T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi İsmail DAVARCI

MERADA HAYVANLAR ÜZERİNDEN TOPLANAN KENELERDE MOLEKÜLER YÖNTEMLE *Francisella tularensis ve Rickettsia spp.* 'nin ARAŞTIRILMASI

EDİRNE

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Eda KIRILMAZ

EDİRNE-2024

TEŞEKKÜR

Sayın Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU'na, uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmamda desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi İsmail DAVARCI'ya, Prof. Dr. Şaban GÜRCAN'a, Prof. Dr. Nermin ŞAKRU'ya, Doç. Dr. Neşe AKIŞ'a, Doç. Dr. Canan ERYILDIZ'a, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi hocası Prof. Dr. Levent AYDIN'a, araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvar personeli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TUBAP-2023/18

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

FRANCISELLA TULARENSIS 3

RICKETTSIA SPP. 19

GEREÇ VE YÖNTEMLER **30**

BULGULAR **44**

TARTIŞMA **54**

SONUÇLAR **66**

ÖZET **68**

KAYNAKLAR **72**

SİMGE VE KISALTMALAR

AG: Ata grubu

ATP: Adenosin trifosfat

BCYE: Buffered charcoal yeast extract agar

BHI: Brain heart infusion

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CHAB: Cystein heart agar

ÇA: Çikolata agar

ELISA: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi

IFA: İndirekt İmmünfloresan Antikor Testi

LAMP: Döngü aracılı izotermal amplifikasyon

MAT: Mikro aglütinasyon testi

MLST: Multilokus dizilim tiplemesi

nPCR: nested PCR

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP: Kısıtlama enzimi parça uzunluğu polimorfizmi

SFG: Benekli ateş grubu

TGBA: Thioglycollate-glucose blood agar

TG: Tifüs grubu

TRG: Geçiş grubu

TSB: Trypticase soy broth

TAT: Tüp aglütinasyon testi

WHO: Dünya sağlık örgütü

qPCR: Kantitatif gerçek zamanlı PCR

GİRİŞ VE AMAÇ

Keneler vektör olarak görev yapmakta olup bakteriyel, viral ve paraziter patojenleri bulaştırabilirler. Bu durum hem insan hem de hayvan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturur (1). Son yıllarda Türkiye dahil olmak üzere, kene kaynaklı hastalıkların artış gösterdiği bilinmektedir (2). Keneler, aynı anda birçok farklı patojeni taşıyabilirler. Örneğin, Türkiye'de en sık görülen kene kaynaklı hastalıklar arasında Lyme hastalığı, Kırım-Kongo kanamalı ateşi, tularemi, riketsiya ve anaplasma enfeksiyonları yer alır. Kenelerin birden fazla patojen taşıma potansiyeli, enfekte olan kişilerin ve hayvanların çeşitli hastalıklara maruz kalma riskini artırır. Bu nedenle, kene ısırıklarının önlenmesi ve erken tanı ile tedavinin sağlanması önemlidir. Ayrıca, kene kaynaklı hastalıkların artış gösterdiği bölgelerde, halk sağlığı önlemleri ve bilgilendirme çalışmaları da gereklidir (2, 3).

Tularemi, *Francisella tularensis* bakterisinin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Bu hastalık genellikle kırsal bölgelerde ortaya çıkar ve bakterinin sindirim veya solunum yoluyla alınması veya tavşan, diğer kemiriciler ve kan emen artropodlarla (örneğin keneler veya sinekler) doğrudan temas sonucu bulaşabilir (4). *Francisella tularensis*, dış ortam koşullarına dayanıklı olması, enfektif dozunun düşük olması, kolay yayılabilmesi ve oluşturduğu klinik tabloların mortalitesinin yüksek olması gibi özellikleri nedeniyle önemli bir biyolojik silah ajanı olarak kabul edilmektedir (5, 6).

Rickettsia spp., benekli ateş grubu ve tifus grubu hastalıklarının etkenidir. Riketsiyalar, doğada memeli rezervuarlar ve artropod vektörler arasında bir döngüde yaşamlarını sürdürürler.

Benekli ateş grubu riketsiyalar çoğunlukla kenelerle ilişkilidir. Hastalar genellikle kene ısırmasından 6-10 gün sonra başlayan semptomlarla başvururlar. Bu semptomlar arasında ateş, grip benzeri semptomlar ve döküntü bulunmaktadır. Bu hastalıkların doğru tanısı ve tedavisi için erken müdahale önemlidir. Ayrıca, bu tür hastalıkların kontrolü ve yayılmasının önlenmesi için kene kontrolü ve kişisel koruyucu önlemlerin alınması önemlidir (7).

Bu tez çalışmasının amacı ülkemizde *Francisella tularensis* ve *Rikettsia spp.*'nin insanlara bulaşmasında önemli bir rol oynayan kenelerin potansiyel rollerinin ortaya çıkarılmasıdır. Çalışmada; Edirne Keşan köyleri olan Karahisar, Kılıçköy, Kızkapan, Orhaniye, Büyükdoğanca ve İpsala köyleri olan Yapıldak, Koyuntepe, Aliçopehlivan köylerinde merada otlanan ahır hayvanlarının üzerinden kene toplandı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilerek DNA ekstraksiyonu sonrası polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapıldı. Pozitif bulunan örneklerden dizi analizi yapıldı.

GENEL BİLGİLER

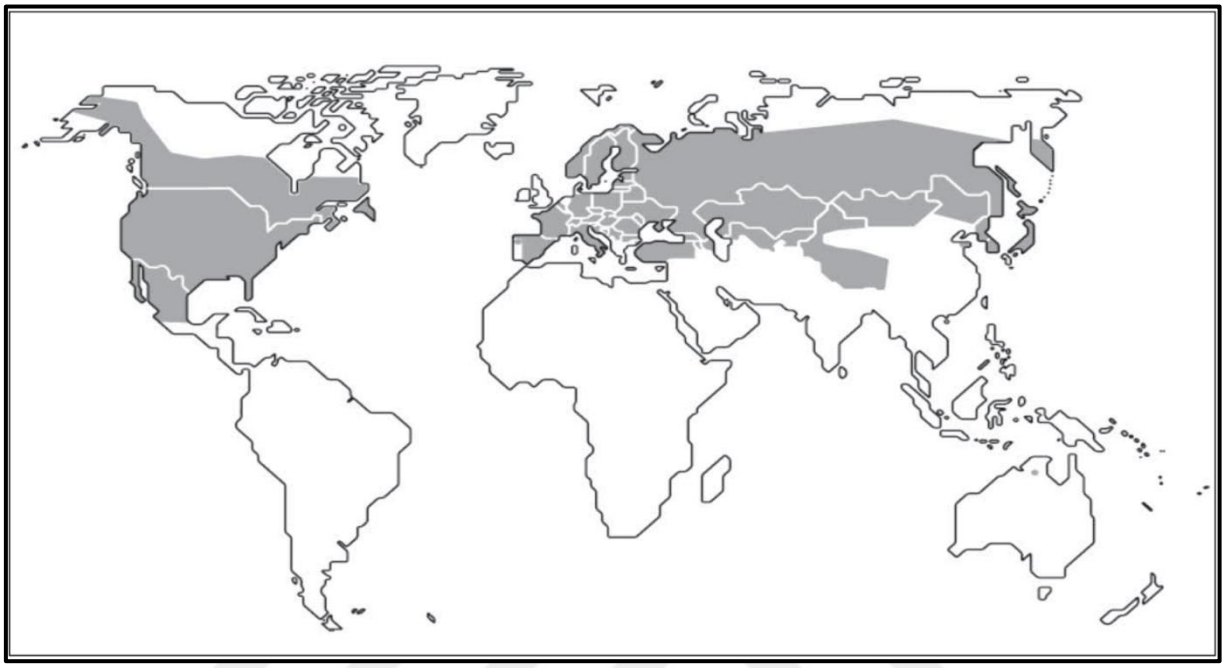
FRANCISELLA TULARENSIS

Tarihçe

Tularemi, uzun bir tarihe sahip hastalıktır ve ilk olarak vebayla mücadele sırasında Mccoy'un dikkatini çekmiştir. McCoy ve Chapin, 1911 yılında ilk kez Kaliforniya'nın Tulare şehrinde bulunan sincaplardan *Francisella tularensis*'i izole etmişlerdir (8, 9). Elde edilen basil, "*Bacterium tularense*" olarak adlandırılmıştır (10). Amerika Birleşik Devletleri Halk Sağlığı Hizmeti'nde çalışan Edward Francis, geyik sinekleri tarafından ısırılan Utah sakinlerinde görülen ülserasyon, lenfadenopati ve ateş belirtileriyle kendini gösteren vakaları araştırırken, salgında *Bacterium tularense*'in etiyolojik ajan olduğunu keşfetmiş ve hastalık için "tularemi" terimini önermiştir (11). İnsanlardan etkenin izolasyonu ise ilk kez 1914 yılında Ohio'da Lamp ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir (8). Parker ve ark. Minnesota'da bir kişide görülen tularemi enfeksiyonunun kaynağı olarak Dermacentor andersoni ve Dermacentor variabilis kenelerini belirlemişlerdir. Böylelikle kenelerin tularemi için bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuşlardır (12).

Francisella tularensis, birçok Kuzey Yarım Küre ülkesinde bildirilmesine rağmen, çoğu yerde nadir görülen bir etken olarak bilinmektedir (Şekil 1). Bu organizma, yüksek bulaş özelliği ve potansiyel biyoterörizm etkeni olması nedeniyle sınırlı sayıda araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Edward Francis, bu organizma üzerinde öncü bir bilim insanı olarak öne çıkmakta

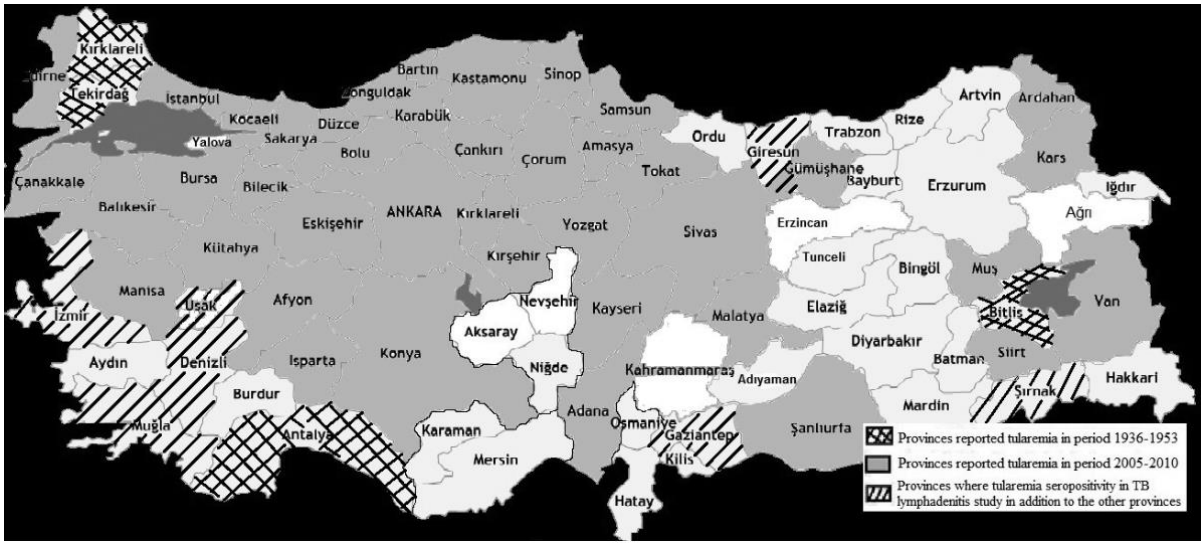
olup bakterinin günümüzdeki adı olan "*Francisella*", Edward Francis'in bilimsel katkılarını ve tularemi üzerine yaptığı çalışmaları onurlandırmak amacıyla verilmiştir (5).



Şekil 1: *Francisella tularensis'*in endemik olduğu yerleri gösteren dünya haritası **(13).**

Francisella tularensis, yüzyıllar boyunca biyoterörizm etkeni olarak kullanılmıştır. Özellikle 1950-1960 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri ve Sovyetler Birliği'nin saldırı stratejilerinde aktif olarak rol oynamıştır. Bu dönemde, 100.000'den fazla kişiyi etkileyen büyük ölçekli salgınlar meydana gelmiştir (14).

Ülkemizdeki ilk tularemi vakası 1936 yılında Lüleburgaz'daki bir askeri birlikte ortaya çıkmıştır. Kemal Hüseyin Plevnelioğlu ve ark. (15) salgının kontamine su kaynaklı olduğunu belirlemişlerdir. İlk salgının ardından Konya ve Haymana'da sporadik vakalar ve Tatvan'da küçük çaplı epidemi olguları rapor edilmiştir. İkinci büyük epidemi 1945'te Lüleburgaz'da meydana gelmiştir. Üçüncü epidemi ise 1953 yılında Antalya'da gözlemlenmiştir. 1955 yılından sonra bildirimi olmayan tularemi 1988'de (Bursa-Karacabey) tekrar ortaya çıkmış ve 2005 (Edirne-Demirköy) ve 2010'da (Kırşehir) yeniden salgınlar meydana gelmiştir (Şekil 2) (16).



Şekil 2: *Francisella tularensis'*in Türkiye illerindeki dağılımı (17).

Mikrobiyolojik özellikler

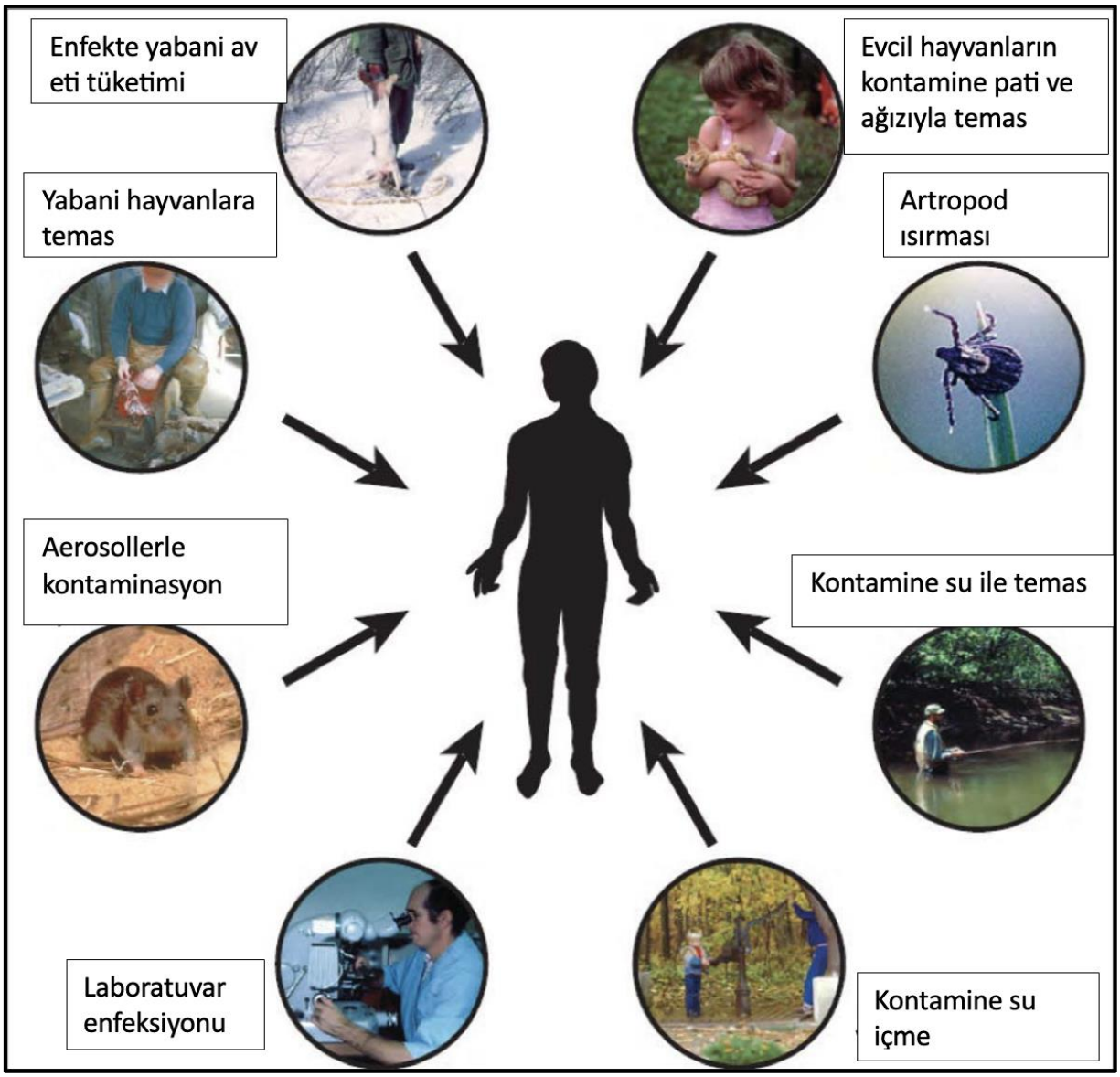
Francisella cinsi Gram negatif özellik gösteren, kokobasil, spor oluşturmayan, aerobik/mikroaerofilik ve fakültatif intraselüler bir bakteridir. Bu cinsin sınıflandırılmasında, değişken biyokimyasal test sonuçları nedeniyle zorluklarla karşılaşılmıştır. Başlangıçta *Bacterium* cinsi içinde yer almasına rağmen daha sonradan, bu grupta yer alan *Brucella* ve *Pasteurella* bakterileriyle genetik, fenotipik özelliklerinin ve hücre duvar yapısının farklı olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple, 1960 yılında yeni bir tür olarak kabul edilmiştir. 2000 yılında gerçekleştirilen 16S rRNA sekanslama analizi sonucunda, *Francisella* cinsinin *Thiotrichales* alt sınıfında yer aldığı ortaya konulmuştur. Serolojik yöntemler, bir organizmanın antikorlarını veya antijenlerini belirlemeye dayanır. Ancak, *Francisellaceae* ailesinin tek cins bakterisi olan *Francisella* türleri genetik yapılarındaki benzerlikler nedeniyle serolojik olarak ayrılamazlar. İki farklı *Francisella* türü arasında genellikle çok az antijenik farklılık bulunur. Bu nedenle, *Francisella* türlerinin ve alt türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması genellikle moleküler teknikler kullanılarak yapılır. Bu teknikler arasında DNA dizileme, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), multilokus dizilim tiplemesi (MLST) ve genom analizi gibi yöntemler bulunmaktadır (5).

