003-2004 yıllarında İran'ın farklı bölgelerinde şarbon sporlarının izolasyonu ve şarbon odaklarını bulmak amacıyla 668 çevresel örnek toplamışlardır. Tespit ettikleri etkeni konvansiyonel bakteriyolojik testler, biyokimyasal ve biyolojik testlerle tanımlamışlardır. Toplam 668 çevresel örnekte 61 (%9,1) örnekte aktif şarbon sporlarını izole etmiş ve tanımlamışlardır. Bunların 21 (%34,4) tanesinin çok yüksek virulent etkiye sahip olan kapsüllü formları ve diğer 40 tanesinin de düşük virulent etkiye sahip

kapsülsüz formları olduğunu ifade etmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışma ile karşılaştırılırsa 11 *B.anthraxis* izolatının tamamının kapsül genine yani kapsül üretme yeteneğine sahip olduğu; izole edilen bu 11 *B.anthraxis* suşunun tamamının tam virulent *B.anthraxis* olarak saptanırken Jula ve ark.' larının (2007) belirlediği sonuçlarla örtüşmektedir. Bununla birlikte Selim'deki bir odakta bulunan *B.anthraxis*'in altı yıldır canlı kaldığı ve virulensini koruduğu önemli bir bilgidir.

Kars İli'nin gerek coğrafi konumu ve gerekse mevsim şartlarından dolayı çok yağış alması Hugh-Jones'un çalışmasında belirttiği lokal su hareketliliğinin, dipteki suyun yeryüzüne çıkmasına ve derinlerde yer alan antraks sporlarını da beraberinde toprak yüzeyine çıkarmasına ve yüzeydeki bitkilerin sporlarla kontamine olmasına yol açtığı saptamaları ile özellikle bahar aylarında sulak çayır alanlarında otlayan hayvanlarda neden antraks vakalarının daha fazla görüldüğünü açıkça göstermektedir. Kars ve çevresinin çok geniş meralara sahip olması ve genelde hayvancılığın ekstansif bir şekilde yapıldığı düşünülürse Turnbull ve arkadaşlarının 1992 yılında uzun yıllar önce şarbondan ölmüş hayvan mezarlarının bulunduğu meralarda aşırı otlatma sonucu hayvanların tekrar şarbon hastalığına yakalanabileceği görüşü ile paralellik göstermektedir. Tarımın geçim kaynağı olduğu yörede, insanlar hayvanlarını aşılayacak veya herhangi bir hastalıktan ölmüş hayvanları uygun bir şekilde itlaf edecek ne bilgiye nede yeterli finansmana sahipler. Hayvanların itlafına yönelik yörede uygulanan en pratik yöntemler antrakstan ölen hayvanları yerleşim yerlerine çok uzak olmayan atıl alanlara, dere kenarlarına hatta meranın ortasına basitçe gömmek veya bazen bu tür yerlere gömmeden hayvan leşlerini açık alanlara bırakmak, çok nadir olarak da ölen hayvanları yakmak şeklindedir. Yani bilinçsiz ve yetersiz yapılan itlaf işlemleri ile gelecek nesillere sporla kontamine potansiyel infeksiyon odakları hazırlanıyor demektir. Topraktaki çeşitli kurtçuklar veya lokal su hareketliliği sonucu antraks sporlarının toprak yüzeyine çıkabildiği, yüzeydeki florayı kontamine ettiği ve uzun süre canlılığını koruyarak duyarlı konakları tekrar infekte edebileceği gerçeği düşünüldüğünde bu tür aktif alanların duyarlı sağlıklı hayvanlar için infeksiyon kaynağı oluşturmada ne denli önemli olduğu ve bu tür alanların belirlenerek yakın temastan uzak durulması gerektiği bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Bu çalışma bu yönüyle büyük önem arz etmektedir.

5. SONUÇ

Gerçekleştirilen bu çalışmada, Kars İli sınırları içerisinde şarbon şüphesiyle ölmüş hayvanların (sığır ve koyun) gömüldüğü, kan ve benzeri vücut sıvılarının bulaştığı toprak zeminli alanlar ve karkaslarının bırakıldığı sınırlı açık mera alanları olmak üzere 18 farklı odaktan toplam 90 toprak örneği alındı ve *B.anthraxis* spor varlığı yönünden incelendi. Metot bölümünde açıklanan yöntemlerle izolasyonu gerçekleştirilen *B.anthraxis* şüpheli kolonilere konvansiyonel identifikasyon metodları uygulandı. Hem spor sayısının hesaplanmasında hem de identifikasyon testlerinde bu tipik görünümlü uniform koloniler değerlendirildi. Örneklenen bu 18 farklı odağın 7 (%38,88)'si *B.anthraxis* spor varlığı yönünden pozitif saptandı. Örnek bazında düşünüldüğünde incelenen 90 toprak örneğinin 11 (%12,22)'i pozitif saptanmış oldu.

