

**KARS BÖLGESİNDE KOYUNLARDA TULAREMİ İNFEKSİYONUNUN İNSİDENSİ
ÜZERİNDE SEROLOJİK VE KÜLTÜREL ÇALIŞMALAR: İlk Rapor*****Turgay ŞEYDA******The serological and cultural studies on the incidence of Tularemia in founded in Kars
Area : Preliminary Report****SUMMARY**

In this study the aim has been to determine the incidence of tularemia infection in sheep by means of serological and cultural methods.

As for cultural methods; insulation of effect has been performed by inoculation to Glycose-cystine (or cysteine) blood agar (GCBA) sheep-fold of samples taken from those mice who died after injecting the suspensions which had been obtained from Dermacentor spp.-type ticks to white mice by intra-peritoneal way, and by means of cultural and biochemical tests it has been revealed that the effect was *F. tularensis*.

As for serological method; benefited from Tube agglutination test (TAT), Microagglutination test (MAT) and ELISA tests and upon conducting results of these tests comparison advantages and disadvantages and degrees of sensitivity of these tests to one another have been found.

In the ELISA test, sonication antigen prepared from *F. tularensis*, alkaline phosphatase enzyme and labelled anti-sheep IgG conjugate and p-nitrophenil-phosphate substrat have been used. Negative threshold was 405 nm, optical density (OD) 3.0.

1412 out of 1600 ea. sheep blood sera taken from different residential areas have been evaluated with TAT, MAT and ELISA tests; respectively 28 (1.98%), 50 (3.54%), 110 (7.80%) positive sera have been found. Accordingly in positive determination the order was follows; ELISA>MAT>TAT.

When difficulty of cultural studies has been considered in diagnosis of tularemia, it has been concluded that serological methods in diagnosis would be much more benefitable, and that utilization of accurate test such as ELISA along with TAT and MAT tests operating with various antibody group (IgG, IgM) would be much more benefitable in determination of infection, in their clinical examinations would be rather advantageous from the point breeders.

However, serological studies on the incidence rate of Tularemia sheep founded in Kars area 0.14%

Key Words : *F. tularensis*, tularemia, tularemia in sheep.

ÖZET

Bu çalışmada, koyunlarda Tularemi infeksiyonunun serolojik ve kültürel metodlarla insidensinin saptanması amaçlanmıştır.

Araştırma serolojik yoklamalar için Kars Merkez, İlçe ve köylerinden toplam 37 yerleşim biriminden alınan 1600 adet koyun kan serumu, Kültürel yoklamalar için kene enfestasyonu olan koyunlardan 279 adet Dermacentor spp. cinsi kene ve ayrıca lenfadenopati gösteren şüpheli koyunlardan lenf yumrusu içeriği alınarak kullanılmıştır.

Kültürel olarak; Dermacentor spp. cinsi kenelerden elde edilen süspansiyonların beyaz farelere intraperitoneal yolla injeksiyonundan sonra ölen farelerden alınan örnekler Glikozlu, sistinli (veya sisteinli) kanlı (GCBA) besiyerine inokule edilmiş ve etkenin izolasyonu yapılmış kültürel ve biyokimyasal testlerle de etkenin *F. tularensis* olduğu ortaya konulmuştur.

Serolojik olarak; Tüp aglütinasyon (TAT), Mikroaglütinasyon (MAT) ve ELISA testlerinden yararlanılmış ve bunların birbirlerine karşı avantaj, dezavantaj ve duyarlılık derecesi belirlenmiştir.

ELISA'da *F. tularensis*'ten hazırlanan sonikasyon antijeni, tavşandan elde edilen ve alkaline fosfataz enzimi ile işaretli antikoyun-IgG konjugatı ve p-nitrofenil-fosfat substratı kullanılmış, negatiflik eşiği 405 nm'de optik dansite (OD), 3.0 bulunmuştur. Çalışmada kullanılan 1600 adet serumun 28 (% 1.98)'i TAT; 50 (%3.54)'si MAT ve 110 (%7.80)'da ELISA ile pozitif olduğu belirlenmiş ve araştırmada ELISA testi sırasıyla MAT ve TAT'den daha duyarlı bulunmuştur. Tanıda kültürel çalışmaların zorluğu göz önüne alınırsa, serolojik yöntemlerden, değişik antikor grupları ile çalışan (IgG, IgM), TAT ve MAT'nin yanısıra ELISA gibi duyarlı bir testin kullanılmasının daha yararlı olacağı; kültürel ve serolojik yöntemlerle yöremizde infeksiyonun varlığı saptandığından, veteriner hekimlerinde klinik muayenelerinde bu infeksiyonu gözardı etmemeleri sonucuna varıldı. Ayrıca yapılan serolojik çalışmalar sonucunda Kars bölgesindeki koyunlarda Tularemi infeksiyonunun insidensi (%0.14) olarak belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler : *F. tularensis*, tularemi, koyunlarda tularemi.

* Aynı başlıklı Doktora tezinden özetlenmiş olan bu çalışma KAÜ. Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir. (95/2-1 nolu proje)

** Dr. , KAÜ. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı KARS

GİRİŞ

Tularemi, bakteri geçişi keneler tarafından oluşturulan lenf yumrularında büyüme, kaslarda sertlik, ateşle belirgin; koyunların özellikle kuzuların akut, septisemik seyirli zoonotik, morbidite ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Hastalık ilk defa Kaliforniya'nın Tulare kentinde sincaplardan izole edildiğinden bu adı almıştır. Amerika'da uzun süreden beri endemik durumdadır. McCoy (1910)'un veba üzerinde çalışırken dikkatini çekmiş ve buna "kemircilerin vebaya benzer hastalığı-New plague like disease-" adını vermiştir. McCoy ve Chapin (1911) Tulare bölgesinde avlanan kemircilerden bakteriyi izole etmişler ve "Bacterium tularense" adını vermişlerdir (1,12,30,32,35,47,50).

Francis (1919), deneysel infeksiyonlar yaparak hastalığın geyik sineği ile bulaşabileceğini göstermiş ve "Geyik yangısı" adını vermiştir (8,12,29,33,44). Parker ve Dade (1929) koyunlarda da infeksiyona rastladıklarını bildirmişlerdir (2). Francis ve ark. yapmış oldukları geniş çalışmalar sonucunda infeksiyonun klinik tanımını, zoonotik karakterde olduğunu, infeksiyonun naklinde bir çok vektörün yer aldığını ve mikroorganizmanın özelliklerini ortaya koymuşlardır. Daha sonraları kenelerin hem rezervuar hem de vektör olarak önemli rol oynadıkları bulunmuştur (29,41,45,46,59).

Türkiye'de ilk salgın Plevnelioğlu ve Titiz ve ark. tarafından 1936 yılında yayımlanmıştır (44,45). Yurdumuzda henüz gereği gibi önem verilmeyen bu zoonozun yurt ölçüsünde ne kadar yaygın olduğunu dair yayınlar yoktur. Yöremizde bu hususta henüz sözkonusu bir çalışma olmadığından veteriner hekime başvuran hayvan sahiplerinin de bu yönden ne derecede düşünülmesi gerektiğini açığa kavuşturmak gerekmektedir. Bu nedenle yöremizde koyunlarda Tularemi insidensinin saptanması amacıyla bu araştırma yapılmıştır.