Taksonomi

- Şube: *Proteobacteria*
- Sınıf*: Gammaproteobacteria*
- Takım*: Thiotrichales*
- Aile: *Francisellaceae*
- Cins: *Francisella*
    - *Francisella tularensis*
    - *Francisella tularensis subsp. tularensis* (Biovar tip A)
    - *Francisella tularensis subsp. holarctica* (Biovar tip B)
    - *Francisella tularensis subsp. mediasiatica*
    - *Francisella tularensis subsp. novicida*
    - *Francisella tularensis* 99A-2628 (Tam sınıflandırılması yapılamamıştır.)
    - *Francisella tularensis* B-SA (Tam sınıflandırılması yapılamamıştır)(18).

Tulareminin epidemiyolojisi

Bakterinin doğal konakları arasında kemirgenler, tavşanlar, geyikler, sincaplar, misk sıçanları, yabani sıçanlar, kunduzlar, tarla fareleri ve rakunlar bulunmaktadır. Bakterinin hayvandan hayvana bulaşması genellikle keneler ve geyik sineklerinin ısırmasıyla gerçekleşmektedir (19). İnsanlarda enfeksiyon ise en sık kene, geyik sinekleri ve sivrisineklerin ısırması veya enfekte hayvanların dokusuyla temas sonucu meydana gelmektedir. Ayrıca, enfekte hayvanla kontamine olmuş suların içilmesiyle de bulaşabilmektedir. Ancak, insandan insana bulaş yoktur. Bakteri, kenelerde transovaryal yolla aktarılabildiği için sürekli olarak enfekte keneler üremektedir. Kenelerin en az 13 farklı türünün *Francisella tularensis* ile enfekte olduğu bilinmektedir. Kuzey Amerika'da, *Francisella tularensis* en sık köpek kenesi (Dermacentor variabilis), orman kenesi (Dermacentor andersoni) ve Leno Star kenesi (Amblyomma americanum)'nde görülmektedir (20). Avcılar arasında bulaş; tavşanlar, yabani tavşanlar, kunduz, misk sıçanı gibi enfekte hayvanların yenmesi ve derilerinin yüzülmesi sırasında direkt temas yoluyla gerçekleşmektedir (21). *Francisella tularensis* son derece bulaşıcıdır ve 10-50 bakterinin intradermal veya solunum yoluyla verilmesi hastalığa neden olabilmektedir (Şekil 3) (13).



Şekil 3: *Francisella tularensis*'in bulaş yolları (23).

Francisella tularensis 4 biovaryanta ayrılır; *tularensis, holartica, mediasiatica, novicida*. *Francisella tularensis subsp. tularensis* Biovar tip A olarak da bilinmektedir. Biovar tip A yalnızca Kuzey Amerika'da görülür. Avrupa'da Biovar tip A'nın varlığına dair raporlar sunulmuş olmasına rağmen, bu konuda yapılan çalışmalar halen devam etmektedir. *Francisella tularensis subsp. holarctica* Biovar tip B olarak da bilinmektedir. Biovar tip B Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da bulunmaktadır. *Francisella mediasiatica* sadece Orta Asya'nın sınırlı bölgelerinde bulunmaktadır. *Francisella novicida* ise Kuzey Amerika bulunmaktadır. Önceleri

Güney Yarım Küre'de tularemi olduğuna dair bir inanış olmamakla birlikte, 2011 yılında Tazmanya'da 3 insan vakası rapor edilmiştir. Bu vakalar, halka kuyruklu keseli sıçanlardan (Pseudocheirus peregrinus) elde edilen izolatlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, Japonya'da izole edilen Tip B suşlarının (Biovar japonica) Tazmanya'da bulunan suşlarla aynı olduğu belirlenmiştir (22-24).

Vektörler ve rezervuarlar

Francisella tularensis birçok farklı türde artropodlarda bulunabilir. Artropodlar, genellikle vektör olarak adlandırılan ve etkeni bir kişiden diğerine veya hayvandan insana taşıyan organizmalardır. Bu artropodlar arasında pireler, bitler, keneler, tatarcıklar, tahtakuruları, sivrisinekler bulunmaktadır. Ancak, insana bulaşın en sık sert kene, geyik sineği ve sivrisinekler aracılığıyla gerçekleştiği gözlenmiştir (10).

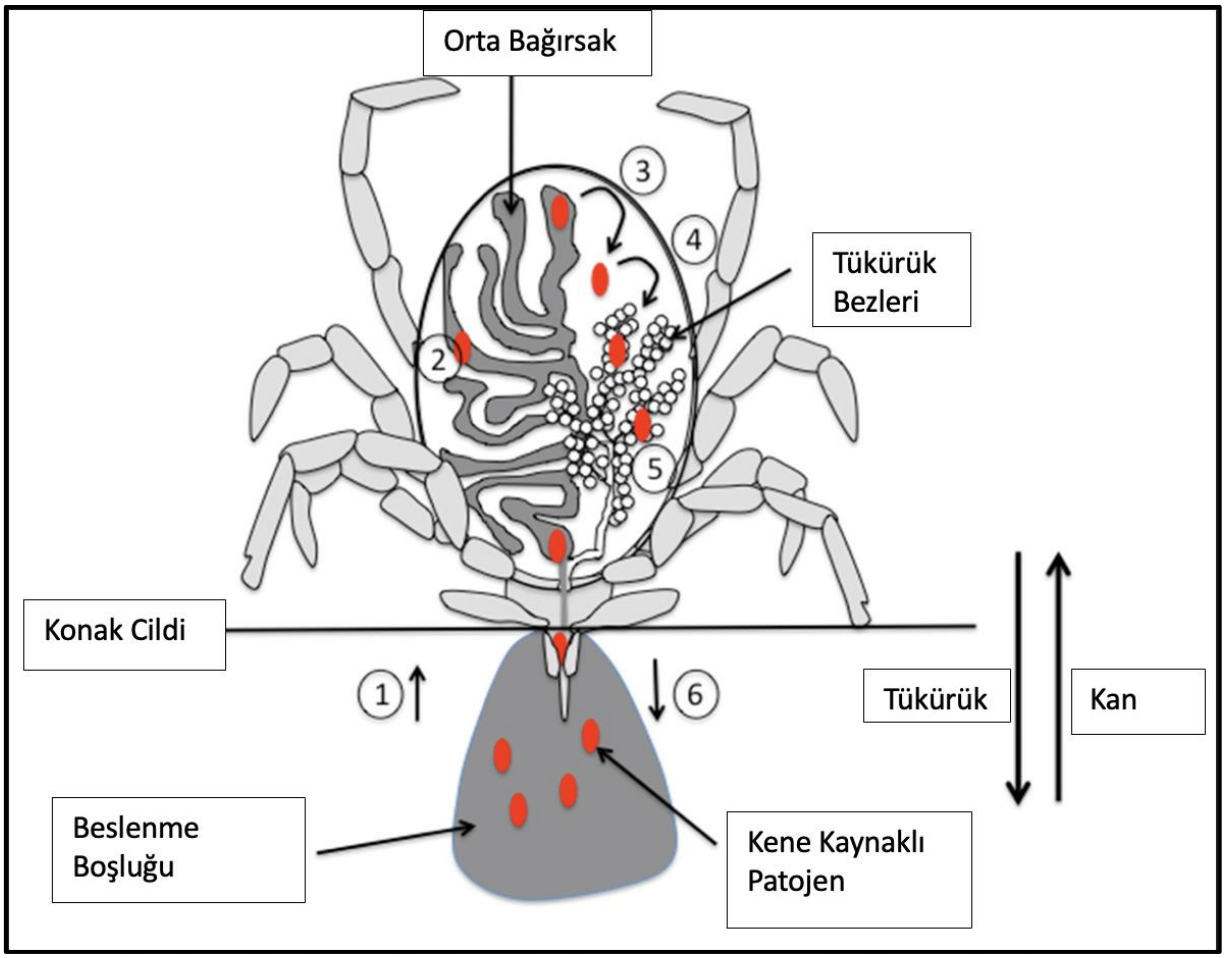
Keneler

Francisella tularensis kenelerden ilk defa 1924 yılında Dermacentor andersoni'de izole edilmiştir. Amerika'da tulareminin en sık bulaş yolu kenelerdir. Bu etken Amerika'da en sık Dermacentor variabilis, Dermacentor andersoni, Amblyomma americanum kenelerinde görülmektedir. Kenelerin yaşam döngüsü üç formdan oluşur: larva, nimf ve erişkin (Şekil 4). Yapılan çalışmalar, kenelerin larva aşamasından erişkin aşamasına geçiş sırasında etkenin transovaryal geçişinin gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Transovaryal geçiş, patojenlerin ebeveyn kenelerden yumurtalara aktarılmasına olanak bilinir. Böylece yavrular doğar doğmaz enfekte olabilirler. Bu bulgu, tularemi ve diğer kene kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisini anlamak ve kontrol etmek için önemli bir faktördür. Bu durumda enfekte olan kene, bu patojenleri taşıyarak enfekte olmamış konakları enfekte edebilir. Bu süreç, kenelerin özel anatomik yapıları aracılığıyla gerçekleşir. Kene, konak organizmanın derisine yerleştiğinde, ağız kısmındaki kesici ve emici yapılar vasıtasıyla deriyi deler ve kan dolaşımına erişir (Şekil 5). Keneler kan emerken, enfekte olmuş konaktan enfeksiyon etkenini kendilerine ya da yeni bir konak organizmasına aktarabilirler. Bu mekanizma, birçok hastalığın kene aracılığıyla bulaşmasının temel nedenlerinden birini oluşturur. Keneler enfekte olduklarında hem enfeksiyon etkenlerinin taşıyıcısı hem de bu etkenlerin konak organizmalara bulaşmasına neden olan vektörlerdir**.** Bu durum, kenelerin hem rezervuar hem de vektör olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Keneler, patojenleri konaklarına ısırarak bulaştırmalarının yanı sıra, dışkıları

aracılığıyla da patojenleri yayabilirler. Etken kenelerin dışkısında 2-3 güne kadar canlılığını korur. Dolayısıyla dışkı ile bulaş önem arz etmektedir (10, 19, 25).



Şekil 4: Rhipicephalus sanguineus (Sırasıyla dişi, erkek, nimf, larva ve yumurta formları). Ölçek çubuğu 1 mm (26).



Şekil 5: Bir kene tarafından patojen edinimi, gelişimi ve bulaşmasının şematik gösterimi. Keneler, konak organizmalara patojenleri bulaştırırken bir dizi karmaşık süreci içeren bir mekanizma kullanırlar. İlk olarak, kene ısırma sırasında kan emerken, patojenler kanla birlikte yutulur (1 numara). Ardından, patojenler orta bağırsağı işgal eder ve türüne bağlı olarak bir sonraki beslenmeye kadar orta bağırsakta kalabilir veya hemen sindirim kanalının epiteline geçmek için kene gövdesini istila eder (2-3 numara). Bu aşamada, patojenler sindirim kanalının epitelini geçerek tükürük bezlerine doğru hareket eder ve tükürük asinüslerini istila eder (4-5 numara). Son olarak, beslenme sırasında, patojenler tükürük ile yeni bir konak organizmaya enjekte edilir (6 numara) (27)**.**

Kene kaynaklı enfeksiyonlar genellikle yaz aylarında artış gösterir. Bu mevsimsel artış, kenelerin aktif olduğu dönemde insanlarla temasın artmasına ve doğal habitatlarında daha yoğun olarak bulunmalarına bağlanır. Yaz mevsimi, insanların açık hava etkinliklerine daha

fazla katıldığı ve ormanlık, otlak ve park gibi kene habitatlarında daha fazla zaman geçirdiği bir dönemdir. Bu durum, insanlar ile keneler arasındaki temasın artmasına ve dolayısıyla kene kaynaklı enfeksiyon riskinin yükselmesine yol açar. Ayrıca, yaz aylarında sıcak ve nemli hava koşulları, kenelerin daha hızlı gelişmesine ve çoğalmasına olanak sağlayarak enfeksiyon riskini artırır (10, 19, 25).

Taksonomi

Şube: Arthropoda

Alt sınıf: Arachnida

Takım: Ixodida

Aile: Ixodidae

Cins: Ixodes

Tür: Ixodes ricinus

Cins: Amblyomma

Tür: Amblyomma variegatum

Cins: Archaeocroton

Cins: Bothriocroton

Cins: Haemaphysalis

Tür: Haemaphysalis parva

Tür: Haemaphysalis sulcata

Tür: Haemaphysalis punctata

Tür: Haemaphysalis inermis

Cins: Hyalomma

Tür: Hyalomma anatolicum anatolicum

Tür: Hyalomma anatolicum excavatum

Tür: Hyalomma detritum

Tür: Hyalomma marginatum marginatum

Tür: Hyalomma marginatum rufipes

Tür: Hyalomma marginatum turanicum

Tür: Hyalomma aegyptium

Cins: Nosomma

Cins: Dermacentor

Tür: Dermacentor marginatus

Tür: Dermacentor niveus

Cins: Rhipicentor

Cins: Rhipicephalus

Tür: Rhipicephalus sanguineus

Tür: Rhipicephalus bursa

Tür: Rhipicephalus turanicus

Tür: Rhipicephalus appendiculatus

Cins: Robertsicus

Cins: Nuttalliellidae

Cins: Argasidae

Cins: Boophilus

Tür: Boophilus annulatus calcaratus (28).

Klinik

Tularemi klinik olarak çeşitli bulgularla ortaya çıkabilir. Bu klinik bulgular etkenin giriş yoluna, bakteri miktarına ve kişinin immün cevabına bağlıdır. Tularemi hastalığının altı klasik formu tanımlanmıştır: Ülseroglandüler, glandüler, okuloglandüler, orofaringeal, tifoid ve pnömonik (29, 30).

Dünyada en yaygın görülen klinik formlar arasında ülseroglandüler ve glandüler tularemi bulunur. Ülseroglandüler form, genellikle kene ısırması, sivrisinek sokması veya enfekte hayvan dokularına temas sonrası oluşur. Enfeksiyon, giriş noktalarında ülserasyonla birlikte proksimal lenfadenopati veya bölgesel lenfadenopati ile karakterizedir. Ateşle beraber

bakteri giriş bölgesinde oluşan papül ülser haline dönüşür. Bu form, tüm Amerika Birleşik Devletleri'nde görülen tularemi vakalarının yaklaşık %50-85'ini oluşturur. Glandüler formda ateş ve ağrılı lenfadenopati varken ülser yoktur. Tifoid form %10-15 oranında görülmektedir. Akut bir başlangıca sahiptir. Boğaz ağrısı, yüksek ateş, titreme ve bağırsak semptomları gibi belirtilerle karakterizedir. Tifoid formunda, ülser veya enfeksiyon giriş noktası belirgin değildir ve lenfadenopati genellikle gözlenmez. Pnömonik tularemi ise, inhalasyonla ya da diğer formların komplikasyonu sonucunda etkenin hematojen yolla yayılmasıyla oluşur. %5-10 oranında görülmektedir. Bu klinik form, akciğerlerde ciddi enfeksiyonlara neden olarak fatal seyredebilir. Pnömonik tularemi, özellikle solunum yoluyla patojenlerin yayılmasını kolaylaştıran laboratuvar koşullarında çalışan kişilerde görülebilir. Bu nedenle, laboratuvar güvenliği önlemlerinin ve uygun koruyucu ekipmanların kullanımının önemi büyüktür (29, 30). Orofaringeal tularemi, kontamine gıdaların yenmesi veya kontamine suların içilmesiyle ortaya çıkar. Kuzey Amerika'da nadir görülürken ülkemizde en sık görülen formdur. Bu çeşitli klinik formlar, hastalığın tanı ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü her bir formun spesifik belirtileri ve seyri vardır. Bu nedenle, hastalığın klinik seyrinin anlaşılması, etkili tedavi ve önleme stratejilerinin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir (30).