Topraktan izole edilen 11 *B.anthraxis* izolatının identifikasyonu ve bu izolatların virulent olup olmadıklarını anlamak amacıyla PZR yönteminde *B.anthraxis*'in koruyucu antijenini (PA) kodlayan *pag* geni primer çifti PA5/8 ve kapsülü kodlayan *capB* geni primer çifti CAP 6/103 kullanıldı. PA-PZR bulguları ile 11 örneğin tümünün *B.anthraxis* toksinlerinin prokürsörü olan koruyucu antijen (PA) genine sahip olduğu belirlenmiş oldu. CAP-PZR ile elde edilen sonuçlarla ise 11 *B.anthraxis* izolatının tamamının (%100) kapsül genine yani kapsül üretme yeteneğine sahip olduğu konvansiyonel identifikasyon metodlarından (sodyum bikarbonat besiyerinde üretme ve kapsül boyama) sonra bir kez daha teyit edilmiş oldu. İzole edilen bu 11 *B.anthraxis* suşunun tamamı (%100) tam virulent *B.anthraxis* olarak saptandı.

Hastalığın bulaşması etkenin vücuda giriş yerine göre sindirim, solunum ve deri yoluyla olabilmektedir. Hastalık etkeninin yayılışı ölen hayvanlardan sızan sıvı ve kan ya da hastaların dışkıları ile kirlenen otlaklarda otlayan hayvanlarda sporların sindirim yoluyla alınması, sel sularının sporları uzak bölgelere taşınması, meralarda ölen hayvanlarının yabani hayvanlar tarafından parçalanıp uzaklara götürülmesi, enfekte yemlerin yedirilmesi, sokucu sineklerin infeksiyonu hayvandan hayvana ya da

hayvandan insana taşınması (Afrika’da *Tabanus* ya da *Stomoxys* türleri Amerika’da ısırıcı olmayan *Chrysoma* türleri sorumlu tutulmaktadır) gibi şekillerde oluşmaktadır. Hastalığın insandan insana bulaşması çok sık gözlenmemekle beraber hastalık enfekte olmuş hayvan ürünleri (yün, kıl, kemik, kemik ürünü, et, boynuz ve postlar), kontamine olmuş hayvan ürünlerinin inhalasyonu ya da iyi pişmemiş kontamine etlerin yenmesi ile daha çok hayvanlarla uğraşanlarda, kasaplarda, çoban yada veteriner hekimler gibi risk guruplarında görülür. Diğer bir yandan şarbon etkeni olan *B.anthraxis*’in fazla teknik koşul gerektirmeden kolay kültürünün yapılabilmesi, sporlarının çevre koşullarına dayanıklı olması, kolayca stoklanabilmesi, taşınabilmesi, spor çaplarının inhalasyon için uygun olması, kolaylıkla küçük partiküllere bağlanabilmesi nedeniyle biyolojik silah etkeni olarak da dikkatleri çekmektedir (Beyer ve Turnbull 2009).

Bacillus anthracis’in çevresel koşullara dayanıklılığının çok fazla olması nedeniyle en etkin korunma tarım alanlarında, şarbonun endemik bulunduğu bölgelerde hayvanların ve risk altında olan insanların aşılmasıdır. Aşı hayvanlara 2-6 aylık dönemlerde uygulanmakta ve yaklaşık 6-12 ay bağışıklık sağlayabilmektedir. Ayrıca hastalıktan ölen hayvanların eti yenmemeli, doğal delikleri tendürdiyotlu pamuk yada bezlerle tıkanmalı çevreyi yeniden enfekte etmemesi için 2 metrelik çukurlara gömülmeli ve üzerine kireç atarak kapatılmalıdır. Ahırlar ve kullanılan malzemeler %0,1 süblime, %5 asit fenik,% 5 kresol gibi dezenfektanlarla muamele edilmelidir (Aydın ve ark. 2006).