Türkiye'de Tularemi infeksiyonları ile ilgili çalışmalar: Götslich Berkin (1938), Dirik (1940), Golem (1944), Utku (1944-1954), Gedikoğlu ve ark. (1989), Kılıçturgay ve ark. (1989) tarafından yapılmış ancak hayvanlarla ilgili geniş kapsamlı bir çalışmaya rastlanılmamıştır (20,22,23,24,25,31,45,57).

EPİZOOTİYOLOJİ

Doğada, *F. tularensis* öncelikle tavşanlar

(Lagomorpha), rodentler ve bazen rakun, kedi ve oposumlarda infeksiyona sebep olurlar. Bununla birlikte 100'ün üzerinde hayvan türünün infekte olduğu rapor edilmiştir (15,21,29,38,43,47,54).

Etçiller genellikle tularemiye dirençli hayvanlar olarak bilinmektedir. Ancak bu hayvanların avlarıyla yakın temasta bulunmalarından dolayı serolojik muayenelerde bu hayvanlarda infeksiyon saptanmıştır (3,48,53). Evcil kedilerin (*Felis catus*) doğada infekte olduğu (3,21), deneysel infeksiyonlar sonucu öldüğü ve infeksiyonu ısırık yolu ile başkalarına geçirdiği bildirilmektedir (53).

Koyunun dışındaki diğer ruminantlarda serolojik yöntemlerle infeksiyonun varlığı bildirilmişse de ölüm az görülmektedir. Taylar (*Equus sp.*), şiddetli kene enfestasyonundan dolayı ölmektedir. Sığır (*Bos sp.*) ve geyikler (*Odocoileus sp.*) doğada infekte olarak bulunmuşlardır (53).

Dişi koyunlarda (*Ovis sp.*) kuruya ayırma ve kırılma zamanlarında kene enfestasyonu sonucu duyarlılık arttığından yüksek oranda mortalite görüldüğü kaydedilmektedir (6,26,29,32,46). Koyunlarda geçiş başlıca kene ısırıklarıyla olmaktadır. Bu kenelerden *D. andersonii* ve *H. otophilia*'dan mikroorganizma izole edilmiştir. Kenelerle istila; meralarda, alçak çalı ve otlar üzerinde bulunan keneler tarafından olmaktadır. Kenelere; kulağın etrafında, arka butlarda, meme bölgelerinde, göğüste, kuyruk ve kuyruk altı bölgelerde çok sayıda rastlanılmaktadır. Bu durum koyunlarda nisbeten tularemiye karşı bir direnç sağlarsa da klinik olarak infeksiyon yavaş ve sürekli seyretmektedir (2,6,26,28,29,32,46,53).

Hastalık etkeni vücuda girdikten sonra girdiği noktadan derin ve yüzlek lenf yumrularına yerleşerek üremektedir. Etkenin yerleştiği lenf yumrusu şişmekte ve ağrılı bir durum almaktadır. lenf yumruları daha sonra açılarak içinde mikroorganizma buluna irin dışarı akmaktadır. Eğer etken girdiği yerde kan damarına ulaşacak olursa, içorganlara metastaz yapabilmektedir (29,53).

Yabani tavşanlar (*Lagomorpha*) tulareminin rezervuarı ve insan için infeksiyon kaynağını oluştururlar. Farklı sınıf ve cinslerdeki duyarlılık ile ilgili bir genelleme yapılmamıştır fakat en yaygın infekte olan cinsler bilinmektedir. *Lepus brachyurus* cinsi tavşanlardaki infeksiyon en çok Japonya'da

görülmüştür. Avrupa'da ise kar tavşanı (*L. capensis tolai* ve *L. europaeus*) infeksiyonun geçişinde vektör görevi gördükleri kaydedilmiştir (8,10,26,36,37,42,43,54).

Hamsterler (*Cricetidae*) ailesindeki çeşitli cins kemiricilerin doğada yaygın olarak infekte bulunduğu ve bu nedenle Avrasya'daki insan infeksiyonlarının sorumlusu olduğu ileri sürülmektedir. Su faresi (*A. terretris*), tüyü için tuzakla yakalanan en yaygın türdür ve infeksiyonun böylece direkt olarak insana geçtiği sanılmaktadır. Bu durum Misk fareleri (*Onodatra zibethica*) içinde söz konusu olduğu belirtilmiştir (29,38,41,51).

Tarla farelerinin (*Microtus*) farkı cinslerinde sık ve yaygın olarak infekte olduğu, fakat infeksiyonun genellikle indirekt olarak çevrenin kontaminasyonuna ve sularındaki kontaminasyonunda infekte karkaslardan ileri gelebileceği ileri sürülmektedir (29,53).

Diğer familyaları kapsayan kemiriciler (*Sincaplar=Sciuridae*, *Kunduzlar=Castoridae*, *Fareler=Muridae*)'in çoğunun arasına yüksek oranlarda infeksiyona yakalandıkları belirlenmiş ve *Kunduzlar (Castor canadensis)* ile kürk hayvanlarında yüksek mortalite ile seyrettikleri saptanmıştır (29,39,53).

Evde beslenen kuşlar, kazlar ve ötücü kuşlarda dahil olmak üzere bu grubu temsil eden örneklerde de infeksiyon serolojik olarak pozitif bulunmuştur. Tavuklarda doğal infeksiyonlar sonucu ölümler bildirilmiş; birçok tavuk cinsinde de (*Orman tavuğu=Bonasa*, *Kartavukları=Lagopus* ve *Ağaçkakan=Dendragapus*) laboratuvar infeksiyonu veya doğal infeksiyon bulunduğuna varsayılmaktadır (40,41,2). Ördek, kaz ve deniz kırlangıcı gibi birkaç türün tularemiye ölümcül derecede hassas olduğu belirtilmiştir. Deniz kırlangıcı (*Taridae*)'nin paranteral olarak infekte edilmesi sonucu infeksiyonun karaciğer, safra kesesi, böbrekler ve kloakaya kadar yayıldığı gözlenmiştir (39,53).

Tularemi'nin at sinekleri tarafından bulaştığı da ileri sürülmüş ve dipteralar o zamandan beri birçok lokalize epidemilerin sorumlusu olarak tutulmuştur. *Tabanidae* familyasına bağlı sinekler üzerinde yapılan incelemelerde bu sineklerin ölü hayvan karkasları üzerinde 48 saatlik bir süre içerisinde beslenmelerini sürdürdükleri görülmüş ve bu yolla sineklerin infeksiyonu hayvanlara naklettikleri ileri sürülmüştür (29,46,47,53). Diğer taraftan *Culicidae* familyasında bulunan; *Aedes Mansonia*, *Theobaldia* ve *Anopheles* türlerinin *F.tularensis*'i saklama ve nakletme yeteneğine

sahip oldukları saptanmıştır. Bulaşmada *Simulidae* ailesindeki sineklerin de rol oynadığı belirlenmiştir (46,53). Pirelerin deneysel ve doğal olarak infekte olduklarında infeksiyonun uzun peryotlar dahilinde tutabildikleri saptanmıştır. Bitler üzerinde yapılan çalışmalarda bunların enfeksiyonu doğal konakçalarına geçirme özelliğinde olduğunu göstermiştir (32,34,42).