Tanı

Francisella tularensis en sık laboratuvar kaynaklı enfeksiyon sebeplerinden biridir. Bu nedenle, tularemi şüphesi olan hastalardan alınan numuneleri göndermeden önce laboratuvar personelinin bilgilendirilmesi büyük önem taşır. Bu bilgilendirme, laboratuvar personelinin gerekli önlemleri almasını sağlar ve enfeksiyon riskini en aza indirir. Serolojik ve moleküler tanı genellikle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilir. Bu tür laboratuvarlar genellikle biyogüvenlik düzeyi 2'ye sahiptir. Öte yandan kültür, antibiyogram ve biyokimyasal testler en az biyogüvenlik düzeyi 3 olan laboratuvarlarda gerçekleştirilir (31).

Laboratuvar çalışanlarının enfeksiyon riskini azaltmak için maske, eldiven ve önlük gibi kişisel koruyucu ekipmanların kullanımı önerilir. Bu ekipmanlar, laboratuvar ortamında potansiyel olarak patojen içeren materyallerle teması önler ve enfeksiyon riskini minimize eder (31).

Laboratuvar tanısı genellikle kültür, serolojik testler (antijen tespiti ve antikor tespiti) ve moleküler yöntemler kullanılarak konulur. Bu testler, hastalığın tanısını koymak ve uygun tedavi stratejilerini belirlemek için önemlidir (31).

Kültür

Francisella tularensis'in kesin tanısı kültür izolasyonuna dayanır ve bu yöntem altın standart olarak kabul edilir. Bu işlem, bakterinin uygun besiyerlerine ekim yapılarak ve belirli büyüme koşullarında inkübe edilerek gerçekleştirilir.

Nazlı üreyen bir bakteri olduğundan çoğalması için özel besiyerlerine ihtiyaç duyar. Sistin, sistein veya sülfidril bileşenlerini içeren besiyerler tercih edilir. En yaygın olarak kullanılan besiyerlerinden biri glikoz-sistein agardır. Bu besiyerine "Francis besiyeri" de denir. Bununla birlikte, diğer besiyerleri de kullanılabilir. Bunların arasında %9'luk ısıtılmış koyun kanı içeren cystein heart agar (CHAB), sistein ilaveli zenginleştirilmiş çikolata agar (ÇA), buffered charcoal yeast extract agar (BCYE), %1 hemoglobin-%1 IsoVitaleX ilaveli agar ve thioglycollate-glucose blood agar (TGBA) bulunur (13, 32).

Francisella tularensis, zorunlu aerobik bir bakteridir ve CO_2'li ortam üremesini kolaylaştırır. Optimal büyüme sıcaklığı genellikle 35-37 °C arasındadır. Yoğun bir inokulum, genellikle 18 saat içinde gözle görülür bir büyüme sağlayabilir, ancak tek tek kolonilerin belirgin hale gelmesi genellikle 2-4 günlük bir inkübasyon sonrasında olur (Şekil 6-7)(33).



Şekil 6: *Francisella tularensis* bakterisinin 37°C sıcaklıkta, 24 saat boyunca çikolata agar besiyerinde ve CO_2 zengin ortamda inkübe edildikten sonrasında görüntüsü (34).



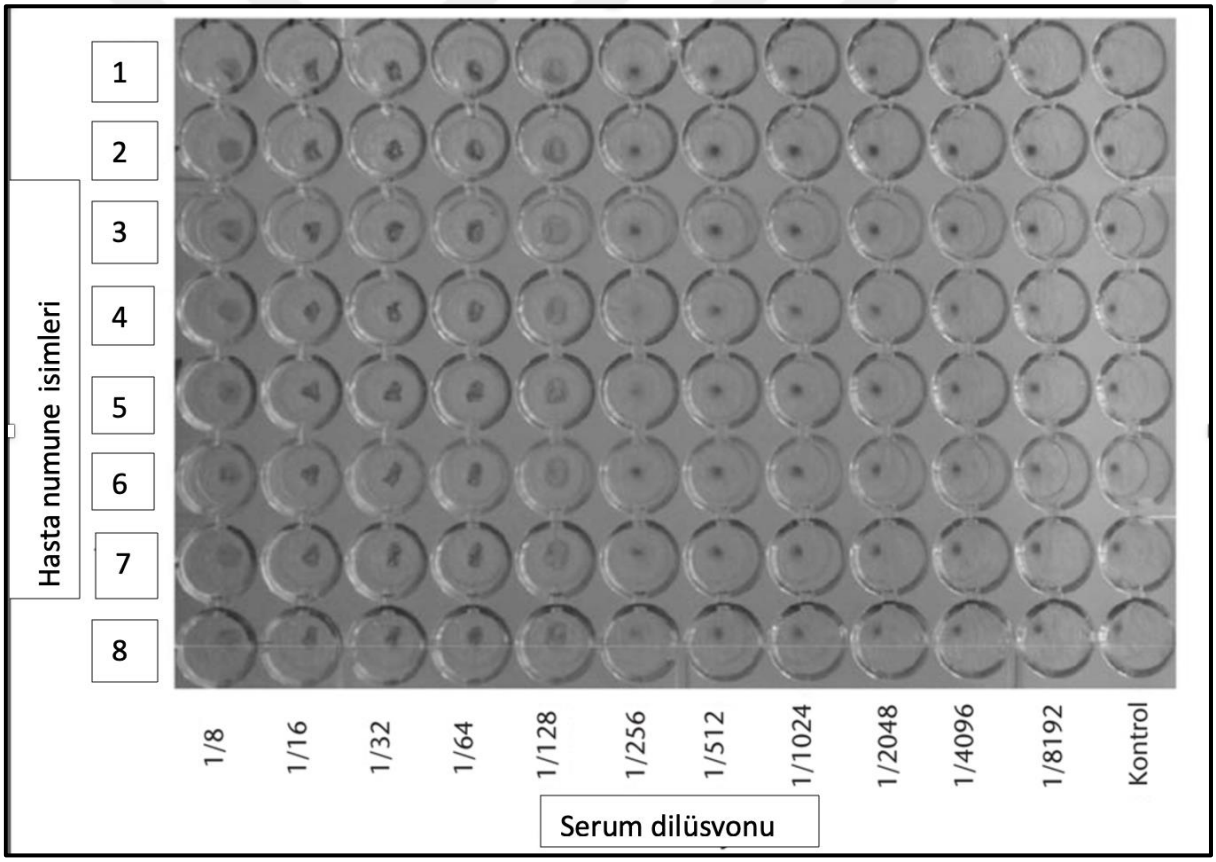
Şekil 7: *Francisella tularensis* bakterisinin 37°C sıcaklıkta, 72 saat boyunca çikolata agar besiyerinde ve CO_2 zengin ortamda inkübe edildikten sonrasında görüntüsü (35).

Francisella tularensis, sıvı besiyerlerindeki kısıtlı üreme potansiyeli nedeniyle rutin mikrobiyoloji testlerinde genellikle tercih edilmemektedir. Bu nedenle, sıvı besiyeri olarak tercih edilen besiyerlerinin dikkatle seçilmesi gerekmektedir. Brain Heart Infusion (BHI), Trypticase Soy Broth (TSB) ve Thioglycolate sıvı besiyerleri gibi bazı uygun seçenekler, *Francisella tularensis*'in sıvı ortamda yaşamını sürdürebilmesi ve çoğalabilmesi için gerekli uygun koşulları sağlar (13).

Serolojik tanı yöntemleri

Francisella tularensis'in tanısında, serolojik testler hala en yaygın kullanılan tanı yöntemleridir. Bu bağlamda Francis ve Evans tarafından 1926'da yapılan bir çalışmada, tüp aglütinasyon testi (TAT) kullanılarak aglütinasyon reaksiyonu ile ilgili ilk rapor sunulmuştur. Bu test, bakterinin antijenlerine karşı oluşan antikorların varlığını ve yoğunluğunu tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Francis ve Evans'ın çalışması, tularemi enfeksiyonunun tanınmasında önemli bir adım olarak kabul edilmiştir. Böylelikle aglütinasyon testi, *Francisella tularensis*'in tespitinde yaygın olarak tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (36).

TAT tularemi tanısında uzun yıllar boyunca yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Ancak, zaman içinde daha hızlı uygulanabilen ve daha pratik yorumlanabilen mikro aglütinasyon testi (MAT) TAT'ın yerini almıştır. MAT, TAT'a göre daha az miktarda serumu kullanarak antikorların bakteri antijenleri ile etkileşimini belirlemek için geliştirilmiş bir yöntemdir. MAT laboratuvar teknisyenleri ile klinik uygulamalarda çalışan sağlık personeli tarafından daha fazla tercih edilmektedir. Bu test tularemi ve diğer enfeksiyonların hızlı ve güvenilir bir şekilde teşhis edilmesine olanak sağlarken, aynı zamanda daha pratik bir uygulama sürecine sahiptir. Bu nedenle MAT tularemi teşhisinde standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir (37). MAT hastalığın erken dönemlerinde daha duyarlı bir test olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca MAT'ta TAT'a göre çok daha az miktarda antijen kullanılmaktadır (Şekil 8)(38).



Şekil 8: 1/128 titrede pozitif serum örneklerinin mikroplak titrasyonu (39).

Mokelüler yöntem

Francisella tularensis'in ilk tam genom dizisi 2005 yılında belirlenmiştir (40). Bu temel sekans, klasik tip suşlar arasında sınıflandırılan Biovar A'yı temsil etmektedir. GenBank veri tabanında toplamda 16 tam *Francisella tularensis* genomu ve daha fazla kısmi genom mevcuttur. Bu gen veri havuzu, bu genomların karşılaştırmalı analizini mümkün kılar ve *Francisella tularensis*'in genom evrimi hakkında önemli görüşler sunar (41).

Biyoterörizm etkeni olarak potansiyel kullanımı ve halk sağlığı endişeleri nedeniyle *Francisella tularensis*'in hızlı bir şekilde tanımlanması son derece önemlidir. Bu amaçla, ilk olarak DNA tabanlı teknikler kullanılmıştır ve bu teknikler genellikle 16S rRNA genine odaklanmıştır. Ancak, 16S rRNA genleri, *Francisella tularensis* 'in dört alt türü arasında %98,5-%99,9 arasında yüksek benzerlik gösterdiğinden bu yaklaşımın zor olduğu anlaşılmıştır (41).

DNA tespitinin yapılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), çeşitli patojenlerin tanımlanmasında tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Çünkü hızlı, hassas bir yöntemdir. Konvansiyonel PCR'da, *Francisella tularensis*'in tüm alt türlerini saptamak için sıklıkla tul4 genine bakılmaktadır, ancak fopA geni de tercih edilebilir. Gerçek zamanlı PCR, *Francisella tularensis* 'in tespiti için yaygın bir seçenektir; bu yöntem hem hassas hem güvenilirdir hem de maliyet etkindir. Bu teknikler arasında en sık kullanılanlar, SYBR green boyası ile yapılan gerçek zamanlı PCR ve TaqMan gerçek zamanlı PCR yöntemleridir. Bu yöntemler, *Francisella tularensis*'in hızlı ve doğru bir şekilde tespitini sağlar, hastalığın kontrolü ve tedavisi açısından büyük önem taşır (42).

Tedavi ve korunma

Klinik iyileşmenin hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak, tulareminin relapslarını engellemek ve komplikasyonlarını azaltmak için tedavi edilmesi önerilmektedir. Tedavinin başarısını artırmak için antibiyotik tedavisine derhal başlanmalıdır (43).

Francisella tularensis'e karşı en etkili kabul edilen antibiyotikler arasında streptomisin (kas içi veya damar içi), gentamisin (damar içi), doksisiklin, tetrasiklin ve siprofloksasin yer alır. Bu ilaçlar, hastalığın etkili bir şekilde tedavi edilmesine ve ciddi komplikasyonları

önlemeye yardımcı olabilir (9). Son zamanlarda yapılan hayvan çalışmaları, levofloksasinin tularemide iyi sonuçlar gösterdiğini öne sürmektedir (43).

Streptomisin ve gentamisin, protein sentezi inhibitörleri olan aminoglikozid sınıfı antibiyotiklerdir ve bakterisidal etkiye sahiptirler. Doksisiklin ve tetrasiklin ise protein sentezini inhibe ederek çalışırlar ve bakteriyostatik etkiye sahiptirler (44).

Florokinolon sınıfına ait olan siprofloksasin ve levofloksasin, DNA giraz üzerinde etki ederek nükleik asit sentezini inhibe ederler ve her ikisi de bakterisidal etkiye sahiptirler. Bu antibiyotiklerin, *Francisella tularensis*'in etkili bir şekilde kontrol edilmesi için tedavi seçenekleri olarak değerlendirilmesi gerekebilir. Ancak, insanlarda kullanımlarıyla ilgili daha fazla klinik çalışma gerekmektedir (44).

Bazı araştırmacılar, *Francisella tularensis*'e karşı yeni antimikrobiyaller geliştirmektedir. Geliştirilmekte ve test edilmekte olan antimikrobiyal peptitler, *Francisella tularensis*'in plazma zarını depolarize eder ve aynı zamanda patojen ve konakçıya yönelik ek etkilere sahip olan antimikrobiyal peptitlerdir (45). Ayrıca N-benzil aminometil spektinomisinler ve arsinotrisin gibi yeni antimikrobiyal geliştirilmiş ve potansiyel olarak tularemi için ek terapötik seçenekler sunulmuştur. Bu yeni antimikrobiyal ajanlar, tularemi hastalığının etkili tedavisi için umut vadeden alternatifler olarak görülmektedir. Ancak, bu potansiyel terapötik ajanların klinik çalışmalarda ve insanlarda etkili olup olmadığını belirlemek için daha fazla araştırma ve test gerekmektedir (46).

Francisella tularensis kontamine sulardan, enfekte hayvanlardan, yiyeceklerden ve kene, sivrisinek gibi vektörlerden bulaşabilir. Ayrıca, dış ortamda uzun süre yaşayabilirler. Bu nedenle, şüpheli sulardan kaynaklanabilecek enfeksiyon riskini azaltmak için sular kaynatılmalı ve klorlanmalıdır. Bu patojenin insandan insana bulaşı bildirilmemiştir. Ancak, endemik bölgelerde yetişen sebzeler ve meyveler, enfekte olmuş sulardan veya enfekte hayvanlar tarafından kontamine olduğunda potansiyel bir risk oluşturabilir. Bu nedenle, bu tür yiyeceklerin yıkanması önemlidir ve gıda güvenliği sağlanmalıdır. Ayrıca, tavşan gibi kemirgenlerle temas edilirken su geçirmez eldivenlerin kullanılması ve bu hayvanların etinin tüketilmeden önce iyice pişirilmesi önemlidir. Bu önlemler, *Francisella tularensis*'in insanlara bulaşma riskini azaltmaya ve tularemi hastalığının yayılmasını önlemeye yardımcı olabilir (47, 48).

RICKETTSIA SPP.

Tarihçe

Rickettsia spp. ilk olarak 1909'da Ricketts tarafından tanımlanmıştır. Hem omurgalı hem de artropod konakçılarda yaşayabilen zorunlu hücre içi bakterilerdir. Klinik semptomlar ve antijenik özelliklere dayalı olarak, riketsiyalar genellikle benekli ateş grubu (SFG), tifüs grubu (TG), geçiş grubu (TRG) ve ata grubu (AG) olmak üzere dört gruba ayrılır. Bilinen türlerin çoğu SFG'ye ait olmakla beraber, yapılan çalışmaların çoğu TG ve SFG üzerinde odaklanmıştır (49).

Sınıflandırma, tarihsel olarak hücre içi lokalizasyonun fizyolojik özelliklerine, optimal büyüme sıcaklığına ve enfekte bir hastadan alınan serumun üç *Proteus* suşunun somatik antijenleriyle çapraz reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu sınıflandırma, riketsiya türlerinin çeşitli özelliklerini anlamak ve farklı gruplar arasındaki ilişkileri belirlemek için kullanılmıştır (50). Ancak günümüzde riketsiyanın tanımlanması ve sınıflandırılması genetik dizilerin detaylı incelenmesine dayanmaktadır. Özellikle, 16S rRNA gen sekansları üzerinde yapılan çalışmalar, *Rickettsia* cinsinin *Proteobacteria* alt sınıfının birinci grubuna ait olduğunu ortaya koymuştur. Genetik dizilimlerin analizi, *Rickettsia* türlerinin birbirleriyle olan ilişkilerini belirlemede ve bu organizmaların evrimini anlamada kritik bir role sahiptir (51).

Rickettsia cinsinin üyelerinde 16S rRNA geninin dizilişindeki yüksek düzeyde benzerlik (%97,2) tür içi ayrımını engellemektedir. Ancak, sitrat sentaz (gltA) geni ile dış yüzey proteinlerini ve yüzey hücre antijenlerini kodlayan genler (ompA, ompB, sca1, sca2 ve sca4) gibi diğer genler, *Rickettsia* türleri arasında güvenilir filogenetik ilişkileri ortaya çıkarmak için yeterli bulunmuştur. Özellikle bu genlerin moleküler analizi riketsiyanın taksonomisi ve evrimi hakkında daha derinlemesine bir bilgi sağlar. Bu da hastalık etiyolojisi, epidemiyoloji ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir (52).