Sonuç olarak şarbon ülkemizde endemik bir hastalıktır. Görülme sıklığı gittikçe azalmaktadır. Hastalığın tamamen eradike edilmesi veya en az seviyeye indirilmesi için mücadele planları ve aşılama programları yapılmalıdır. Üreticiden tüketiciye ve arada kalan her seviyede hayvan ve hayvansal ürünlerle uğraşan risk altındaki kişiler de periyodik eğitimlerle hastalık ve bulaş yolları hakkında bilgilendirilmelidir. Bunun yanısıra antraks sporları ile kontamine alanların belirlenmesi ve tekrar kullanılabilirliği açısından dekontaminasyonu ve iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın bu yönü ile antrakstan korunma ve kontrolünde katkı sağlayacağı umulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Ahsan M, Khan MFR, 1Md. Rahman B, Hassan J, Chowdhury ZH, Parvej S, Jahan M, Nazmul Hussain Nazir KHM: Investigation Into Bacillus Anthracis Spore In Soil and Analysis of Environmental Parameters Related to Repeated Anthrax Outbreak in Sirajganj, Bangladesh. Thai J Vet Med., 43(3): 449-454, 2013.
2. Anonim: Kars İklimi ve Bitki Örtüsü. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kars>. Erişim tarihi: 19.03.2013.
3. Anonim: Kars İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü. <http://www.karstarim.gov.tr>, Erişim tarihi: 19.03.2013.
4. Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara. 2006.
5. Bacon DR: Biological Warfare: An Historical Perspective. Preoperative Medicine and Pain, 22: 224-9, 2003.
6. Baykam N, Ergönül Ö, Ulu A, Eren Ş, Çelikbaş A, Eroğlu M, Dokuzoğuz B: Characteristich of Cutaneous Anthrax in Turkey. J Infect Dev. Citries, 3(8): 599-603, 2009.
7. Berkeley RCW, Logan N: Bacillus, Alicyclobacillus and Paenibacillus. In: Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie SH(eds). Principles and practice of Clinical Bacteriology. Chichester: Wiley, p. 185, 1997.
8. Beyer W: Polymerase chain reaction-ELISA to detect Bacillus anthracis from soil samples- limitations of present published primers. Journal of Applied Microbiology, 87: 229- 236, 1999.
9. Beyer W, Turnbull PCB: Anthrax In Animals. Molecular Aspects of Medicine, 30 (6): 481-489, 2009.
10. Carter T: The dissemination of anthrax from imported wool. Kidderminster 1900–14. Occup Environ Med, 61: 103–107, 2004.

11. Chikerema SM, Pfukenyi DM, Hang'ombe BM, L'Abee-Lund TM, Matope G: Isolation of *Bacillus Anthracis* From Soil In Selected High-risk Areas of Zimbabwe. *J Appl Microbiol.*, 113(6): 1389-95, 2012.
12. Cohen ML, Whalen T: Implications of Low Level Human Exposure to Respirable. *B. anthracis*. *Applied Biosafety*, 12(2): 109–115, 2007.
13. Demetrius JP: Biological and Chemical Bioterrorism Agents. *Journal of the Association of Nurses in AIDS Care*. 13(5): 57–64, 2002.
14. Dirckx JH: Virgil on Anthrax. *Am J Dermatopathol*. 3: 191–195, 1981.
15. Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC: Anthrax. *N Engl J Med*, 341(11): 815-26,1999.
16. Doğanay M: Biyoterör ve Şarbon. *Ankem Dergisi*, 16: 254-258, 2002.Kılıç S: Biyolojik Silahlar ve Biyoterörizm. *Türk Hij.Den.Biyol.Derg*, 63(1-2-3): 1-20, 2006.
17. Doğanay M, Metan G: Human anthrax in Turkey from 1990 to 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9(2):131-40, 2009.
18. Dragon DC, Rennie RP: The Ecology of Anthrax Spores: Tough But Not Invincible. *Can Vet J*, 36: 295–301, 1995.
19. Dragon DC, Bader DE, Mitchell J, Woollen N: Natural Dissemination of *Bacillus Anthracis* Spores In Northern Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1610–1615, 2005.
20. Ellerbrok H: Rapid and sensitive identification of pathogen and apathogen *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 214:51-59, 2002.
21. Englen M, Kelley LC: A Rapid DNA Isolation Procedure For The Identification of *Campylobacter Jejuni* By The Polymerase Chain Reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 31: 421-426, 2000.
22. Fennelly KP, Davidow AL, Miller SL, Connell N, Ellner JJ: Airborne Infection with *Bacillus Anthracis*-from Mills to Mail. *EID Journal*, 10:6, 2004.