Tulareminin geçişinde Tahtakurularının da (*Cimex lectularius*) elverişli vektörler oldukları belirlenmiştir (53). Geçiş tarzlarının yaygınlığı gözönünde bulundurulacak olursa, tulareminin çoğu zaman (A) tipi formunun özel bir kene kaynaklı hastalık olduğu ve infeksiyonun, Montana'da *D. andersonii* ile oluştuğu bildirilmiştir (46,47). O zamandan bu yana yapılan çeşitli çalışmalarda *Ixodidae* ailesindeki çeşitli cins kenelerin infekte olarak bulunduğu gözlenmiştir (11,28,32,34,42,46,47). Keneler bakteriyi içeren kanı sindirmeleri sonucu infekte olmaktadır. Bu noktada araştırmacılar arasında transstadial infeksiyonun görüldüğüne dair genel bir anlaşma bulunmaktadır (47,51). Bakterinin kenelerdeki yayılması incelenerek, etkenin kenelerin vücut dokularında ve lenf sıvılarında olduğu saptanmış ve infeksiyonun bilinen bazı türlerde aylarca hatta yıllarca sürdüğü yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Dişi *D. andersonii* keneleri ile yapılan çalışmalarda infeksiyonunun nesilden nesile geçtiği ve bu geçişte transovaryal naklin rol oynadığı saptanmış, ayrıca *D. andersonii*, *D. variabilis* ve *Rhiocephalus sanguineus* türlerinde de transovaryal geçişin söz konusu olduğu belirlenmiştir. Laboratuvarında infekte edilen *Argasid* kenelerinden *Ornithodoros parkeri*'nin 701 gün süreyle infekte olarak kalabildiği, ancak genelde bu kene türlerinin tularemi infeksiyonunun yayılmasında bir önemleri olmadığı ortaya konulmuştur (12,53).

Türkiye'de tularemi infeksiyonu ilk defa Lüleburgaz'da su kaynaklı bir vaka olarak gözlenmiştir. Bu infeksiyonu bakteriyolojik olarak ortaya koyan Plevnelioğlu'dur (44,57). Yapılan serolojik araştırmalarda tulareminin Trakya'da 1920 yılından öncede bulunduğu kanıtlanmıştır (57). 1937 yılına kadar tularemi, Trakya'ya özgü bir hastalık olarak düşünülmüşse de aynı yıl Konya ve Haymana'da birer tularemi vakası saptanmıştır (22). Orta Anadolu'daki bu vakalardan başka Bitlis'in Tatvan ilçesine bağlı Reşadiye bucağında da bir tularemi epidemisi bildirilmiştir

(14). İnfeksiyonun, ülkemizin değişik yerlerinde mevcut eski bir hastalık olduğu meydana konulduktan sonra, bu epidemilerin derecesini araştırmak amacıyla insan ve hayvan serumlarıyla incelemeler yapılmıştır (14). Yine değişik yıllarda; Antalya'da (1954) ve Bursa'da (1989) epidemiler görülmüştür (20,31,57). Yukarıda belirtilen bu epidemiler yalnızca insanlardan bildirilmiş olup, infeksiyonun hangi hayvanlarda görüldüğü ve ülkemizde hangi hayvanların rezervuar olduğu ortaya konulamamıştır. Golem ve ark. (22), 1944 yılında insan serumları ile tularemi üzerinde çalışırken bu arada elde ettikleri at, sığır, manda, koyun ve keçilere ait toplam 1218 serum ile çalışmalar yapmışlar ve bu hayvanlarda tularemi infeksiyonunu saptamışlardır (22).

MATERYAL VE METOD

Materyal:

1.a) Mikropleytlar: Mikroaglutinasyon ve ELISA testlerinde koyun kan serumlarında *F. tularensis* etkenlerine karşı oluşan antikorları ortaya koymak için, 96 çukurlu "U" şeklinde polystyrene mikropleytlardan yararlanılmıştır.

b) Optik okuyucu: ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde optik okuyucuda (METERTECH Σ 960) 405 nm'de gerçekleştirildi.

2. Besiyeri: *F. tularensis*'in gerek primer ve gerekse suşların üretiminde Francis, McCoy ve Chapin, Tiaminli-glikoz-sistin agar gibi besiyerleri kullanılmıştır (1,2,6,12,14,28,29,32). Son yıllarda başarılı sonuçlar vermesinden dolayı bir çok laboratuvarında Glycose-cysteine blood agar (GCBA) kullanıldığından dolayı araştırmada da bu besiyeri kullanılmıştır.

3. Tüp aglutinasyon test (TAT) antijeni: *F. tularensis* GCBA'da 48 saat üretilerek elde edilen kültürler fizyolojik tuzlu suda (FTS) süspansiyon edilerek, %0.3 yoğunluk olacak biçimde formalin eklenerek bir gece buzdolabında bekletilmiş, sterilite kontrolü yapıldıktan sonra, süspansiyonun standart aglutinan serum ile 1:1000 ve daha fazla aglutinasyon veren sulandırması belirlenmiştir. Süspansiyon bu sulandırma kadar sulandırılmış ve antijen olarak kullanılmıştır (5,7,9,18,20,49).

4. Mikroaglutinasyon test (MAT) antijeni: *F. tularensis*'in GCBA besiyerinde 48 saatlik kültürü %0.85 FTS ile toplanmış, %0.5 formalin içeren %0.85 lik FTS ile 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Formalin ile öldürülmüş olan

bakteri, formalinli FTS ile iki kez yıkanmıştır. %0.004 safranin+%0.5 formalinli FTS ile McFarland 4'e göre bulanıklığı ayarlanmış ve MAT antijeni olarak kullanılmıştır (5,7,22,27,40).

5. ELISA test antijeni: ELISA'da Sonike-ELISA (S-ELISA) antijeni kullanılmıştır. Aglutinasyon testi için kullanılan ve McFarland 4'e göre ayarlanan bakteri süspansiyonu Bundelin 70 ultrasonik cihazda ortaboy prob ile 70W güç uygulanarak 30-35 saniye aralıklarla parçalama işlemine tabi tutulmuştur. Ultrasonikleme işlemine net olarak iki dakika devam edilmiş, parçalama işleminden sonra elde edilen solusyon 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı alınarak S-ELISA antijeni elde edilmiştir (59).

6. Anti-serum ve Negatif serum örnekleri: Anti-serum, formalin ile inaktive edilen *F. tularensis* ile duyarlı hale getirilen tavşandan elde edilmiştir. Bu amaçla ml'de yaklaşık 10 bakteri içeren bakteriyel süspansiyon 2 haftalık sürede birbirini izleyen 3 gün süreyle tavşana intravenöz olarak enjekte edilmiş, 10. günde son enjeksiyon yapılmış ve tavşanın kanı alınarak serumu ayrılmış ve böylece anti-*F. tularensis* serumu elde edilmiştir (4). Negatif kontrol serumları için sağlıklı olduğu bilinen hayvanlardan alınan ve serolojik testlerle de reaksiyon vermeyen (50) serum örneği kullanılmıştır.

7. Enzimli anti-immunoglobulin: ELISA'da tavşandan elde edilmiş ve alkaline fosfat enzimi ile işaretli "anti-sheep IgG" (Sigma) kullanılmıştır. Denemeye alınırken pH 7.2 PBS+%0.5 BSA ile 1/1500 oranında sulandırılmıştır.

8. Enzim substratı ve tamponu: 5 mg p-nitrofenil-fosfat renkli şişelerde 5 ml. diethanolamine tamponunda eritilerek taze olarak kullanılmıştır.