Mikrobiyolojik özellik

Riketsiya küçük boyutlu (0,3–0,5 x 0,8–2,0 mm), Gram negatif, basil şeklinde, hareketsiz, zorunlu hücre içi bakterilerdir. Bu bakteriler, -70 °C'ye kadar olan düşük sıcaklıklarda dahi canlılıklarını koruyabilirler; ancak yüksek sıcaklığa, kuruluğa, ultraviyole ışığa, formaldehit ve alkol gibi dezenfektanlara dayanıklı değillerdir (53).

Bu bakterilerin doğadaki yaşam döngüsü memeli konakçılar ve hematofaj artropod vektörler arasında gerçekleşir. Vektör, etkeni konakçıları ısırma yoluyla bulaştırır. Bu vektörler arasında keneler, akarlar, pireler ve bitler gibi kan emici organizmalar bulunmaktadır (53).

Riketsiyanın dış zarı oldukça immünojenik olan lipopolisakkaritlerden oluşur. Bu lipopolisakkaritler immünolojik reaksiyonlara yol açar. Bu reaksiyon baz alınarak antikor tespiti için serolojik testler yapılır. Bu serolojik testlerden biri de Weil-Felix testidir (54).

Riketsiya, konak hücrenin sitozolünde bulunur ve burada metabolik faaliyetlerini sürdürür. Bu bakteriler, yaşamını sürdürmek için gerekli olan enerjiyi konak hücresinin adenosin trifosfat (ATP), amino asitler ve fosforile şekerler gibi temel metabolik bileşenlerini kullanarak üretir. Bu adaptasyon, riketsiyanın zorunlu hücre içi yaşam döngüsünün bir parçası olarak konak hücre içinde hayatta kalmasını sağlar (53).

Riketsiyal organizmalar cilt yüzeyinden vücuda girmesiyle, dendritik hücreler tarafından fagositize edilir ve lenfatik sistem aracılığıyla lokal lenf düğümlerine taşınır. Daha sonra kan dolaşımına girerler ve damar endotelini enfekte etmek için yayılırlar. Bu enfeksiyon, vasküler hasara ve geçirgenliğin artmasına yol açar. Vasküler geçirgenliğin artması sızıntıya neden olur. Bu durum döküntü gibi cilt belirtilerine neden olur. Şiddetli durumlarda interstisyel pnömoni, meningoensefalit, akut böbrek hasarı, çoklu organ yetmezliği ve hatta ölüm gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Bu belirtiler riketsiya enfeksiyonunun ciddiyetine ve yaygınlığına bağlı olarak değişebilir ve tedavi edilmezse hayati tehlike oluşturabilir (55).

Taksonomi

- Şube: *Proteobacteria*
- Sınıf*: Alphaproteobacteria*
- Takım*: Rickettsiales*
- Aile: *Rickettsiaceae*
- Cins: *Rickettsia*

Epidemiyoloji

Riketsiyal organizmalar yaygın olarak dünyanın birçok bölgesinde bulunurlar. Ancak, bu organizmaların Antarktika kıtasında bulunmadığı bilinmektedir. Riketsiyal organizmalar, genellikle sıcak ve nemli ortamları tercih ederler ve bu nedenle Antarktika gibi aşırı soğuk bölgelerde bulunmaları beklenmez. Çoğu riketsiya türleri iklim koşulları, vektör ve doğal

konakçı kısıtlamaları nedeniyle bölgeseldir. Bununla birlikte, *Rickettsia felis* ve *Rickettsia typhi* gibi küresel olarak dağılan riketsiya türleri vardır (56, 57).

TG, sırasıyla enfekte pire ve bitlerin dışkısı aracılığıyla bulaşan iki türden oluşur: *R. typhi* ve *R. prowazekii*. Bitler saçlı deri üzerinde kan emerken, bu bakterileri deriye bırakır ve konakçının kaşınması sonucu deride mikro travmalar oluşur. Bu mikro travmalar, enfeksiyonun yayılmasına ve hastalığın gelişmesine katkıda bulunabilir (58-60). TG *Rickettsia spp.* havada yüzen toz partiküllerinin inhalasyon yoluyla enfeksiyona neden olabilir (61).

SFG kene ısırıkları aracılığıyla bulaşan patojenleri içerir. Önemli SFG üyeleri arasında *R. rickettsii, R. conorii* ve *R. parkeri* bulunmaktadır. Bu türler, kene ısırıklarıyla temas eden insanlarda enfeksiyonlara neden olabilir ve ciddi hastalık semptomlarına yol açabilirler (58-60).

TRG çeşitli vektörler aracılığıyla bulaşan patojenleri içerir. Örneğin, *R. felis* pireler aracılığıyla, *R. australis* kene ısırıkları aracılığıyla ve *R. akari* akarlar aracılığıyla bulaşır. Bu türler, enfekte vektörlerin insanlarla teması sonucu hastalığa neden olabilir ve çeşitli semptomlara yol açabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda sivrisineklerde *R. felis* izole edilmiştir. Böylece riketsiyal vektörler ve konakçılara bulaşma konusundaki anlayışı değişmiştir. Bu bulgu, *Rickettsia spp.*'nin farklı vektörler aracılığıyla insanlara bulaşabileceğini göstermektedir (62).

AG, diğer gruplarda bulunan türlerle karşılaştırıldığında genellikle patojenik olmayan *Rickettsia* türlerini içerir. Örnek olarak, *R. bellii* ve *R. canadensis* gibi türler sayılabilir. Bununla birlikte, AG'ye ait olan bazı türlerin patojeniteye sahip olup olmadığı henüz tam olarak anlaşılmamıştır ve diğer gruplardaki *Rickettsia* türlerine kıyasla daha az araştırılmıştır. Bu nedenle, AG'ye ait olan türlerin enfeksiyon potansiyeli ve klinik önemi hakkında daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Tablo1)(58, 63).

Konjonktivanın riketsiyal enfeksiyonu nadir görülen bir durumdur. Bu enfeksiyon, genellikle ezilmiş kene ile kontamine olmuş parmaklar yoluyla gerçekleşir (64).

Tablo 1: Riketsiyanın gruplandırılması (65)

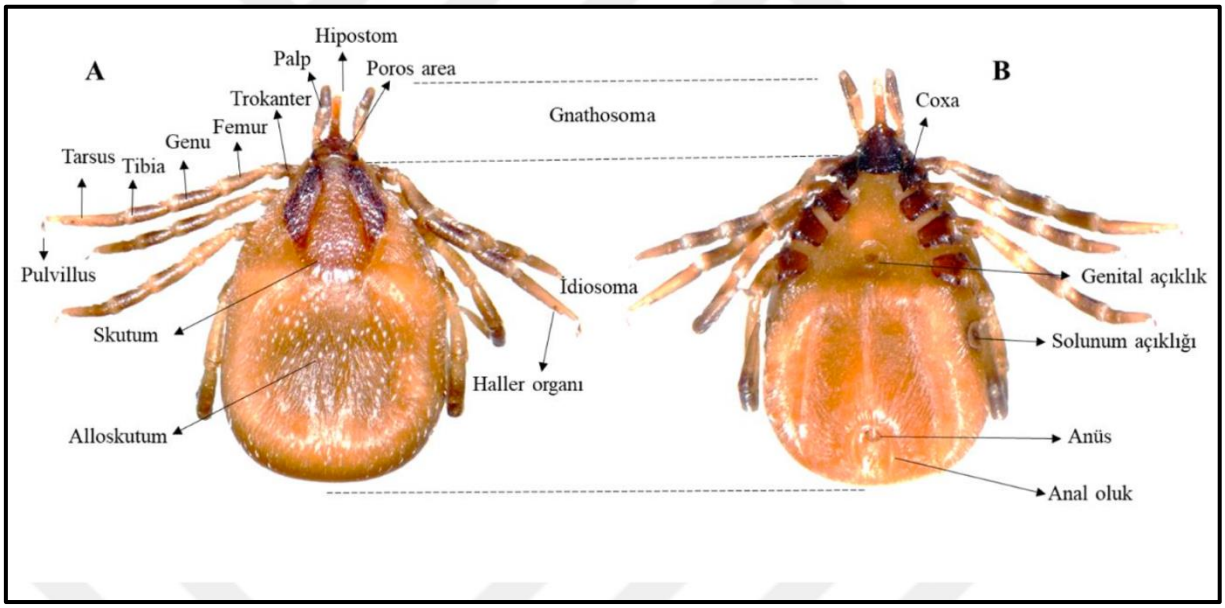
Grup	Tür	Hastalık	Vektör
Benekli Ateş Grubu	*Rickettsia rickettsii*	Kayalık Dağları Benekli Ateşi	Kene
	Rickettsia conori	Akdeniz Benekli Ateş	Kene
	Rickettsia parkeri	*Rickettsia parkeri* riketsiosis	Kene
	Rickettsia philipii	Pasifik Kıyısı Kene Isırığı	Kene
	Rickettsia africae	Afrika Kene Isırığı Ateşi	Kene
	Rickettsia japonica	Benekli Ateş	Kene
	Rickettsia heilongjangensis	Benekli Ateş	Kene
	Rickettsia honei	Benekli Ateş	Kene
	Rickettsia amblyyommatis	Benekli Ateş	Kene
Tifüs Grubu	*Rickettsia prowazekii*	Epidemik Tifüs	Bit
	Rickettsia typhi	Endemik Tifüs	Pire
Geçiş Grubu	*Rickettsia felis*	Benekli Ateş	Pire
	Rickettsia akari	Rickettsialpox	Akar
Ata Grubu	*Rickettsia bellii*	Nonpatojenik	Kene
	Rickettsia canadensis	Nonpatojenik	Kene

Artropod vektörleri

Riketsiya enfekte eklembacaklı vektörlerin insanlara doğrudan teması sonucunda bulaşabilir. Bu vektörler genellikle pireler, bitler, akarlar ve keneler gibi çeşitli eklembacaklılar olabilir. Enfekte bir vektörün ısırığı sırasında riketsiya bakterileri insanın derisine veya kan dolaşımına geçebilir ve enfeksiyona neden olabilir. Ayrıca, bir kişiye rastlantısal da bulaşabilir. Örneğin, bir kişinin enfekte bir eklembacaklının bulaşıcı sıvılarıyla veya dışkısıyla kontamine olmuş deriyi kaşıması sonucunda bulaşabilir. Bu durumda, riketsiya doğrudan deri yoluyla vücuda girebilir ve enfeksiyon oluşabilir. Bunun dışında, bakterilerin solunması veya konjonktivanın (göz yüzeyinin) enfeksiyöz materyalle teması gibi daha nadir durumlarda da riketsiyal patojenler bulaşabilir. Bu durumlar genellikle laboratuvar çalışmaları sırasında temas sonucu gerçekleşebilir (65, 66).

Keneler

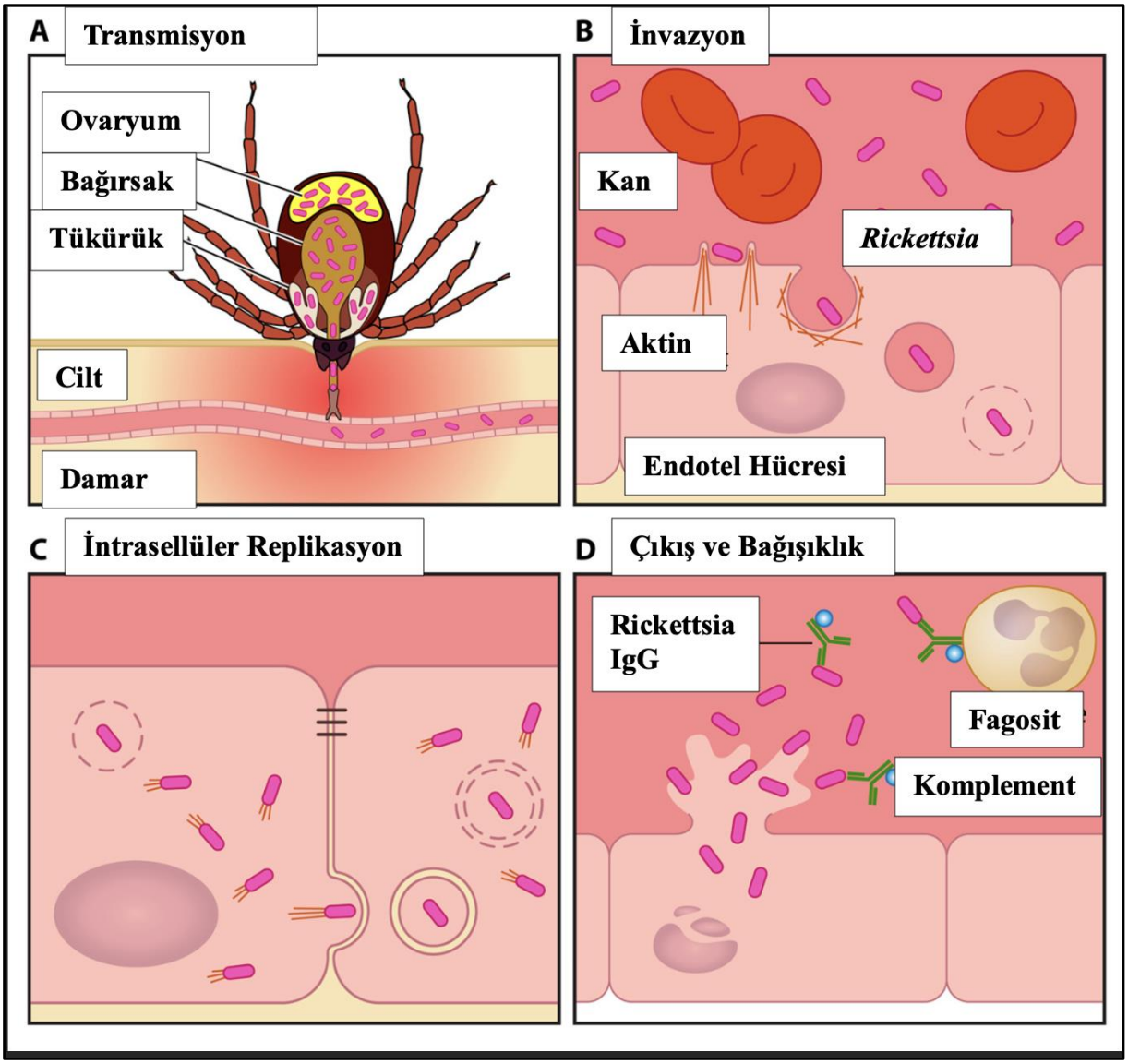
Kenelerin vücutları tek bir parça halindedir; caput, thorax ve abdomen tamamen birleşmiştir. Ixodidae familyasına ait kenelerin vücutları kitinden oluşan kutikula ile kaplıdır ve sert yapıdadır. Kenelerin baş kısmı gnathosoma olarak adlandırılır. Bu bölümde ağız parçaları (rostellum), bir çift pedipalp (palp), bir çift keliser, keliser kılıfı ve delmeye ve kan emmeye yarayan hipostom bulunur. Bu yapılar basis capituli üzerine oturur ve capitulum olarak bilinir. Kenelerin vücudunun diğer kısmı idiosoma olarak adlandırılır ve göğüs ile karın bölgesinin birleşiminden oluşur. Bacaklar idiosoma üzerindedir. Ergin ve nimf kenelerde dört çift, larvalarda ise üç çift bacak bulunur. Kenelerin stereo mikroskopla sınıflandırılmasında bacak sayısı, hipostomun boyutu ve şekli, vücut yapısı (sert veya yumuşak kene olup olmaması) gibi özelliklere dikkat edilir. Bu özelliklerin incelenmesi, kenelerin türlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Şekil 9)(67).



Şekil 9: Dişi sert kene (67).

Enfekte keneler kanla beslenirken tükürük yoluyla, dermise ve küçük kılcal damarlara riketsiyayı bulaştırarak enfeksiyon oluşumuna katkıda bulunur. Bu süreç, enfekte kenelerin temas ettiği bölgede çeşitli düzeylerde lokal inflamasyona ve hücresel sızıntılara yol açarak enfeksiyonun başlamasına neden olur (65).

Kenenin ciltte kalma süresi ve kene tükürüğündeki bakteri miktarı bakterinin bulaşma riskini artırmaktadır. Kene tükürüğü, konak organizmanın hemostazını ve immün savunma mekanizmalarını etkileyen çeşitli ajanlar içermektedir. Bu ajanlar özellikle kene tutunmasını ve kanla beslenmeyi kolaylaştırmanın yanı sıra, riketsiya gibi kene kaynaklı birçok patojenin daha fazla bulaşmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 10) (67).