23. Franz DR, Jahrling PB, McClain DJ: Clinical recognition and management of patients exposed to biological Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *Clin Lab Med*, 21: 435–473, 2001.
24. Harrison LH, Ezzell JW, Abshire TG, Kidd S, Kaufmann AF: Evaluation of serologic tests for Diagnosis of anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay. *J Infect Dis*, 160:706–710, 1989.
25. Heyworth B, Ropp ME, Voos UG, Meinel HI, Darlow HM: Anthrax in the Gambia: An Epidemiological Study. *Br. Med. J*, 4(5988): 79-82, 1975.
26. Himsworth CG: The Danger of Lime Use In Agricultural Anthrax Disinfection Procedures: The Potential Role of Calcium In The Preservation of Anthrax Spores. *Can Vet J*, 49(12): 1208–1210, 2008.
27. Hugh-Jones ME, Vos V: Anthrax and wildlife. *Rev Sci Tech*, 21: 359–383, 2002.
28. Hugh-Jones M, Blackburn J: The Ecology of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 356–367, 2009.
29. Inglesby TV, O’Toole T, Henderson DA: Anthrax As a Biological Weapon. *JAMA*, 287: 2236–52, 2002.
30. Karayılıanoğlu T, Kenar L, Ortatlı M, Öztuna A: Şarbon Şüpheli Pakete NBC Laboratuvarının Yaklaşımı. *Türk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 63 (1-2-3): 165 – 169, 2006.
31. Kibaroğlu M: Kitle İmha Silahlarının Gelişim Süreci, Yayılmasının Önlenmesine İlişkin Yapılan Çalışmalar ve Geleceğin Güvenlik Tehditleri. *2023 Dergisi*, Kasım 2002: 1-24, 2002.
32. LaForce FM: Woolsorters’ Disease in England. *Bull NY Acad Med*, 54: 956–963, 1978.
33. Layshock JA, Pearson B, Crockett K, Brown MJ, Cuyk SV, Daniel WB, and Omberg KM: Reaerosolization of *Bacillus* spp. in Outdoor Environments: A Review of the Experimental Literature. *Biosecur Bioterror*, 10(3): 299–303, 2012.

34. Lindeque PM, Turnbull PC: Ecology and Epidemiology of Anthrax In The Etosha National Park, Namibia. *Onderstepoort J.Vet.Res.*, 61: 71-83, 1994.
35. Logan NA, Turnbull PCB: Bacillus and Recently Derived Genera. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH(eds). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington. p. 357, 1999.
36. Manchee R, Broster M, Melling J, Henstridge R, Stagg A: Bacillus Anthracis on Gruinard Island. *Nature*, 294: 254-255, 1981.
37. M'Fadyean J: A further note with regard to the staining reaction of anthrax blood with methylene blue. *J. Comp. Pathol.* 16: 360–361, 1903.
38. Moazeni Jula G, Jabbari AR, Malek B: Isolation of Anthrax Spores from Soil in Endemic Regions of Isfahan, Iran. *Arch. Razi Ins*, 58: 29-38, 2004.
39. Moazeni Jula G, Jabbari AR, Vahedi Darmian F: Determination of Anthrax Foci Through Isolation of *Bacillus anthracis* Form Soil Samples of Different Regions of Iran. *Archives of Razi Institute*. *Archives of Razi Institute*, 62 (1): 23-30, 2007.
40. Mohamed EAH, Mikiko A, Khaled MG, Yasser RAF, Yasuyoshi N, Ehab REH: Diversity of Bacillus Genotypes In Soil Samples From El-Omayed Biosphere Reserve In Egypt. *Journal Of Culture Collections*, 5: 78-84, 2006-2007.
41. Norman PS, Ray JG, Brachman PS, Plotkin SA, Pagano JS: Serologic Testing for Anthrax Antibodies in Workers in a Goat Hair Processing Mill. *American Journal of Hygiene*, 72: 32–37, 1960.
42. Ögütlü A: Şarbon. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29: 155-162, 2012.
43. Özkurt Z, Parlak M, Taştan R, Dinler U, Sağlam YS, Özyürek SF: Anthrax in Eastern Turkey, 1992-2004. *EID J*, 11: 12, 2005.
44. Özüçelik DN, Karcıoğlu Ö, Topaçoğlu H, Kunt M, Koyuncu N: Biyolojik Savaş Ajanları. *Akademik Acil Tıp Dergisi*, 3(2) : 35-39, 2004.