9. Sığır serum albumini (BSA): Serum sulandırımı ve adsorbsiyon işlemi için PBS'de %0.1 dilüsyonunda, enzimli anti-immunoglobulini sulandırmak için PBS-Tween 20'de %0.5 dilüsyonunda kullanılmıştır.

10. Brucella antijenleri: *F. tularensis*, *B. abortus* ve *B. melitensis* ile kros reaksiyon verdiklerinden, TKB. Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü tarafından hazırlanan S 99 suşundan hazırlanan RBPT ve Brucella abortus aglutinasyon antijenleri kontrol amacıyla kullanılmıştır.

11. Serum örnekleri: Araştırmada kullanılan kan serumları 01.06.1995 ve 30.09.1995

taarihleri arasında (Tablo I)'de gösterilen yerlerden temin edilmiştir.

12. Kullanılan deney hayvanları: Deney hayvanları olarak beyaz fareler ve 6-8 aylık Ankara tavşanları kullanılmıştır.

13. Marazi maddeler: Kars Et Kombinasi ve Belediye Mezbahanesine kesim için getirilen ve ayrıca kan örnekleri toplamak için gidilen yerlerden muayene sonucu adenopati gösteren koyunlardan lenf yumrusu içerikleri usulüne uygun olarak alınmış ve etken izolasyonu için kullanılmıştır.

14. Keneler: Koyunlarda infeksiyonun geçişi keneler aracılığı ile olduğundan kan örnekleri toplama sırasında kene enfestasyonu olan hayvanlardan toplanan kenelerin tür ayırımı KAÜ. Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yapıldıktan sonra bunlardan etken izolasyonu yapılmıştır.

15. Solusyon ve tampon sıvılar: TAT ve MAT testlerinde FTS ve Formalinli FTS; ELISA'da serum ve konjugat sulandırılmaları ile yıkama işlemlerinde PBS+Tween 20'den, antijen sulandırılmaları için Coating buffer (pH 9.6)'dan ve substratın sulandırılmasında diethanolamine tampon çözeltilerinden yararlanılmış, ELISA'da reaksiyonu durdurma solusyonu olarak 3M NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Metod

1. Kenelerden etken izolasyonu uygulaması: Kenelerden etken izolasyonu uygulaması Hubalek ve ark. (28) bildirdikleri yöntemle yapılmıştır.

2. Serolojik testler: Toplanan 1600 adet koyun kan serumundan bütün testlere yetebilecek ve testler için uygun olabilecek nitelikteki 1412 adedi üç testte (TAT, MAT, ELISA) kullanılmıştır. Plate test ve Rose bengal plate test ile değerlendirilen ve pozitif sonuç veren serumlar diğer testlerde kullanılmamıştır.

a) Tüp aglütinasyon testi (TAT): Test, Brown ve ark. (7)'nin bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Her serum örneği için bir seri aglütinasyon tüpü alınarak ilk tüpe 0.8 ml. ve diğer tüplere 0.5'er ml 0.85'lik fenollü (%0.5) FTS konulduktan sonra, I. tüpe 0.2 ml serum ilave edilerek karıştırılmıştır. I. tüpteki serum sulandırılmasından, II. tüpe 0.5 ml aktarılmış ve bu işlem son tüpe kadar tekrarlanarak son tüpten 0.5 ml aktarılmış ve bu işlem son tüpe kadar tekrarlanarak son tüpten 0.5 ml atılmıştır. Böylece serumların iki kat su-

landırılmaları (1/5, 1/10.....1/640) elde edilmiştir. Daha sonra her tüpe *F.tularensis* tüp aglütinasyon antijeninden 0.5 ml konularak 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Dantela şeklinde çökeltinin görüldüğü son tüpteki sulandırma serum titresi olarak değerlendirilmiştir.

b) Mikroaglütinasyon testi (MAT): Test, Brown ve ark. (7)'nin bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Başlangıçta tüplerde serumun 1:10 luk dilüsyonları yapılmış, stok antijen süspansiyonu %0.5 formalin ve %0.005 safranin içeren (%0.5'lik stok solusyondan) %0.85'lik FTS'de 1:10 oranında sulandırılmıştır. MAT'nin başlangıcında (U) tabanlı pleytin ilk gözüne 1:10 oranında sulandırılan serumdan 50 µl konulmuş, geriye kalan 11 gözede %0.85'lik formalinli FTS'den 25 µl eklenmiştir. Serum örnekleri seri şekilde dilüe edildikten sonra tüm gözlerle 25 µl antijen ilave edilmiş, pleyt plastik bir koruyucu ile kapatılmış ve 20 dakika vertikal olarak karıştırılarak bir gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. (U) tabanlı pleytin bir gözünde aglütine olmuş hücreler ya da gözle görülebilir içerik aglütinasyon için pozitif oran olarak değerlendirilmiştir. Pleytin gözlerinin dibinde düğme şeklindeki çöküntüler ise negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir.

c) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): ELISA, antijenin hazırlanması, antijenin titrasyonu, negatiflik kriterinin belirlenmesi ve testin uygulanması olarak (4) aşamada gerçekleştirilmiştir (50).

Testin uygulanması: TAT ve MAT testlerinden oldukça duyarlı olan ELISA testi Viljanen ve ark. (58)'nin insan tulaaremisinin tanısında kullandıkları yöntem ile ve Ulusan'ın (56), insanlarda Aktif Tüberkülozlu olgularda ELISA Yöntemi ile tanısında kullandığı yöntemin; koyunlarda tulaemisi teşhisine adapte şekliyle uygulanmış ve mikropleytlerde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak S-ELISA antijeni karbonat tamponunda (pH 9.6) 1:1280 oranında dilüe edilerek mikropleytin bütün gözlerine 100 µl miktarında konulmuş ve 37 °C'de 3 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda pleytler yıkama solusyonu (0.1 M PBS+%0.005 Tween 20) ile 3 kez yıkanmıştır. Pleytlere PBS+%1 BSA 100 µl konulmuş ve oda ısısında 1 saat bekletilmiştir. Pleytler tekrar 3 kez yıkanmış ve kurutulmuştur. Ardından PBS+%0.1 BSA'da 1/1000 oranında sulandırılan serum örnekleri 100 µl olarak pleytlere konulmuş ve 2 saat oda ısısında bek-

letilmiş, süre sonunda 3 kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur.

Konjugat olarak kullanılan, alkali fosfat ile işaretli ve tavşandan elde edilen anti-sheep IgG (Sigma) PBS+%0.5 BSA+%0.05 Tween 20 solüsyonundan 1:1500 oranında sulandırılıp 100 µl miktarında pleytlere konulmuş ve oda ısısında 1 saat bekletilmiştir. Yıkama sıvısı ile 3 kez yıkandıktan sonra substrat olarak p-nitrofenil-fosfat, di-ethanolamin tamponunda 5 mg/ml şeklinde sulandırılarak 100 µl miktarında tüm çukurlara konulmuş, oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 3M NaOH'den 100 µl pleytin gözlerine konularak reaksiyon durdurulmuş ve (METERTECH Σ 960) ELISA reader'da 405 nm'de sonuçlar okunarak negatiflik eşiğinin üstünde kalan en son sulandırılma kadar olan reaksiyon pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmada her mikrolept için bir adet pozitif ve bir adet negatif serum kullanılmıştır.