Şekil 10: Vektör olan kenenin ısırma yoluyla etkeni bulaştırması (67)**.**

Klinik

Riketsiyal enfeksiyonlar, genellikle eklembacaklıların ısırığıyla başlar ve bir inkübasyon dönemi sonrasında klinik semptomlar ile ortaya çıkar. İnkübasyon dönemi, enfekte edici organizmanın vücuda girdikten sonra belirli bir süre içinde çoğalması ve semptomların ortaya çıkması için geçen zamanı ifade eder. Riketsiyal enfeksiyonların inkübasyon süresi genellikle 15 güne kadar uzar (68).

SFG riketsiyal enfeksiyonları hafif semptomlarla seyredebileceği gibi yaşamı tehdit edici boyutlara da ulaşabilir. Bu etkenle enfekte hastalar ateş, bulantı, kusma, makülopapüler döküntüler ve bazen enfeksiyonun başladığı yerde yani ısırık bölgesinde eskar (kuru veya kabuklu yaralar) gibi belirtilerle başvurabilirler (69).

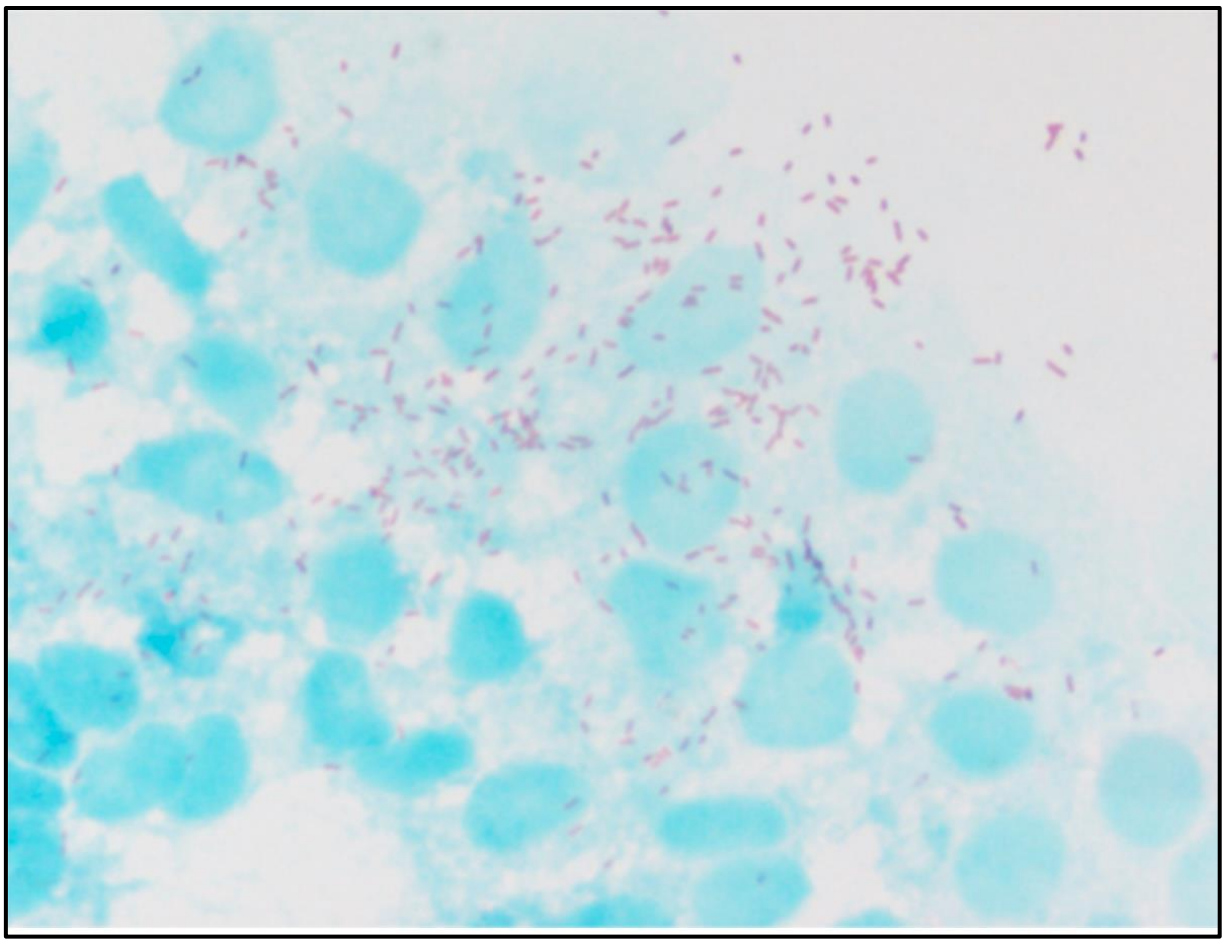
Riketsiyal hastalığın şiddetini etkileyen faktörler altta yatan konak hastalığı ve artan oksidatif strestir (70). Riketsiyal enfeksiyonun ana patolojilerinden biri küçük ve orta kan damarlarının endotel hücre bağlantılarını bozan bakteri yükü ve tümör nekroz faktörüne bağlı artan vasküler geçirgenliktir (71). Lokalize riketsiyal enfeksiyon, artropod temas bölgesinde bir eskar olarak ortaya çıkabilir. Bu enfeksiyonun lokal kontrolü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (72). Bununla birlikte yayılmış enfeksiyon ciddi vaskülit, kutanöz nekroz, pnömoni, meningoensefalit ve çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanabilir (73). Diğer ateşli hastalıklarla ortak ve spesifik olmayan semptomlar nedeniyle yanlış teşhis konulabilir. Riketsiyal enfeksiyonda spesifik olarak, ısırık bölgesi çevresinde bir eskar ve döküntü vardır. Ayrıca eskarsız ve döküntü yapmayan riketsiyozlar da meydana gelebilir. Bu yüzden, endemik olduğu bilinen bölgelerde meydana gelen ateşli hastalıklar için riketsiyal enfeksiyonlar düşünülmelidir (74).

Riketsiyal hastalık tarihsel olarak erkeklerde ve ileri yaş gruplarında daha yüksek oranlarla ilişkilendirilmiştir. Önceleri riketsiyal hastalık tarım ve ormancılık gibi dış mekânlarda çalışan erkeklerde ve yaşlı yetişkinlerde daha yaygın olarak görülmüştür. Bunun nedenleri arasında erkeklerin daha fazla açık havada çalışması ve yaşlı yetişkinlerin bağışıklık sistemlerinin zayıflamasıyla ilgili faktörler olabilir. Ancak son yıllarda yapılan epidemiyolojik araştırmalar cinsiyet veya yaş grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Bu bulgular riketsiyal hastalığın herkesi etkileyebileceğini ve risk faktörlerinin cinsiyet veya yaşla sınırlı olmadığını vurgular (75, 76).

Tanı

Kültür ve Boyanma

Riketsiya saptanması için günümüzde kullanılan boyalar arasında Giemsa, Giff-Quik, Gimenez, Macchiavello, Castaneda ve akridin turuncusu boyaları bulunmaktadır. Bu boyalardan en sık tercih edileni Gimenez boyasıdır (Şekil 11) (77)**.**



Şekil 11: Rhipicephalus sanguineus türü yetişkin kenelerin kanından *Rickettsia conorii*'nin tespiti için Gimenez boyama yöntemi kullanılmıştır (100x büyütme) (78).

En güvenilir tanı yöntemi patojenin kan, beyin omurilik sıvısı veya deri lezyonundan izole edilmesidir. *Rickettsia spp.*, yapay kültür besiyerlerinde üreyememekle birlikte ökaryotik konakçı hücrelerin sitoplazmasında çoğalabilir. Dolayısıyla doku veya embriyo kültüründe üretilebilirler (79). Ancak, bu yöntem uygulanabilir olmasına rağmen oldukça zahmetlidir.

Hücre kültürü yapabilen ve biyogüvenlik seviyesi 3 koşullarına uygun olan laboratuvarlar sınırlıdır (80).

Seroloji

Riketsiya tanısında kullanılan antijen tespit yöntemleri temel olarak direkt immünfloresan antikor testi ve indirekt immünfloresan antikor testine dayanmaktadır. Bu analizler monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanarak SFG, TG ve TRG antijenlerini tespit eder (81).

Riketsiyal enfeksiyonun göstergesi olarak spesifik ve spesifik olmayan antikorların saptanması, riketsiyal hastalıkların tanısında eski ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Weil-Felix testi, riketsiyal hastalıkların tanısında kullanılan en eski testlerden biridir. Weil-Felix testi, tanı için düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmasına rağmen ucuz, uygulanması kolay ve kolaylıkla erişilebilir olması nedeniyle eskiden dünya çapında yaygın olarak kullanılmıştır. Bu test, SFG, TG ve TRG antikorlarının *Proteus spp*.'nin antijenik epitoplarına karşı çapraz reaksiyonuna dayanır. Özellikle *P. vulgaris* OX-2, *P. vulgaris* OX-19 ve *P. mirabilis* OX-K SFG, TG ve TRG serumlarıyla reaksiyona girer (81, 82).

Kompleman fiksasyon testi, tanıda kullanılan eski serolojik testlerden bir diğeridir. Bu test, serum antikorlarının bilinen antijenlerle etkileşimine dayanır; bu etkileşim reaksiyonda kompleman tamamlayıcı miktarıyla orantılıdır. Riketsiyal hastalıkların tanısında kompleman fiksasyonunun kullanımı için, SFG ve TG içindeki antijenlerin özgüllüğü gözlemlenmiştir, ancak iki grup arasında çapraz reaksiyonlar mevcuttur (83).

IFA (İndirekt İmmünfloresan Antikor Testi), hasta numunelerinde gruba özgü IgM ve/veya IgG antikorlarını tespit etmektedir. Antikorların IFA kullanılarak saptanması genellikle SFG için veya TG enfeksiyonunu takiben semptomların ortaya çıkmasından sonraki 7-15 gün içinde gerçekleşir. IFA'nın duyarlılığı/özgüllüğünün Kayalık Dağları benekli ateşinin saptanması için %84,6-100 ve Akdeniz benekli ateşinin saptanması için %46-100 olduğu bildirilmiştir (84).

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) riketsiyal gruba özgü IgM, IgG veya her ikisini birden tespit edebilen başka bir serolojik testtir. ELISA'nın avantajları aynı anda birden fazla serum örneklerinin taranabilmesi, düşük maliyeti, teknik kolaylığı, tekrarlanabilir sonuçları ve objektif tahlil imkânıdır. Araştırmalar ELISA'nın IFA ile karşılaştırıldığında düşük

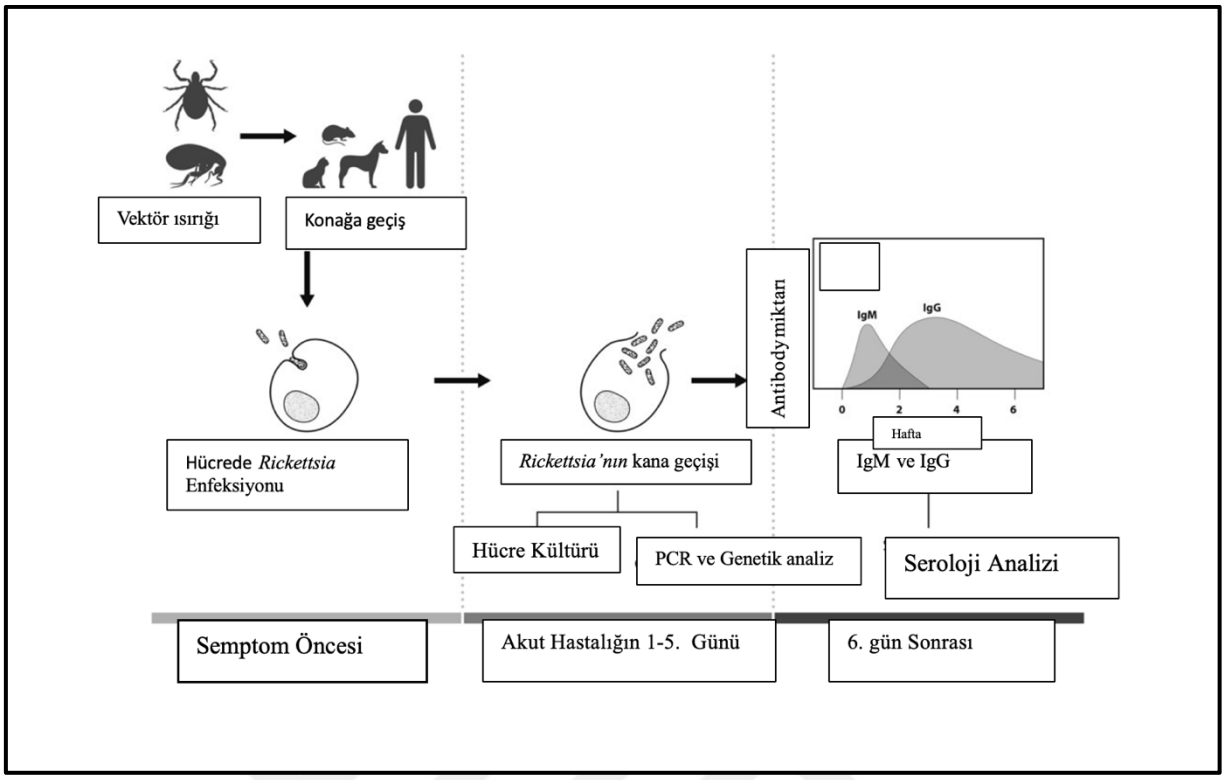
antikor seviyelerini tespit etmede daha etkili olduğunu göstermektedir. Ancak diğer serolojik analizlerde olduğu gibi ELISA da riketsiyal enfeksiyonları tür düzeyinde ayırt edemez (85).

Western blot, enfeksiyona neden olan ajanın daha spesifik olarak tanımlanması sağlamaktadır. Fakat bu yöntem sadece bazı referans laboratuvarlarında mevcuttur. *Rickettsia* türleri için serolojik testler genellikle hastalığın 7-10 gününden sonra pozitife döner. Fakat *R. africae* gibi bazı türler için 25 gün veya daha uzun sürede pozitifleşebilir (Şekil 12)(86, 87).

Moleküler yöntemler

Riketsiyayı tespit etmek için yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler konvansiyonel PCR, nested PCR (nPCR), kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) ve döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) analizleridir. Ek olarak, riketsiyayı tespit etme yöntemleri arasında kısıtlama enzimi parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) analizi, multilokus dizilim tiplemesi (MLST/MLSA), çok aralıklı tipleme (MST) ve tüm genom dizilimi bulunmaktadır (80).

PCR tanıda kullanılabilir, fakat sonuçların doğruluğu gönderilen örneklerin tipine ve zamanlamasına büyük ölçüde bağlıdır. Eskar varsa, türe özgü bir teşhis sağlamak için lezyondan sürüntü veya biyopsi örneği alarak PCR yapılabilir. Benzer şekilde, döküntü lezyonlarının biyopsi örneklerinden veya tam kan örneklerinden PCR yapılabilir. Fakat genellikle eskardan alınan örneklerden daha az duyarlıdır (66).



Şekil 12: Riketsiyal enfeksiyonun bulaş zamanına göre yapılabilecek tanı testleri (88).

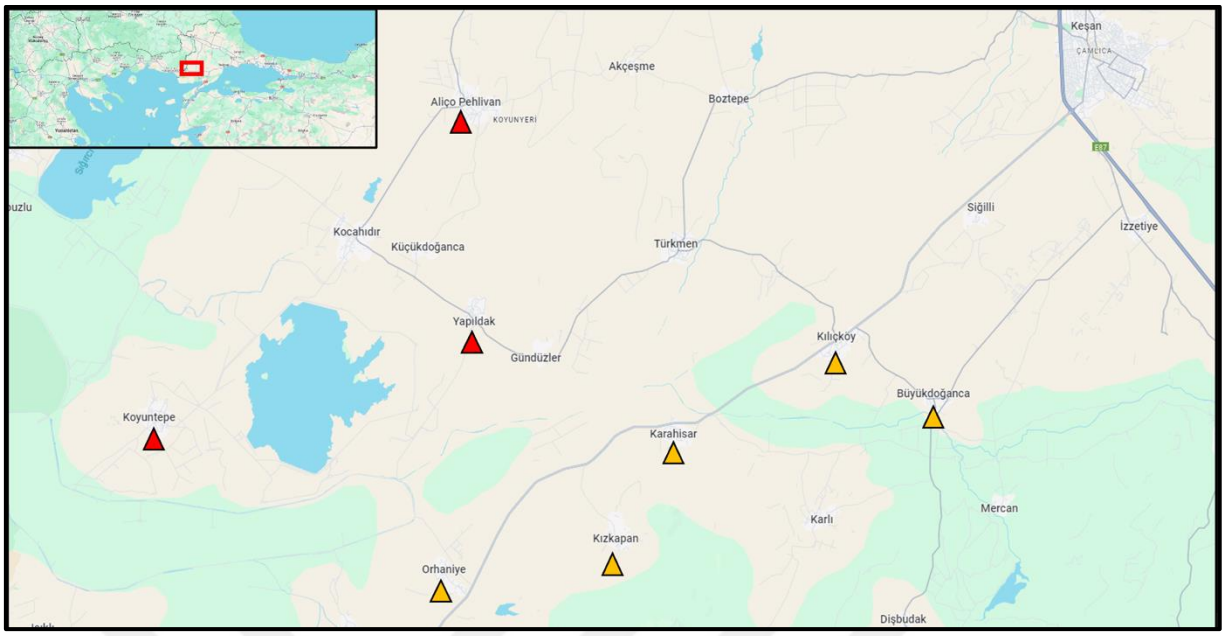
Tedavi

Bazı riketsiyozlar hızla ciddi hastalığa ilerleyebildiğinden klinisyenler enfeksiyondan şüphelenildiği anda tedaviye başlamalı ve test sonuçları almak için beklememelidir. Her yaş hasta için tetrasiklin (en yaygın olarak doksisiklin) ile acil ampirik tedavi önerilir. Sınırlı klinik deneyim *R. africae* enfeksiyonunda, hamile veya doksisiklin intoleransı olan hastalarda rifampisinin tedaviye yanıt verdiğini göstermiştir (66).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu TÜTF-GOBAEK 17.10.2022 tarih ve 20/04 karar numarası ile etik onay vermiştir (Ek-1). Çalışmanın deneysel aşamaları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda, Edirne Keşan köyleri olan Karahisar, Kılıçköy, Kızkapan, Orhaniye, Büyükdoğanca ve İpsala köyleri olan Yapıldak, Koyuntepe, Aliçopehlivan köylerinde merada otlanan ahır hayvanlarının üzerinden kene toplanmıştır (Şekil 13). Köy seçimi çeltik tarlası olmasına göre seçilmiştir. Toplanan keneler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilerek çalışılmıştır.