45. Pasteur L, Chamberland R, Roux E: *Compte Rendu Sommaire Des Expériences Faites à Pouilly-le-Fort, Près Melun, Sur la Vaccination Charbonneuse. Comptes Rendus des séances De L'Académie des Sciences*, 92: 1378–1383, 1881.
46. Pinar A: *Biyolojik Silah Olarak Mikroorganizmalar. Hacettepe Tıp Dergisi*, 41: 97-104, 2010. Purcell BK, Worsham PL, Friedlander AM: *Anthrax. Medical Aspects of Biological Warfare. Office of The Surgeon General at TMM Publications, USA. p. 69-90, 2007.*
47. Plotkin SA, Brachman PS, Utel M, Burnford BH, Atchison MM: *An Epidemic of Inhalation Anthrax, The First in The Twentieth Century. American Journal of Medicine*, 29: 992–1001, 1960.
48. Ramachandran S, El-jack MA, Williams T, Azril R: *Anthrax In Taing (Damalisus Lunatus Heuglin, (1963) and Transhumant Cattle In South Sudan. Indian Veterinary Journal*, 65: 1074-1079, 1988.
49. Ramiisse V, Patra G, Vaissaire J, Mock M: *the Ba813 chromosomal dna sequence effectively traces the whole Bacillus anthracis community. Journal of Applied Microbiology*. 87: 224–228, 1999.
50. Serinken M, Kutlu SS: *Biyoterörizm ve Şarbon. Türkiye Acil Tıp Dergisi*, 9(4): 185-190, 2009.
51. Smith TC, Bush RA, Gee DE: *Active Surveillance of Birth Defects Among U.S. Department of Defense Beneficiaries. Report of a Feasibility Study , Naval Health Research Center, San Diego, Calif., 1999.*
52. Spencer RC: *Bacillus anthracis. J Clin Pathol*, 56: 182–187, 2003.
53. Sternbach George: *The History Of Anthrax. The Journal of Emergency Medicine*, 4: 463-467, 2003.
54. Sterne M: *Anthrax. in: Stableforth AW, Galloway IA. Infectious diseases of animals. Vol. 1. diseases due to bacteria. London, Butterworths, 16–52, 1959.*
55. Turnbull PCB, Doganay M, Lindeque PM, Aygen B, McLaughlin J: *Serology and Anthrax In Humans, Livestock and Etosha National Park Wildlife. Epidemiology and Infection*, 108: 299–313, 1992.

56. Turner AJ, Galvin JW, Rubira RJ, Miller GT: Anthrax Explodes In an Australian Summer. *J Appl Microbiol.*, 87(2):196-9, 1999.
57. Wattiau P, Govaerts M, Frangoulidis D , Fretin D, Kissling E, Hessche MV, China B, Poncin M, Pirenne Y, Hanquet G: Immunologic Response of Unvaccinated Workers Exposed to Anthrax, Belgium. *Emerg Infect Dis*, 15(10): 1637–1640, 2009.
58. Watson A, Keir D: Information on Which To Base Assessments of Risk From Environments Contaminated With Anthrax Spores. *Epidemiology and Infection*, 113: 479–490, 1994.
59. Whitney E, Jamie MD: Anthrax: Diagnosis, Treatment, Prevention. Elsevier, 9(4): 117-121, 2002.
60. World Organisation for Animal Health (OIE): Anthrax. OIE Terrestrial Manual, 2012.
61. Vahedi F, Moazeni Jula Gh, Kianizadeh M, Mahmoudi M: Characterization of Bacillus Anthracis Spores Isolates From Soil by Biochemical and Multiplex PCR Analysis. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 15: 1, 2009.
62. Vos V: Anthrax. *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to South Africa (JAW Coetzer, GR Thomson and RC Tustin, eds)*, 2:1262–1289, 1994.
63. Yenen OŞ, Doğanay M: Biyoterörizm. *Ankem*, 22(2) : 95-116, 2008. World Health Organization (WHO): Anthrax in human and animals, 4 th edition, WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2008.

7. ÖZGEÇMİŞ

01. 04.1981 yılında Karaman’ da doğdum. İlköğretim ve lise öğrenimimi Karaman’da tamamladım. 2001 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım. Beş yıllık eğitimi müteakip 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinden “Veteriner Hekim” olarak mezun oldum. Okul bitiminde hemen askerlik görevimi ifa etmek için TSK’ ya başvurduğum. Akabinde 2008 yılında TSK’ nin açmış olduğu sınavı kazanarak Vet.Tğm. rütbesi ile Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığında göreve başladım. 2009 yılında Gaziantep’e atandım. Görev sürem dolması nedeniyle 2011 yılı atamalarında Sarıkamış B Tipi Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı’na atandım. 2011 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladım. Halen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrencisi olarak öğrenim hayatıma devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.