BULGULAR

I. SEROLOJİK BULGULAR:

1. Plate test ve RBPT sonuçları: Araştırmada kullanılan 1600 adet koyun kan serumu PT ve RBPT ile değerlendirilmiş, testler sonucunda PT'de 89 (%5.56) ve RBPT'de 99 (%6.19) adet serum Brucella yönünden pozitif bulunarak araştırma dışı tutulmuştur.

2. Tüp aglütinasyon test (TAT) sonuçları: 1412 adet koyun kan serumunun bu test ile muayenesi sonucunda 28 (%1.98) adet serum pozitif ve 1384 (:98.02) adet serum negatif bulunmuştur.

3. Mikroaglütinasyon (MAT) sonuçları: Araştırmada kullanılan 1412 adet koyun kan serumunun MAT ile muayenesi sonucunda 50 (%3.54) adet serum pozitif ve 1362 (%96.46) adet serum negatif bulunmuştur (Resim I).

4. ELISA Sonuçları:

a) ELISA antijeninin protein miktarının tayini: ELISA antijeni kullanılmadan önce biüret metodu ile total protein miktarı hesaplanarak 408 µg/ml olarak bulunmuştur.

b) Antijenin titrasyonu: Pozitif referans serumun antijen sulandırılmalarında en iyi pozitif reaksiyon gösterdiği nokta antijen titresini olarak (1:1280) belirlenmiştir.

c) Konjugat titrasyonu: Antijen titrasyonunda kullanılan pozitif serum ve 1:1280 oranında sulandırılmış antijen ile yapılan konjugat titrasyonunda titre 1:1500 olarak be-

lirlenmiştir.

d) Negatiflik kriterinin belirlenmesi: Serolojik testlerde hiç bir reaksiyon göstermeyen 50 adet koyun kan serumu örneği ile antijen ve konjugat titrasyonunda kullanılan pozitif referans serum 3 defa ELISA ile değerlendirilmiş ve alınan ortalama değerlerle negatiflik ve pozitiflik eğrisi çizilerek negatiflik eşiği optik dansite (OD) 3.0 olarak saptanmıştır (Grafik I).

e) ELISA sonuçları: Bu testte 1412 adet serum örneğinden 110 adet (%7.80) adedi pozitif ve 1302 (%92.20) adedi negatif bulunmuştur.

II. KÜLTÜREL BULGULAR:

a) Kenelerden: Kenelerden etken izolasyonu Hubalek ve ark. (28) tarafından bildirilen yöntemle yapılmıştır. Toplam 279 ergin ve kan enmiş olan Dermacentor cinsi keneler PBS ile steril bir havanda ezilmiş ve toplam hacmin %15'i oranında sığır serumu ve 200 IU/ml hesabıyla penisilin eklenerek 1000 devirde 10 dakika santrifüje edilmiştir. Üstte kalan sıvı beyaz farelere intraperitoneal olarak injekte edilmiş ve temiz bir yere alınarak gözlem altında tutulmuşlardır. 5. günde ölen farelerin steril bir ortamda otopsi yapılmıştır. Otopside karaciğer üzerinde nekrotik odakların olduğu gözlenmiş, karaciğer ve dalaktan alınan örneklerden GCBA besiyerine ekimleri yapılarak 37 C'de aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. 4 ve 5. günlerde küçük, (S) tipi gri kolonilerin olduğu gözlenmiştir. Üreyen etken aerob, soluk boyanan, gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kokobasil görünümünde çok küçük bir bakteri olup ürümesi için CO₂'e gereksinim göstermemiştir (Resim II). Anti-F. tularensis serumu ile kuvvetli aglütinasyon vermiş, glikoz, maltoz ve mannozdan zayıf asit oluşturmuştur. Katalaz pozitif, oksidaz negatif etki göstermiş ve hafif H₂S oluşturmuştur (27). Üreyi parçalamamış, ekim yapılan diğer besiyerlerinde (anaerop, nutrient, kanlı agar vb.) üreme olmamıştır. Ayrıca mikroorganizma kloramfenikol, tetrasiklin ve streptomisine duyarlı; penisiline dirençli bulunmuştur (13,16,19).

b) Marazi maddelerden: Marazi madde olarak kullanılan ve adenopati gösteren koyunlardan alınan lenf yumrusu içerikleri direkt olarak GCBA besiyerine ekimleri yapılmış, 3 gün-3 hafta süreyle 37 °C'de aerob ortamda inkübasyona bırakılan besiyerlerinde herhangi

bir üremenin olmadığı görülmüştür.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tularemi, bakteri geçişi keneler tarafından oluşturulan; koyunlarda özellikle kuzularda akut, septisemik ve ölümlere yol açan latent seyirli bir enfeksiyondur. Avustralya ve Antarktika dışında tüm dünyada görüldüğünün bildirilmesine rağmen, ülkemizde enfeksiyonunun insidensi hakkında yeterli bir çalışmanın yapılmadığı görülmüştür (14,17,20,22,23,27).

Koyunlarda enfeksiyonun ortaya çıkması genellikle hayvan üzerindeki kene sayısı ile ilgilidir ve kene sayısı ne kadar çok olursa inkübasyon süresi de o derece kısa sürmektedir. Hastalık koyunlarda ve özellikle kuzularda akut formda seyretmektedir. Subakut formda ise hayvanda sürekli zayıflama, lenf yumrularında şiddetli büyüme, pnömoni ve arka kısımlarda zayıflık bulunmaktadır (2,6,11,26,29,31,47).

İnfeksiyonun tanısında direkt yöntemlerin (etken izolasyon ve identifikasyonu) değeri çok fazla olmasına rağmen enfeksiyonun latent seyirli olması ve etkenin izolasyonunun bu yöntemlerle güç olması nedeniyle her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle enfeksiyonun tanısında indirekt yöntemler (serolojik ve allerjik testler) önem kazanmaktadır.

Direkt yöntemde materyal olarak keneler ve adenopati gösteren koyunların lenf yumrularından alınan içerikler kullanılmış, bu materyallerin bir kısmı direkt olarak besiyerine ekimleri yapılmış; bir kısmı da deneme hayvanı kullanmak suretiyle etken izolasyonuna gidilmiştir. Direkt ekimde GCBA besiyerine ekimleri yapılan marazi maddeler 3 gün-3 hafta süreyle 37°C'de aerob ortamda inkübe edilmiş süre sonunda herhangi bir üremenin olmadığı saptanmıştır. Bu sonucun literatürlerde de bildirildiği gibi etkenin marazi maddelerden direkt olarak izolasyonunun güçlüğü konusunda paralellik gösterdiği görülmüştür. Buna karşın deneme hayvanı kullanılarak yapılan izolasyonda kene süspansiyonu beyaz farelere (ip) yolla enjekte edildikten 5 gün sonra ölen farelerin karaciğer ve dalaklarından alınan örneklerin GCBA besiyerine yapılan ekimlerde 5. günden sonra üremenin görülmesi etken izolasyonunda deneme hayvanları kullanılmasının literatürlerde de bildirildiği gibi izolasyonu kolaylaştırdığı görülmüştür (27,28,43). F. tularensis'in izolasyonundaki güçlükler nedeniyle enfeksiyonun laboratuvar tanısında serolojik ve

allerjik yöntemler daha fazla önem kazanmaktadır. Bu amaçla serolojik olarak TAT, MAT ve ELISA'dan; allerjik olarak Tularin intradermal testlerden yararlanılmaktadır (5,7,18).