Şekil 13: Kenelerin toplandığı köyler

▲: Edirne-Keşan'a bağlı köyler: Karahisar, Kılıçköy, Kızkapan, Orhaniye, Büyükdoğanca.

▲: Edirne-İpsala'ya bağlı köyler: Yapıldak, Koyuntepe, Aliçopehlivan.

ÇALIŞMA AKIŞI

1. Kenelerin toplanması
2. Kenelerin morfolojik olarak sınıflandırılması
3. Kene dokularınının homojenize edilmesi
4. Homojenize edilen dokudan DNA ekstraksiyonu yapılması
5. Elde edilen DNA'ların PCR ile analizi
6. Pozitif bulunan dokuların sekans analizinin yapılması

Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Hassas terazi (Kern EMB600-2, Almanya)
2. Mikrosantifüj cihazı (Hettich Micro, Almanya)
3. Isı bloğu (Thermo Scientific, ABD)
4. Vorteks cihazı (Combi-Spin FVL-2400N, Letonya)
5. Mikrodalga fırın (Arçelik MD500, Türkiye)

6. Yatay elektroforez cihazı (Thermo scientific OWL EASYCAST B2, ABD)
7. Ultraviyole lamba ve görüntüleme cihazı (BioRad, Almanya)
8. Derin dondurucu ve soğutucu (Bosch, Almanya)
9. Termal döngü cihazı (BioRad iCycler, ABD)
10. Termal döngü cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q, Almanya)
11. Güç kaynağı (Thermo Scientific EC 300 XL, ABD)
12. Etüv (Nüve EN500, Türkiye)
13. DensiCHEK Plus turbidimetre (bioMérieux, Fransa)
14. Derin dondurucu (Nüve DF 490, Türkiye)

1. Kenelerin toplanması

Haziran ve Eylül 2023 aylarında belirlenen köylerde, merada gezen hayvanların üzerindeki keneler pensle toplanarak içerisinde %96'lık alkol bulunan temiz kutulara konuldu. Her ahırın kendine ait temiz kutusu olduğu için, farklı ahırlardaki keneler birbirine karışmadı. Kenelerin toplanması sırasında kene bütünlüğünün bozulmamasına ve yeni beslenmemesine özen gösterildi. Bütünlüğü bozulmuş ve yeni beslenmiş keneler çalışmaya dahil edilmedi. Toplamda 540 kene toplandı. Toplanan keneler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaştırıldı. Burada, kenelerin incelenmesi ve analiz edilmesi için gerekli laboratuvar çalışmaları yapıldı.

2. Kenelerin morfolojik olarak sınıflandırılması

Keneler, toplandıktan sonra Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına getirildi. Toplanan kenelerin morfolojik sınıflandırma için Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi hocası Prof. Dr. Levent Aydın'nın yardımlarıyla stereo mikroskop kullanıldı.

3. Kene dokularınının homojenize edilmesi

Kenelerden DNA ekstraksiyonu için havuzlama yöntemi kullanıldı. Her bir havuzda 10 kene bulunmaktadır ve toplamda 54 grup oluşturuldu. Her bir kene, bistüri ile ikiye bölünerek bir yarısı numaralandırıldı ve -20 °C'de saklandı (Şekil 14-15). Diğer yarısı ise eppendorf tüplerine konuldu. Her bir eppendorf tüpüne 1.0 mm ve 1.4 mm boyutlarında beadslardan 5'er adet eklendi. Eppendorf tüpleri -150 °C'de 5 dakika bekletildi ve ardından tissue lyser cihazında

maksimum hızda 5 dakika süreyle parçalandı (Şekil 16). Homojenliği artırmak için bu işlem iki kez tekrarlandı. Keneler homojen hale geldikten sonra DNA ekstraksiyon işlemine başlandı.



Şekil 14: Merada otlanan hayvanlar üzerinden topladığımız keneler



Şekil 15: Merada otlanan hayvanlar üzerinden topladığımız 10 kenenin ikiye bölünmüş hali.



Şekil 16: İki farklı grubun homojenize edildikten sonraki görüntüleri.

4.Homojenize edilen dokudan DNA ekstraksiyon yapılması

Homojenize edilen dokulardan DNA ekstraksiyonu, ticari kit talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Her bir havuzda bulunan 10 keneden elde edilen DNA'lar, PCR yapılıncaya

kadar -20 °C’de saklandı. DNA izolasyonunda Genematrıx Tıssue & Bacterıal DNA Purification Kiti kullanıldı.

1. Spin kolonunda 40 µl aktivasyon BufferT eklendi.
2. Homojen hale getirdiğimiz dokunun dibe çökmesi için santrifüj edildi.
3. Eppendorfa 350 µl Lyse T tamponu eklendi ve iyice süspanse edildi.
4. Süspansiyona 2 µl RNase ve 20 µl of proteinase K eklendi, tüp vortekslenerek karıştırıldı.
5. Doku tamamen parçalanana kadar (en az 1-3 saat) 56 °C'de inkübe edildi. Her 15-30 dakikada bir vortekslenerek karıştırıldı.
6. 350 µl tampon eklendi.
7. 70 °C’de 10 dakika inkübe edildi.
8. 350 µl %96 etanol eklendi.
9. Tüp vortekslendi.
10. 1 dakika 12000 rpm’de santrifüjlendi.
11. Bütün izolat spin kolunundan toplama tüpüne eklendi.
12. 1 dakika 12000 rpm’de santrifüjlendi.
13. Spin kolonunda kalan süpernatant toplama tüpüne yerleştirildi. 2 dakika 12000 rpm’de santrifüjlendi.
14. Spin kolonu çıkartıldı, biriken sıvı atıldı ve spin kolonu toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
15. Spin kolonuna 500 µl Wash TX1 tamponu eklendi.
16. 1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlendi.
17. Spin kolonu çıkarıldı, biriken sıvı atıldı ve spin kolonu toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
18. Spin kolonuna 500 µl Wash TX2 tamponu eklendi.
19. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi.
20. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne (1,5-2 ml) yerleştirildi.
21. Bağlı DNA'yı elute etmek için 70 °C'ye ısıtılmış 50-200 µl elüsyon tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eklendi.
22. Spin kolonu/toplama tüpü düzeneğini oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
23. 1 dakika 12000 rpm'de santrifüjlendi.

24. Spin kolonu atıldı, toplama tüpünün kapağı kapatılarak PCR yapılana kadar -20°C 'de saklandı.

5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):

PCR analizi için *Francisella tularensis* için tul4 geninin ve *Rickettsia spp*. için 23S rRNA, ompA, gltA genleri için primerler tasarlandı ve PCR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 3) (87). PCR ürünleri daha sonra agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldı ve jelle görselleştirildi.

Tablo 2. PCR analizi için tul4 ve 23S rRNA, ompA, gltA genlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemek üzere tasarlanan primerler (87).

Bakteri ismi	**Gen İsmi**	**Primerler**
Francisella tularensis	tul4	Tul4-435-F-GCTGTATCATCATTTAATAAACTGC Tul 4-863-R-TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT
Rickettsia spp.	23S rRNA	RCK-23-5-F-GATAGGTCRGRTGTGGAAGCAC RCK/23-5-R-TCGGGAYGGGATCGTGTGTTTC
Rickettsia spp.	ompA	Rr190.70p-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA Rr190.602n-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT
Rickettsia spp.	gltA	RpCS.877p-GGGGGCCTGCTCACGGCGG RpCS.1258n-ATTGCAAAAAGTACAGTGA

Dört gen için farklı PCR protokolü uygulandı.

Her bir PCR ürünü için kullanılan bileşenler ve miktarları

- Taq polimeraz 0.5 µl
- Taq buffer 2.5 ml
- $MgCl_2$ 1.5 ml

- dNTP 0.1 ml
- Forward primer 0.25 ml
- Reverse primer 0,25 ml
- Distile H_2O 17,9 ml
- Template 2 µl

A. 23S rRNA geni

1. 96 °C'de 5 dakikalık başlangıç denatürasyonu
2. 94 °C'de 1 dakika, 53°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika 35 döngü
3. 72 °C'de 5 dakikalık uzatma

Distile su negatif kontrol ve önceden belirlenmiş bir *Rickettsia conori* pozitif kontrol olarak kullanıldı.

B. ompA geni

1. 96 °C'de 3 dakikalık başlangıç denatürasyonu
2. 95 °C'de 20 saniye, 46°C'de 30 saniye ve 63°C'de 1 dakika boyunca 35 döngü
3. 72 °C'de 7 dakikalık son uzatma

Distile su negatif kontrol ve önceden belirlenmiş bir *Rickettsia conori* pozitif kontrol olarak kullanıldı.

C. gltA geni

1. 95 °C'de 50 saniye başlangıç denatürasyonu,
2. 94 °C'de 1 dakika, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye boyunca 35 döngü
3. 72 °C'de 5 dakikalık son uzatma

Distile su negatif kontrol ve önceden belirlenmiş bir *Rickettsia conori* pozitif kontrol olarak kullanıldı.

D. tul 4 geni

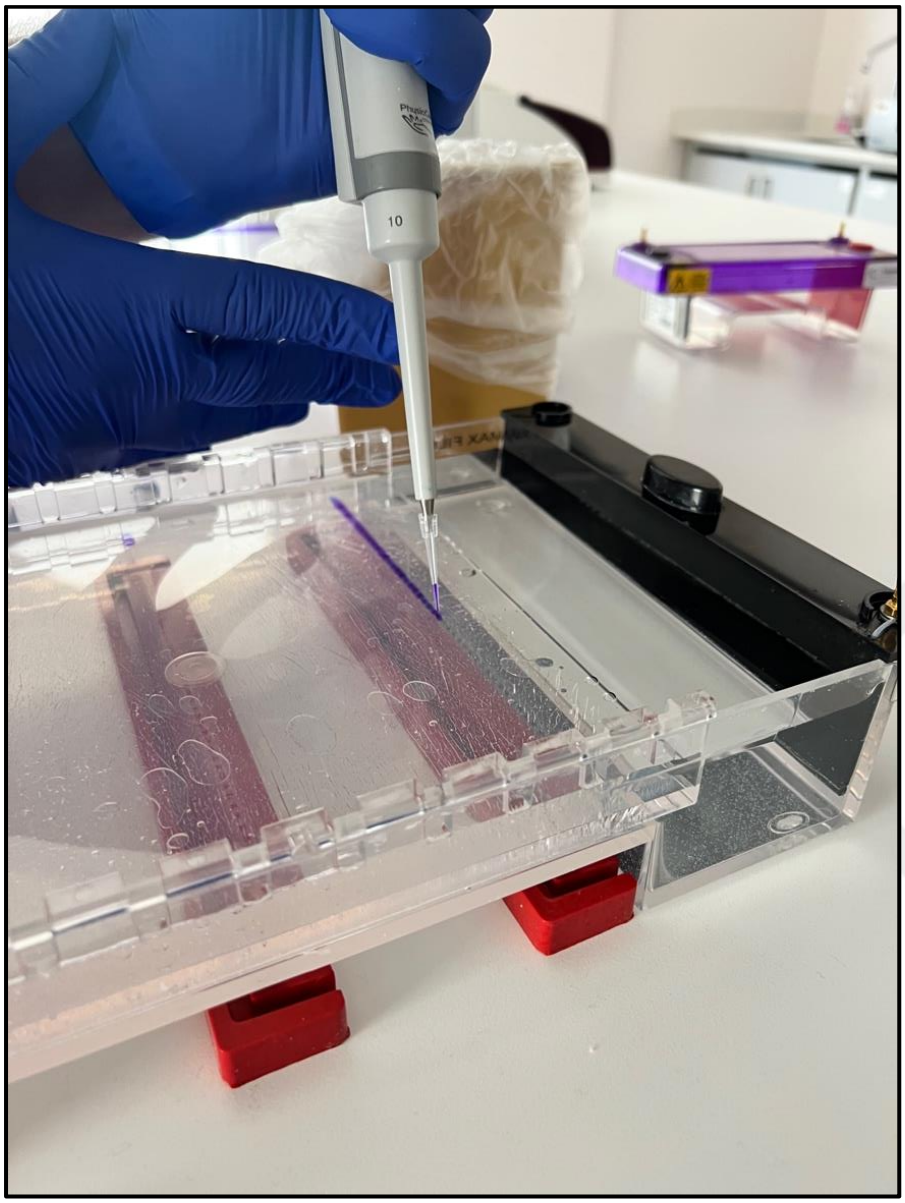
1. 95 °C'de 50 saniye başlangıç denatürasyon

2. 94 °C'de 1 dakika, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye boyunca 35 döngü
3. 72 °C'de 5 dakikalık uzatma

Distile su negatif kontrol ve önceden belirlenmiş bir *Francisella tularensis* pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Agaroz jel hazırlanması

1. 50x TAE, ultra saf su ile 1.5x haline getirildi.
2. 11.5x TAE 200 ml için hacmin %1'i agaroz olacak şekilde (2 gr) agaroz hassas terazide tartıldı.
3. Mikrodalga fırında en yüksek ısıda 30 saniye tutularak agarozun 1.5x TAE'de çözünmesi sağlandı.
4. Çözeltinin içerisine 3.5 ml SYBR Safe DNA Gel Stain eklenerek karıştırıldı.
5. Hazırlanan 100 ml lik jel yükleme kasetine döküldü. DNA'ların jelde yürütülebilmesi için 25'li (oluşacak her bir çukur 25 ml olacak şekilde) tarak yükleme tankına takıldı.
6. Donan kaset içinde 1.5x TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.
7. Tarakların oluşturduğu kuyulara her bir numunenin 5ml'si 1ml fenol blue ile karıştırılarak konuldu.
8. Kuyuların birinci sırasına 100 bp ladder konuldu.
9. Örnekler kuyucuklara pipetlenerek yerleştirildi ve 80 mAh'de 2 saat yürütüldü.
10. 2 saat sonunda jel görüntülenerek sonuçlar değerlendirildi.



Şekil 16: PCR'ı yapılan DNA ürününün jele yüklenme aşaması.

6-Pozitif bulunan dokuların sekans analizinin yapılması

Pozitif bulunan numuneler değerlendirildi. Farklı olan pozitifler, numuneler saflaştırılarak çift yönde sekans analizi yapılması için BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti. (Ankara, Türkiye) firmasına gönderildi.

Yapılan nükleotid sekansları, nükleotid Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi sitesi kullanıldı (89).

- PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, ticari kit prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır.

1. HighPrep^{TM} PCR'yi kullanımdan en az 30 dakika önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Manyetik boncukları süspanse etmek için HighPrep^{TM} PCR reaktifi iyice çalkalandı.
3. PCR reaksiyonunu uygun 96 kuyulu plakaya aktarıldı. 50 µl reaksiyon için steril su kullanarak hacmi ayarlandı.
4. PCR reaksiyonuna göre HighPrep^{TM} PCR reaktif eklendi. (PCR Reaction Volume (50µL)- HighPrep^{TM} PCR Volume at 1.8X (90uL)
5. HighPrep^{TM} PCR reaktifi ve PCR örneği 6-8 kez pipetlenerek karıştırıldı.
6. Karışımı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
7. Numune plakası 96 manyetik ayırma cihazına 3 dakika süreyle yerleştirildi. Boncuklar kuyunun kenarına çekildi.
8. Numune plakası hâlâ mıknatısın üzerindeyken, pipetleme yoluyla süpernatant atıldı.
9. Süpernatantı aspire ederken boncuklara dokunulmadı.
10. Numune plakası mıknatıs üzerindeyken, her bir kuyucuğa 200 µl %80 etanol eklendi ve 30 sn inkübe edildi.
11. Plaka hala mıknatısın üzerindeyken, pipetleme yoluyla süpernatantı atıldı.
12. İki kez %80 etanol yıkaması için 8-9 adımları tekrarlandı.
13. Plaka oda sıcaklığında 10-15 dakika boyunca plaka hâlâ manyetik ayırma cihazındayken inkübe edilerek boncuklar alınarak atıldı.
14. Numune plakası manyetik ayırma cihazından çıkarıldı. Her bir kuyucuğa 40 µl elüsyon tamponu (reaktif dereceli su, TRIS-HCl pH 8.0 veya TE tamponu) eklendi ve karıştırmak için 5 kez pipetlendi. Verimi artırmak için elüsyon tamponu önceden 55 °C'ye ısıtıldı.
15. Oda sıcaklığında 2 dakika süreyle inkübe edildi.