Tüp aglütinasyon testi serum aglutininlerinin ölçümleri için yararlı bir test olduğu halde enfeksiyonun erken dönemlerinde pozitif sonuç vermemesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Buna ek olarak Brown ve ark. (7), TA testi yerine MA testinin kullanılmasının daha yararlı olduğunu ileri sürerek MAT'nin kolay, ucuz ve özgül oluşu, ayrıca enfeksiyonun erken döneminde pozitifleşmesi nedeniyle değerli bir test olduğunu savunmuşlardır. Aynı zamanda MAT'nin düşük titrelerdeki aglutininlerin saptanmasında en az ELISA kadar duyarlı olduğu ileri sürülmektedir (58). Sato ve ark. tulareminin serodiagnozunda MAT'nin duyarlı, spesifik ve kullanışlı olduğunu açıkça ortaya koymuşlardır (52).

Son zamanlarda ELISA'nın F. tularensis'in tanısında spesifik bir test olduğu bildirilmiştir. Tularemi tanısında ELISA'nın esas avantajı TAT'nin tularemiddeki tanı oranından yüksek oranda tanı sağlamasıdır (58). TAT, IgM sınıfı antikorları belirlerse de diğer sınıf antikorlar da sonucu etkilemektedir. Ancak ELISA selektif olarak farklı Ig sınıfı antikorların düzeyini ölçer ve böylece enfeksiyon bir serum örneği ile tanınabilir. Fakat teyid edici bir metodun bulunmaması sebebiyle olası hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuçların dolayısıyla gerçek tanısız ölçümlerin değerlendirilmesinin mümkün olmadığı bildirilmektedir (5,41,55,58).

Bu çalışmada farklı yerleşim birimlerinden sağlanan toplam 1600 adet koyun kan serum örnekleri TAT, MAT ve ELISA ile değerlendirilmiştir. Brucella yönünden pozitif bulunan 188 (%11.75) adet serum araştırma dışı tutulmuştur. Toplam 1412 adet serum örneği ile yapılan çalışmalarda; serum örnekleri TAT'de 28 (%1.098), MAT'de 50 (%3.54) ve ELISA'da 110 (%7.80) adet serum pozitif sonuç vermiştir (Tablo II). Buna göre ELISA testi sırasıyla MAT, TAT'den daha hassas bulunmuştur.

Test sonuçları arasındaki duyarlılık yönünden bu farklılık Bevanger ve ark. (5), Brown ve ark. (7), Sato ve ark. (52), Viljanen ve ark. (58) araştırmalarında da görülmektedir. Bu çalışmada ELISA ile pozitiflikleri saptamada TAT ve MAT'e göre sırasıyla; 80 (%5.67), 62 (%4.40) fazluluk belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen ELISA>MAT>TAT sırası

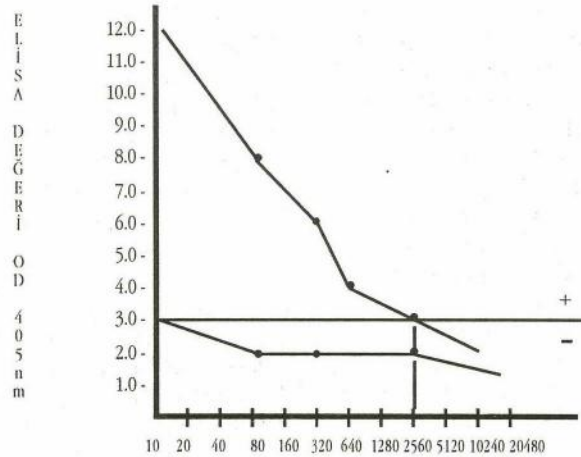
da Bevanger ve ark. (5), Brown ve ark. (7), Syrjala ve ark. (55), Viljanen ve ark. (58) sonucuna uygunluk göstermiştir. Francisella tularensis'in yöremizde hastalık ve salgınlar yapması için uygun koşulların bulunmasına karşın; belki de bir çok vaka başka hastalıkların maskesi altında gözden kaçmaktadır. Bu çalışmada da ortaya konulduğu gibi değişik antikor grupları (IgG, IgM) ile çalışan konvesiyonel testler (TAT, MAT) yanısıra ELISA gibi oldukça duyarlı bir testin koyunlarda da tulareminin tanısında kullanılması daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır. Ancak ELISA'nın pahalı bir yöntem olduğu düşünülürse; tanıda en az ELISA kadar duyarlı MAT'nin laboratuvarlarda

kullanılması daha uygun olacaktır. Bu çalışma insidens çalışması olduğundan alınan numune sayılarının yerleşim birimlerindeki hayvan sayılarının %5-10'u oranında olmasına dikkat edilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada gerek direkt ve gerekse indirekt yöntemlerle etkenin varlığı kanıtlandığından yöremizdeki koyunlarda bu infeksiyonun varlığından söz edilebilir sonucuna varılmıştır. Ayrıca koyunlarda tularemi infeksiyonunun pozitif olarak kabul edilebilmesi için aglütinasyon titresinin 1/200 oranında olması gerektiği bildirilmektedir (2,27). Yapılan serolojik çalışmalar sonucunda Kars bölgesindeki koyunlarda tularemi infeksiyonunun insidensi %0.14 olarak be-

Tablo II - 1412 Serum Örneği ile elde edilen TAT - MAT - ELISA Değerlerinin Karşılaştırılması

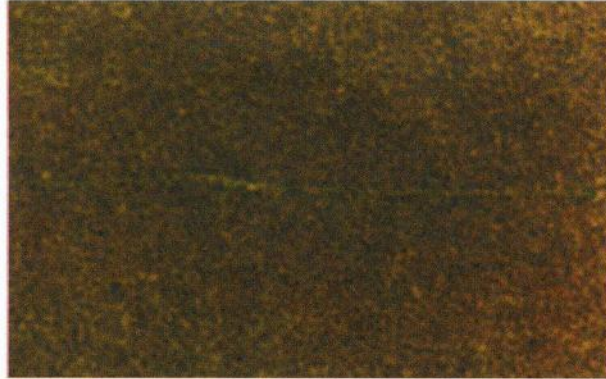
Titre	TAT		MAT		ELISA		TAT %	MAT %	ELISA %
	Adet	%	Adet	%	Adet	%	MAT-ELISA	TAT-ELISA	TAT-ELISA
20	005	0.35	016	1.13	045	3.19	031-0.11	32-0.35	90-28
40	013	0.92	013	0.92	037	2.62	100-0.35	100-0.35	24.46-28.46
80	004	0.28	016	1.13	020	1.42	0.25-0.2	40-0.8	40.00-12.50
160	-	-	005	0.35	006	0.42	- -	- 0.83	- 12
320	-	-	-	-	002	0.14	- -	- -	- -
640	-	-	-	-	-	-	- -	- -	- -
TOPLAM	022	1.55	050	3.54	110	7.80	0.44-0.2	22.73-45.45	50.00-22.00



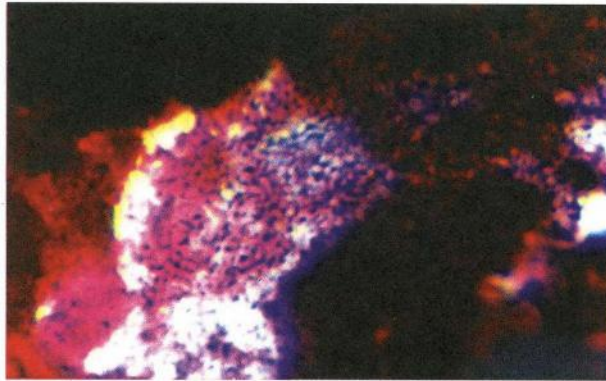
GRAFİK I - ELISA'da negatif ve pozitif serumlarla negatiflik kriterinin belirlenmesi



Resim 1 - MAT'de pozitif ve negatif sonuçlar



A) Kültürden, Giemsa (x 100)



B) Organdan sürme preparat, Giemsa (x 100)

Resim II - *F. tularensis*'in kültürden ve organdan Giemsa boyama ile preparatları (x 100)

Tablo 1 - Araştırmada kullanılan serum örneklerinin yerleşim birimlerine göre dağılımı

İlçe	Köy	Kan Örnekleri
Kars EBK		32
Digor	Saklıca	45
Tuzluca		57
Merkez	Çağlayan	39
Merkez	Bozkale	30
Susuz	Kızıroğlu	74
Akyaka	Yolboyu	58
Akyaka	Duraklı	80
Akyaka	Kürekdere	45
Akyaka	Demirkent (Yayla)	38
Digor	Gülheyran	45
Kağızman	Ortaköy	34
Merkez	Esenyazı	31
Merkez	Akbaba	21
Merkez	Çerme	25
Digor	İsaçayırı	27
Merkez	Karakale	20
Çıldır	Doğruyol	30
Arpaçay	Oğuzlu	32
Merkez		51
Akyaka	Akçalar	43
Merkez	Dikme	55
Merkez	Gelirli	40
Merkez	Çakmak	25
Merkez	Karaçoban	20
Merkez	Halefoğlu	35
Merkez	Davulköy	32
Merkez	Alçılı	21
Merkez	Ocaklı	25
Akyaka	Cebeci	35
Akyaka	Demirkent	51
Merkez	B. Aküzüm	37
Akyaka	Koyuntaş	48
Merkez	Kars Yayla	77
Merkez	Başgedikler	39
Mezbahane		203
TOPLAM		1600

KAYNAKLAR

1. AKAN, E. (1986): Tıbbi Mikrobiyoloji. Oba Kitabevi. Konya. 244-251.

2. ARDA, M.; MİNBAY, A.; LELOĞLU, N.; AYDIN, N.; AKAY, O. (1992): Özel Mikrobiyoloji, A.Ü.Veteriner Fakültesi Yay. No:1, 191-196.

3. BALDWIN, C.J.; PANCIRA, R.J.; MORTON, R.J.; COWELL, A.K.; WURZYNIAK B.J. (1991): Acute tularemia in three domestic cats. JAVMA, 199:1602-1605.

4. BERNARD, K.; TESSIER, S.; WINSTANLEY, J.; CHANG, D.; BORCZYK, A. (1994) Early Recognition of Atypical Francisella tularensis strains Lacking a Gysteine Requirement. J.Clin. Mikrobiol. 32 (2): 551-553.

5. BEVANGER, L.; MAELAND, J.A.; NAESS, A.I. (1988): Agglutinins and antibodies to Francisella tularensis Outer Membrane Antigens in the Early Diagnosis of Disease during an Outbreak of Tularemia. J.Clin. Mikrobiol, 26(3):433-437.

6. BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. (1989): Veterinary Medicine, A text book of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses. 7 nd ed. ELBS, London, U.K. 675-677.

7. BROWN, S.L.; McKINNEY, F.T.; KLEIN, G.C.; JONES, W.L. (1980): Evaluatio of a Safranin-O-Stained Antigen Microagglutination Test for Francisella tularensis antibodies. J.Clin.Mikrobiol, 11(2):146-148.

8. BİLGEHAN, H. (1987): Klinik Mikrobiyoloji, Barış Yay. İzmir, 206-212.

9. BİLGEHAN, H. (1995): Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 483-484.

10. CHRISTENSON, B. (1984): An Outbreak of Tularemia in the Northern Part of Central Sweden. Scand. J.Infect. Dis. 16:285-290.

11. CARTER, G.R. (1986): Veterinarian's Guide to the laboratory diagnosis of infectious disease. Vet.Med.Publ. Com.p., 274-276.

12. DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GIMBERG, H.; WOOD, W.B. (1984): Microbiology. Med.Dep., London, U.K., 806-809.

13. DIFCO MANUAL. (1985): Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10 th. Ed., Difco Laboratories, Detroit Mich. USA. 419-425.