16. Numune plakası tekrar manyetik ayırma cihazına yerleştirildi ve 3 dakika veya manyetik boncuklar çözeltiden temizleninceye kadar beklendi.

17. Elüat (temizlenmiş süpernatant) sonraki uygulamalar için yeni bir plakaya aktarıldı.

- Sanger Dizileme örnekleri çin, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanıldı (Applied Biosystems, Foster City, CA).

1. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti ve tasarlanan primerler oda ısısına getirildi ve buz üzerinde saklandı.
2. Tüpler 2-3 saniye boyunca vortekslendi.
3. Plaka MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatıldı.
4. Plakayı 2-3 saniye boyunca vortekslendi, ardından içerikleri kuyucukların dibinde toplamak için 5-10 saniye 1.000 x g'de santrifüjlendi.
5. Bileşenler plakaya eklendi.
   8 µL BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix
   2 µL Forward primer 2 µL, Reverse primer
   8 µL deionized su (RNase/DNase-free)
   PCR'dan elde edilen 2 µL DNA
6. Plaka MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatıldı
7. Plaka 2 ila 3 saniye boyunca vortekslendi, ardından içerikleri kuyucukların dibinde toplamak için 5-10 saniye 1.000 x g'de santrifüjlendi.
   96°C'de 1 dakika inkübasyon
   96°C'de 10 saniye denatürasyon
   50°C'de 5 saniye sentez
   60°C'de 4 saniye uzama
   4°C'de diğer reaksiyonlara kadar saklandı.
8. BigDye XTerminator™ boncuklarının bulunduğu şişe SAM solüsyonuyla karıştırmadan önce 8-10 saniye boyunca vortekslendi.
9. 20 µL reaksiyon başına:
   90 µL SAM solüsyonu
   20 µL BigDye XTerminator™ boncuk solüsyonu eklendi.
10. Plakayı MicroAmp™ şeffaf yapışkan film kullanarak kapatıldı.

11. 96 kuyulu plakayı 20 dakika boyunca 1.800 rpm'de vortekslendi.
12. Plaka 1.000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi.
13. Baz sıralama tespiti için kapiller elektroforez yapıldı.

8-İstatistiksel analiz

Ortaya çıkan verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler (yüzde) hesaplandı.

BULGULAR

Haziran ve Eylül 2023 tarihleri arasında merada otlanan hayvanlar üzerinden 540 kene toplandı. Yapılan incelemeler sonucunda toplanan kenelerin türleri şu şekildedir: Rhipicephalus annulatusi, Rhipicephalus sanguines, Hyalomma marginatum (Tablo 3).

Bu keneler, havuzlama sistemi kullanılarak 54 farklı gruba ayrıldı. Ardından, DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen DNA'ların miktarı ve saflığı ölçüldü (Tablo 4). Bu ölçümler, elde edilen DNA'nın konsantrasyonunu ve kalitesini belirlemek için yapıldı.

Tablo 3: Merada otlanan hayvanlar üzerinden topladığımız kenelerin tür isimleri ve sayısal değerleri.

Kene türü	**Dişi sayısı**	**Erkek sayısı**	**Toplam**
Rhipicephalus annulatus	113	48	161
Rhipicephalus sanguines	282	52	334
Hyalomma marginatum	23	22	45
Toplam	418	122	540

Tablo 4. Grupların DNA miktarı ve saflık dağılımı

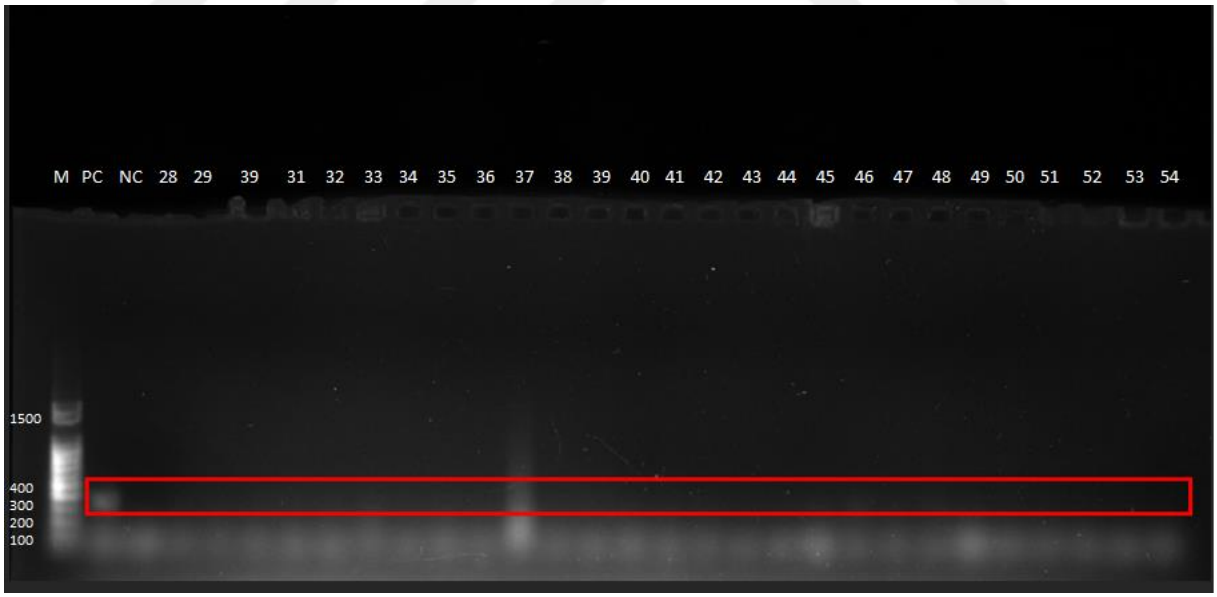
Grup	**DNA miktarı (ng)**	**Saflık (OD260/OD280)**
1	225,4	1,77
2	300	1,84
3	184,6	1,81
4	193,7	1,86
5	152,1	1,78
6	99,5	1,71
7	219,9	1,85
8	201,3	1,83
9	104,5	1,73
10	133,1	1,8
11	461,6	1,89
12	468,5	1,96
13	252,9	1,86
14	185,5	1,82
15	295,7	1,92
16	214,5	1,91
17	224,4	1,88

18	630,4	2
19	286,7	1,9
20	294,7	1,92
21	55	1,69
22	27,5	1,3
23	52.2	1,49
24	187,1	1,76
25	609,8	2,12
26	277,8	1,95
27	1039,3	2,03
28	742,5	2,03
29	464,7	2,02
30	453,3	1,96
31	559	2,03
32	821,1	2,1
33	428,7	2
34	682	2
35	680,6	2,05
36	493,3	2,02
37	80,7	4,72
38	554,9	2,04
39	831,8	2,15
40	514,1	2,12
41	716,2	2,08
42	151,5	1,62
43	366,5	1,62
44	280,2	1,59
45	172	1,76
46	773,5	1,94
47	814,6	1,65
48	866,9	2,06
49	610,4	1,95
50	789,1	1,9
51	966,9	2,12
52	767,7	2,07
53	699,9	2,07
54	756,5	2,06

Francisella tularensis bakterisi için konvansiyonel PCR yöntemi kullanılarak tul4 geni incelendiğinde, 54 farklı grupta pozitif sonuç elde edilemedi (Şekil 17-18).



Şekil 17: tul4 gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (1-27. grup).



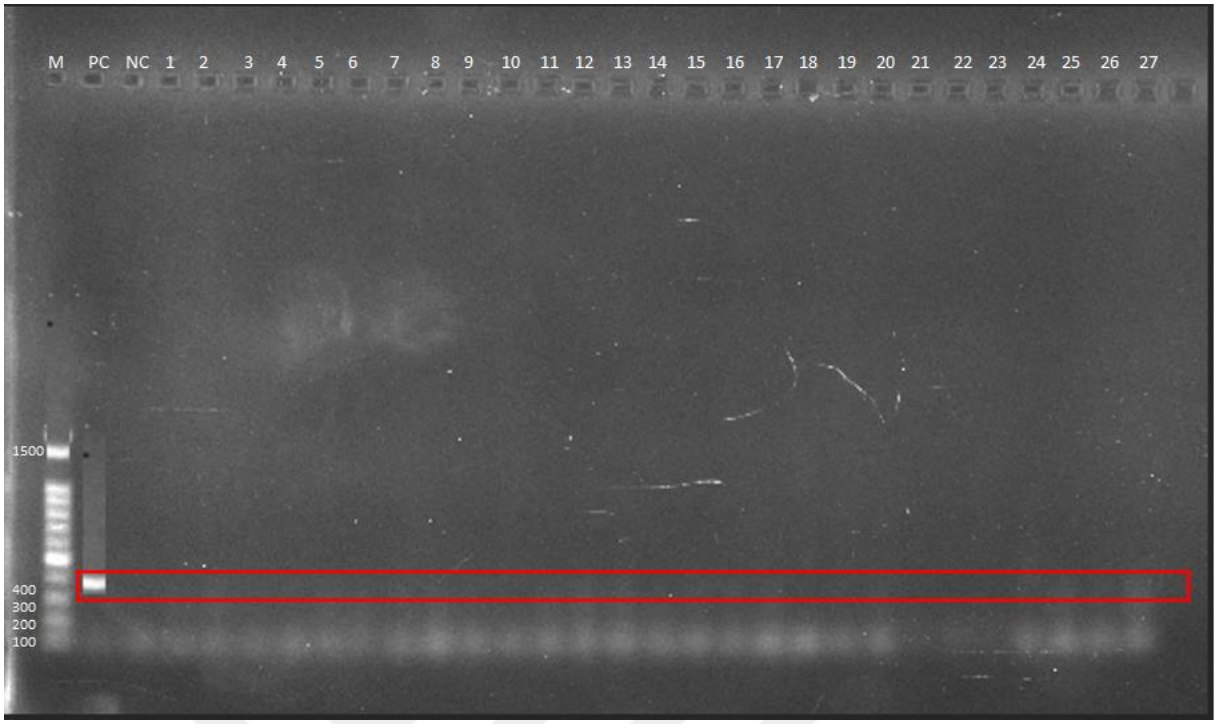
Şekil 17: tul4 gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (28-54. grup).

Rickettsia spp. için konvansiyonel PCR yöntemi kullanılarak ompA, gltA ve 23sRNA genlerine bakıldı. Sonuçlar şu şekildedir:

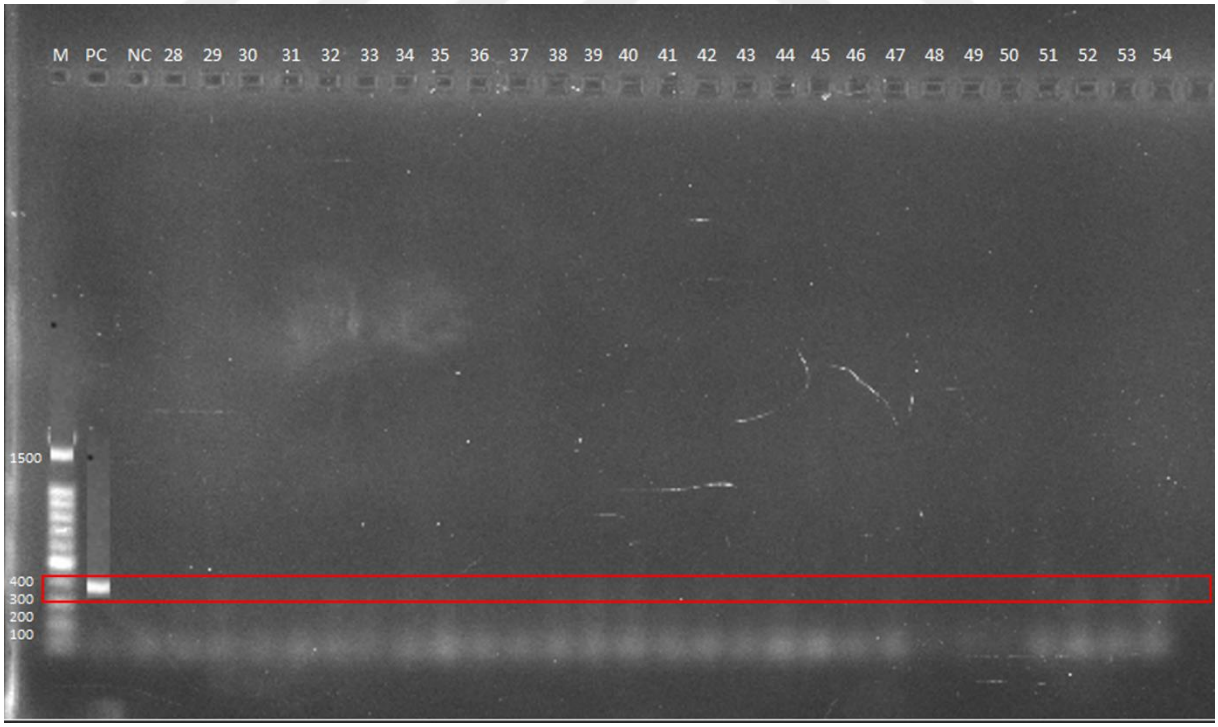
- 8 grup (%14,8) herhangi bir primer pozitif saptanmıştır.
- 23s rRNA geni için pozitiflik tespit edilememiştir (Şekil 18-19).
- gltA geni için 54 gruptan 4 pozitiflik saptanmıştır (%7,4). Bu pozitif sonuçlar 8, 10, 20, 23 gruplarıdır (Şekil 20-21).
- ompA geni için 54 gruptan 8 pozitiflik gözlemlenmiştir (%14,8). Bu pozitif sonuçlar 7, 8, 10, 18, 19, 20, 23, 40 gruplarıdır (Şekil 22-23).
- 8, 10, 20, 23 grupları hem ompA için hem de gltA için ortak pozitif gruplardır.
- Pozitif olan 7, 18, 19 grupları R. annulatus türü kenelerden oluşmaktadır.
- Pozitif olan. 8, 10, 20, 23, 40 grupları R. sanguines türü kenelerden oluşmaktadır (Tablo 5).
- Pozitif olan köyler Yapıldak, Karahisar, Kızkapan, Orhaniye'dir (Şekil 24).

Yapılan çift yönde sekans analizi sonuçları şu şekildedir:

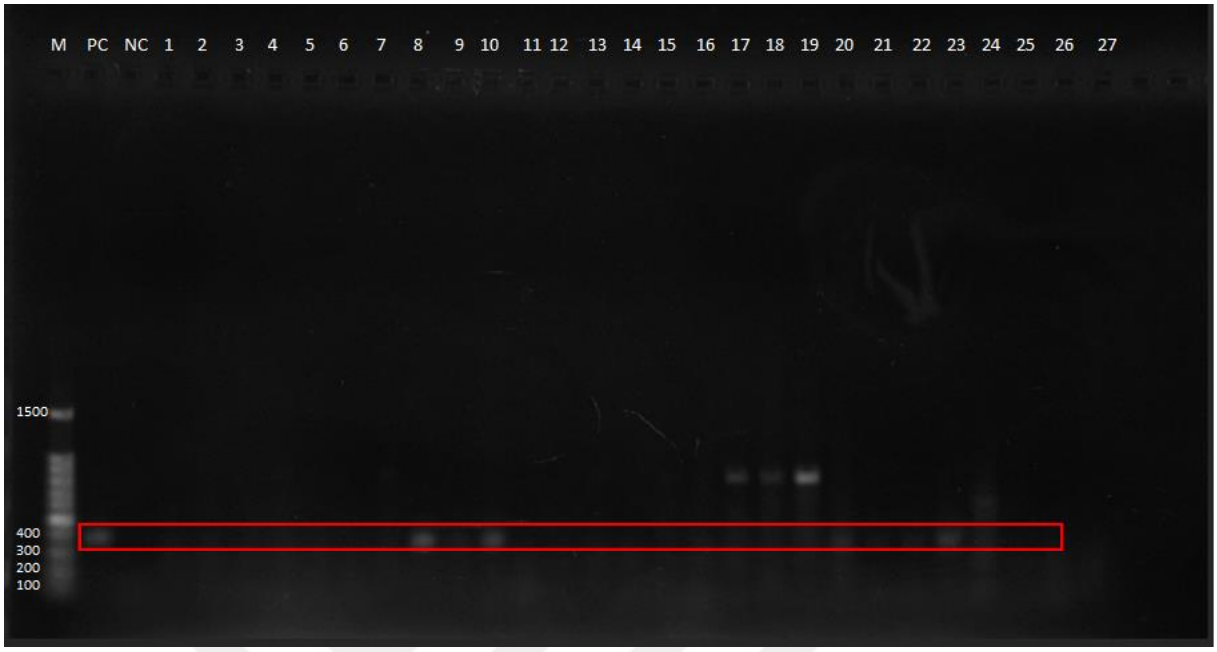
- gltA pozitif olan 4 grup *Candidatus Rickettsia barbariae* olarak isimlendirilmiştir.
- ompA için yapılan sekanslama analizi sonucunda pozitif olan 8 grup *Rickettsia massiliae* olarak isimlendirilmiştir.
- Ortak pozitif olan 8, 10, 20, 23 grupları *Candidatus Rickettsia barbariae* ve *Rickettsia massiliae* olarak isimlendirilmiştir.