14. DİRİK, K. (1990): Van Gölü Havzasında Tularemi. T.Hıfzısıhha ve Tec. Biy.Mec. 2(1), 193-198.

15. DOYLE, L.; MARKOWITS, J.; ROBERTS, J. (1988): Tularemia (*F.tularensis*) in Squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) Lab. Ani. Sci., 38(4): 491-492.
16. EIGELSBACH, H.T.; V.G.MCGANN (1984): Genus *Francisella* Dorofoev 1947. 176, 394-399. in N.R. Krieg and J.G.Holt (ed.) *Bergey's Manual of Sys. Bact.*, Vol.1, The Jilliams-Wilkins Co.Balt.
17. EVANS, ME.; GREGORY, D.W.; SCHAFFNER, W.; MCGEE, Z.A. (1988): Tularemia a 30-year experience with 88 cases. *Medicine*, 64 (2):251-269.
18. FİŞEK, N.H. (1956): Bulaşıcı hastalıklarla Mücadele ve Laboratuvar Teşhis Usulleri. Refik Saydam Hıfzısıhha Ens.Yay. No:9, 231-242.
19. FORSMAN, M.; SANDSTROM, G.; JAURIN, B. (1990): Identification of *Francisella* species and Discrimination of Type A and Type B strains of *F.tularensis* by 16S rRNA analysis. *App. Env. Microbiol.*, 56(4):949-955.
20. GEDİKOĞLU, S.; GÖRAL, G.; HELVACI, S. (1990): Bursa'daki tularemi epidemisinin özellikleri. *inf.Derg.*, 4(1):9-15.
21. GLOATTO, J.M.; RAE, JF.; MCDONOUGH, PL.; DASBACH, JJ.; GRAFTON, M.A. (1994): Feline tularemia on Nantucket Island. Massachusetts J.Vet.Diag.Invest. 6:102-105.
22. GOLEM, S.B. (1944): İnsan ve ehli hayvanlarda Tularemi bakımından serolojik araştırmalar. T.Hıfzısıhha ve Tec.Biy.Mec.4:34-36.
23. GOLEM, S.B. (1945): Lüleburgaz'da yeni bir tularemi epidemisi. T.Hij. ve Tec.Biy.Mec., 5:27-38.
24. GOLEM, S.B. (1940): Soğukkanlı hayvanlarda tularemi. T.Hij.Tec.Biol.Mec., 2:177-183.
25. GOTSCHLICH BERKİN, T. (1938): 1936 yılında Trakyada Tularemiye ait yapılan epidemiyolojik ve bakteriyolojik araştırmalar. *Türk Hij. Tec.Biol.Derg.*, 1:115-122.
26. HAKİOĞLU, F.; BATU, A.; SARISAYIN, F.; VURAL, A.; SİNA, M. (1971): Koyun Hastalıkları. Pendik Vet.Kont. ve Araş.Ens. Yay. No:3.
27. HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E.; STEIGERWALT, A.G.; WENGER, J.D.; WAYNEMOSS, C.; BRENNER, D.J. (1989) *Francisella philomiragia* comb. nov. (Formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* Biogrup *Novicida* (Formerly *Francisella novicida*) Associated with human disease. *J.Clin. Microbiol.*, 27(7):1601-1608.
28. HUBALEK, Z.; JURIKOVA, Z.; HALOUZKA, J. (1990): *Francisella tularensis* from Ixodid ticks in Gzechlovakia. *Folia Paras.*, 37(3): 255-260.
29. İMREN, H.Y.; ŞAHAL, M. (1993): Veteriner İç Hastalıklar. Medisan Yayınevi, Ankara.
30. JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A.; BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N. (1989): *Medical Microbiology*. 8 th. ed. lange Med.Book., 235-236.
31. KILIÇTURGAY, K.; GÖKIRMAK, F.; GEDİKOĞLU, S.; HELVACI, S.; TOREL, O.; TOLUNAY, O. (1989): Bursa'da tularemi epidemisi. *Inf. Derg.* 3(2):149-156.
32. KIMBERLING, C.V. (1988): Disease of Sheep. Disease of breeding sheep and nursing lamb. 3 rd ed., 122-124.
33. KINGSBURY, D.; WAGNER, G.E. (1990): *Microbiology*. 2 ed., NMS Herwal Publishing Company, Media, Penns., USA, 139-140.
34. LONG, G.W.; OPRANDY, J.J.; NARAYANAN, R.B.; FORTIER, A.H.; PORTER, K.; NACY, C.A. (1993): Detection of *Francisella tularensis* in Blood by Polymerase Chain Reaction. *J.Clin. Microbiol.*, 31(4): 152-154.
35. McCANE, L.; KANDEL, J. (1985): *Microbiology: Essential and application*. McGraw-Hill Book Comp, UZA, 636.
36. MALKOVA, D.; BLAZEK, K.; DANIELOVA, V.; HOLUBOVA, J.; LACIVKOVA, M.; MARHAUL, Z.; SCHRAMLOVA, D. (1986): Some diagnostik, biologic and morpholojik charecteristic of *Francisella tularensis* strains isolated from the ticks *Ixodes ricinus* (L.) in the Prague Agglomeration. *Folia Parasit.* 33(1): 87-95.
37. MANDEL, DOUGLAS, BENNET. (1979): *Principle-Practise of Infectious disease and their etiologic agent*. Part:III. 1784-1788.
38. MORNER, T. (1992): The ocoLOGY of tularemia. *Rev. sci. tech. Off int. Epiz.*, 1992, 11(4):1123-1130.
39. MÖRNER, T.P.; SANDSTROM, G.; MATTSON, R.; NILSSON, P.O. (1988): Infections with *F.tularensis* bv *palaeartica* in hares (*Lepus timidus*, *L.europeneus*) from Sweden. *J.Wildlife Dis.*, 24(3): 422-433.
40. MÖRNER, T.; MATTSON, G. (1988): Experimental infection of five species of raptors and of Hooded crows with

F.tularensis bv palaeartica. J.Wildlife Dis. 24 (1): 15-21.

41. MÖRNER, T.; SANDSTROM, G.; MATTSON, R. (1988): Comparison of serum and lung extracts for survey of wild animals for antibodies to F.tularensis bv. palaeartica. J.Wildlife Dis., 24(1):10-14.

42. MÖRNER, T.; MATTSSON, R.; FORSMAN, M.; JOHANSSON, KE.; SANDSTRÖM, G. (1993): Identification and classification of different isolates of Francisella tularensis. J.Vet.Med. Series B, 40 (9/10):613-620.

43. OIE (1992): Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, for lists A and B disease of mammals, birds and bees. Tularemia (B69): 673-679.

44. ONUL, B. (1990): İnfeksiyon hastalıkları. IV.Bas. A.Ü.Tıp. Fak. Yay. 391, 727-735.

45. ÖZEL, T.V. (1938): 1937 yılı yazında Trakya'da Tularemi tetkikatı. T.Hij.Tec.Biol.Derg. 1:1, 158-184.

46. PHILIP, C.B. (1983): Comments on tularemia and other tick-borne affection of live stock in Montana. The Bovine Practitioner 18:201-202.

47. PHILIP, C.B.; WILLIAMS, S.C. (1985): Tularemia and other hproblems in live stock in Montana. Bull. Soc.Vector Ecol., 10 (1):45-47.

48. PROVENZA, J.; KLOTZ, S.A.; PENN, R.L. (1986): Isolation of F.tularensis from blood. J.Clin. Microbiol. 24(3):453-455.

49. REGINA, M.; LONIGRO, J.; WALLECE, M. (1986): F.tularensis infection in captive wild Caught Praire dogs. Lab.An.Sci. 36 (2):178-190.

50. ROSE, R.N.; FRIEDMAN, H.; FAHEY, J.L. (1986): Manual of Clinical Immunology. 3 rd. Ed. American Society for Microbiology, Washington DC., 99-109.

51. SANDSTRÖM, G.; SJÖSTEDT, A.; FORSMAN, M.; PAVLOVICH, N.V.; MISHANKIN, B.N. (1992): Characterization and Classification of Strains of Francisella tularensis Isolated in the Central Asian Focus of the Soviet Union and in Japan. J.Clin. Microbiol., 30(1):172-175.

52. SATO, T.; FUJITA, H.; OHARA, Y.; HOMMA, M. (1990): Microagglutination test for early and spesific serodiagnosis of Tularemia. J.Clin. Microbiol., 28(10): 2372-2374.

53. STAENNER, H.;P KAPLAN, W.; TORTEN, M. (1990): Handbook Series in zo-

onoses. Section. A: Bacterial, rickettsial and mycotic disease. CRD Press Inc. Florida. 162-187.

54. STEWART, S.J. (1991): Francisella, p.454-456. In A.BALOWS; W.J. HAUSLER Jr.; K.L.HERMANN, H.A.ISENBERG; H.J.SHADOMY (ed) Manual of Clinical Microbiology, s th ed. American Society for Microbiology. Washington DC.

55. SYRJALA, H.; KOSKELA, P.; RIPATTI, T.; SALMINEN, A.; HERVA, E. (1986): Agglutination and ELISA Methods in the diagnosis of Tularemia in Different Clinical Forms and severites of the disease. The J.Inf. Dis, 153(1):142-145.

56. ULUSAN, N. (1994): Aktif Tüberkülozlu Olgularda PPD, MSO ve MSOA antijenlerini kullanarak ELISA yöntemiyle spesifik IgG antikorlarının araştırılması, Üzmanlık Testi.

57. UTKU, I.E. (1954): Antalya'da Tularemi epidemisi ve pususiyetleri T.Hij. ve Tec.Biy.Mec., 14(2):288-291.

58. VOLJANEN, M.K.; NURMI, T.; SALMINEN, A. (1983): Enzyoma Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with bacterial sonicate antigen for IgM, IgA and IgG antibodies to F.tularensis: Comparison with bacterial agglutination test and ELISA with LPS antigen. J.Inf. Dis. 148(4):715-720.

59. VOLK, A.W.; WHELER, M.F. (1988): Basic Microbiology. 6 th. Ed. Harper-Row, Publishers, Washington DC.