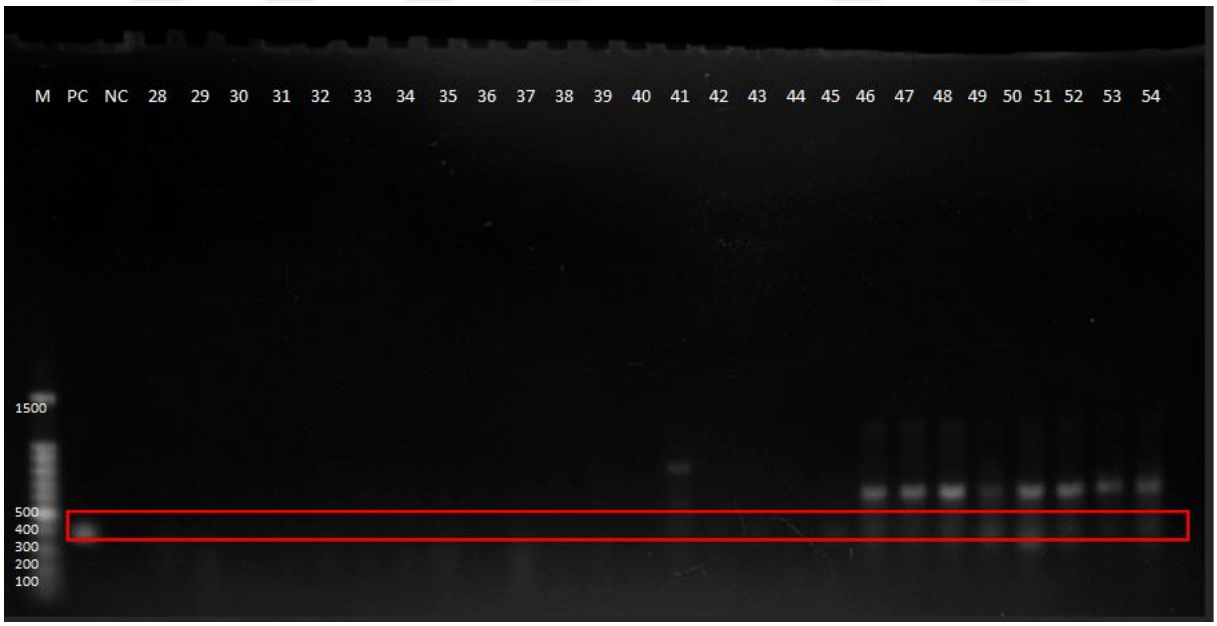
Şekil 18: 23s rRNA gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (1-27.grup)



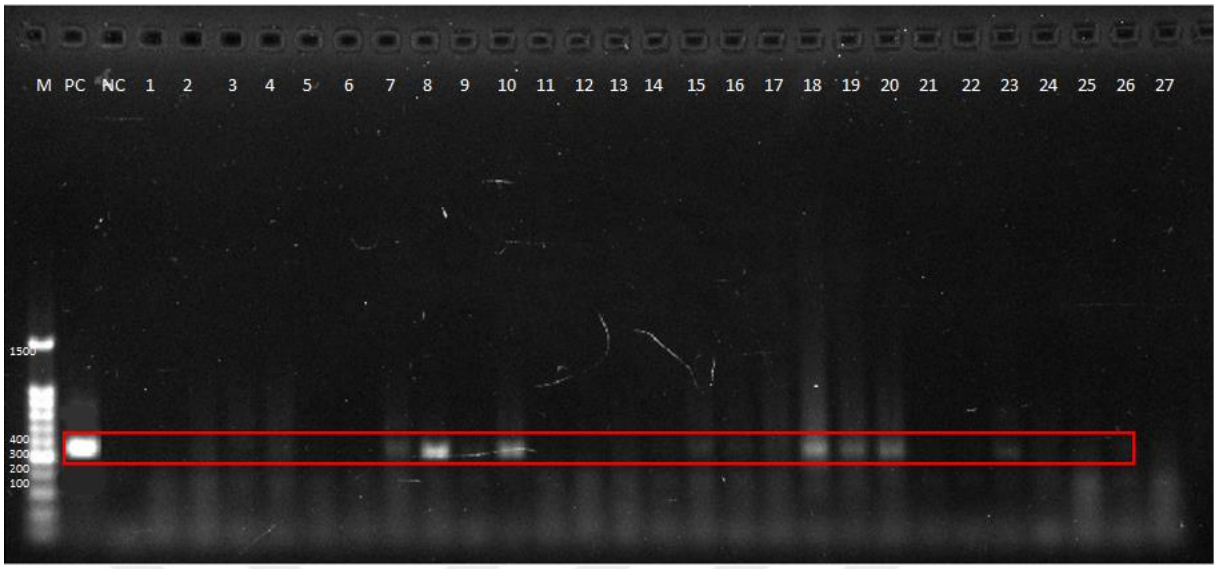
Şekil 19: 23s rRNA gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (28-54 grup).



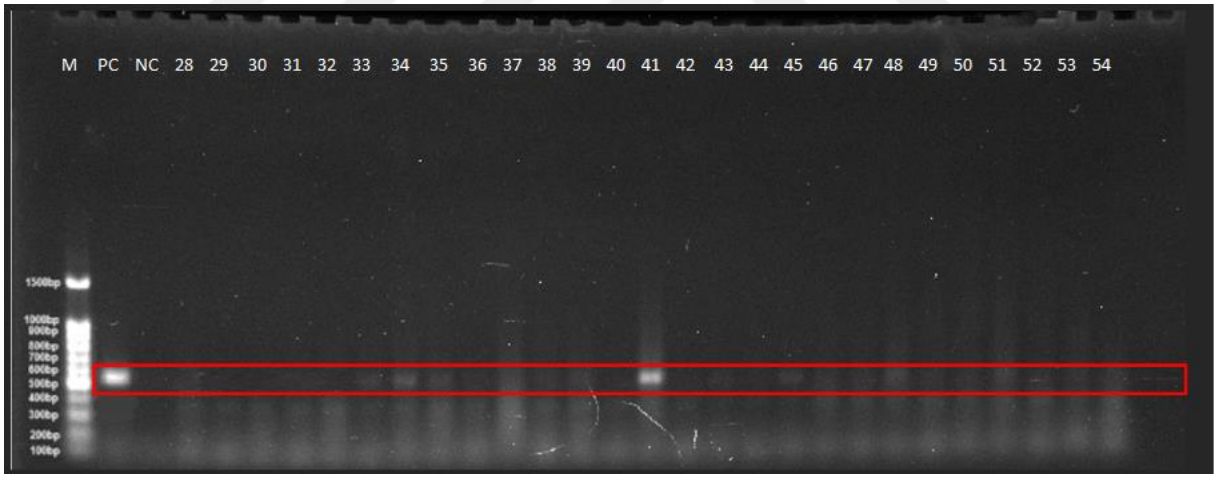
Şekil 20: gltA gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (1-27. grup). Pozitif gruplar: 8, 10, 20, 23.



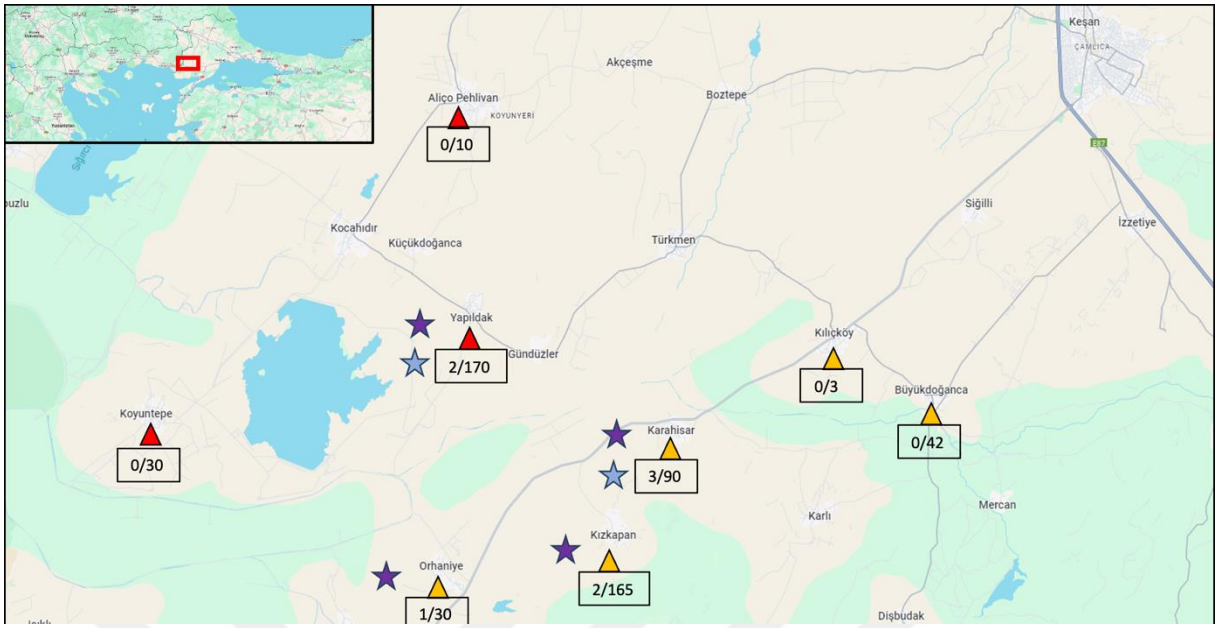
Şekil 21: gltA gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (28-54. grup).



Şekil 22: ompA gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (1-27. grup). Pozitif gruplar: 7, 8, 10, 18, 19, 20, 23.



Şekil 23: ompA gen bölgesi PCR ürünlerinin, %2 agaroz jeldeki görünümü (21-40. grup). Pozitif gruplar: 40.



Şekil 24: Kenelerin toplandığı köylerdeki pozitif gruplar (pozitif grup sayısı/toplanan kene sayısı)

△ : Edirne-Keşan'a bağlı köyler: Keneler Karahisar, Kılıçköy, Kızkapan, Orhaniye, Büyükdoğanca

▲ : Edirne-İpsala'ya bağlı köyler: Keneler Yapıldak, Koyuntepe, Aliçopehlivan

★ : ompA geni pozitif çıkan köyler

☆ : gltA geni pozitif çıkan köyler

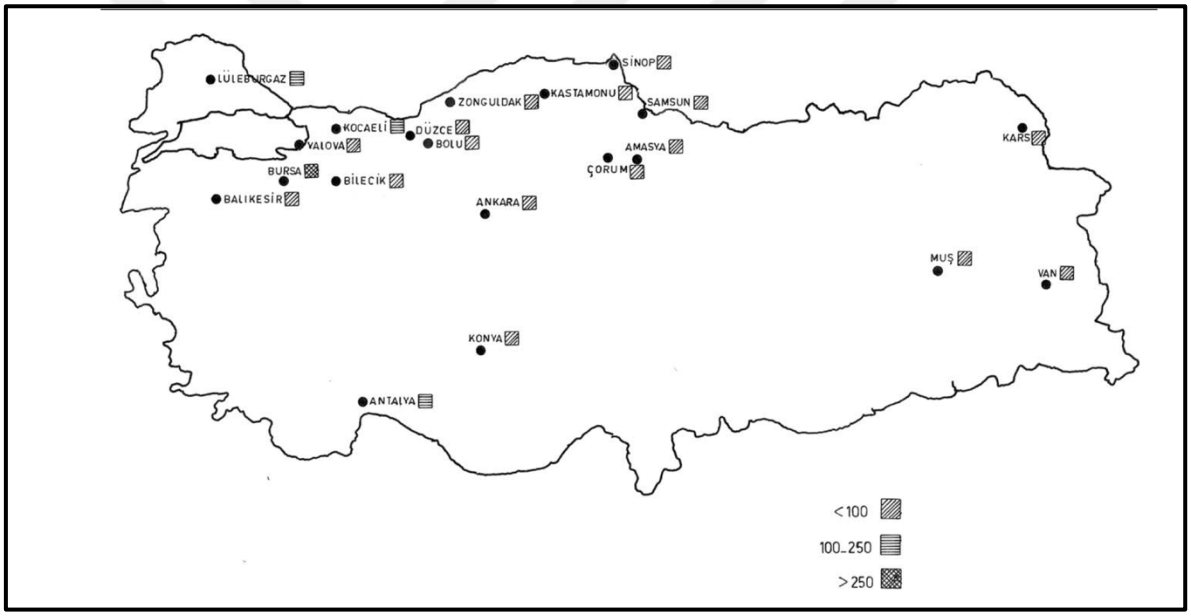
Tablo 5: PCR sonrası elde edilen pozitif sonuçların köy, toplandıkları hayvan türü, kene türüne göre dağılımı. Toplanan keneler 54 gruba ayrılmıştır. Gruplar oluşturulurken kene türü ve toplandığı köye dikkat edilmiştir. Sadece 1 grup farklı 3 köyden oluşmaktadır: Kılıçköy'den 3 Kızılkapan'dan 5, Büyükdoğanca'dan iki kene bulunmaktadır. Bu grubun PCR sonucu negatiftir.

Köyler	Kene sayısı		Rhipicephalus sannulatus	Rhipicephalus sanguines	Hyalomma marginatum	Pozitif ompA grup sayısı / toplam grup	Pozitif gltA grup sayısı / toplam grup
	Sığır/Koyun						
Karahisar	62	28	60	30	0	4/54	2/54
Kılıçköy	3	0	0	3	0	0/54	0/54
Kızkapan	120	45	70	95	0	2/54	0/54
Orhaniye	29	1	0	30	0	1/54	0/54
Büyükdoğanca	27	15	30	12	0	0/54	0/54
Koyuntepe	20	10	0	10	20	0/54	0/54
Yapıldak	150	20	0	170	0	1/54	2/54
Aliçopehlivan	6	4	0	0	10	0/54	0/54
Toplam	417	123	160	350	30	8/54	4/54

TARTIŞMA

1936 ile 1953 yılları arasında Türkiye'deki üç farklı bölgede toplamda dört tularemi salgını meydana gelmiştir. Ancak, bu salgınlarla ilgili detaylı verilere ulaşmak bazen zor olabilmektedir. Çünkü o dönemlerde epidemiyolojik veri toplama ve raporlama sistemleri günümüzdeki kadar gelişmemişti (90). Uzun bir aradan sonra 1988 yılında Türkiye'nin kuzeybatısında yer alan Bursa çevresinde yeni bir tularemi salgını tespit edilmiştir. Bu salgının belirtileri ve etkileri üzerine yapılan incelemeler, hastalığın yayılma potansiyeli ve etkisi hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. İlk Bursa salgınından sonra, 1988 ile 2002 yılları arasında Bursa'nın çevresindeki farklı bölgelerde küçük çapta salgınlar yaşanmıştır. Bu dönemde, Türkiye'nin çeşit. li bölgelerinden de benzer salgınlar rapor edilmiştir. Özellikle 1988 ile 2005 yılları arasında, tularemi salgınları Türkiye'nin geniş coğrafyasında görülmüştür (Şekil 25). Bu durum hastalığın yaygın bir şekilde var olduğunu ve çeşitli bölgelerde periyodik olarak tekrarlanabileceğini göstermektedir. Tularemi salgınlarının tekrarlanma nedenleri çeşitli olabilir. Bunlar arasında iklim koşullarındaki değişiklikler, habitat değişiklikleri, vektör popülasyonlarındaki artışlar veya insan etkileşimindeki değişiklikler yer alabilir. Bu faktörlerin bir araya gelmesi, tularemi salgınlarının ortaya çıkma olasılığını artırabilir. Bu nedenle, halk sağlığı otoriteleri ve bilim insanları, hastalığın izlenmesi, erken teşhisi ve kontrolü için sürekli olarak çalışmaktadır (47).

1988 ile 2005 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerinde meydana gelen tularemi salgınlarına yönelik kesin bir kaynak bulunamamıştır. Bu salgınların nedenleri arasında bakterilerin yayılması ve eski tularemik odakların alevlenmesi gibi faktörlerin rol oynaması muhtemeldir. *Francisella tularensis*'in yaygın coğrafi dağılımı, göçmen kuşlar aracılığıyla bulaşıcı olgunlaşmamış ixodes kenelerin taşınmasıyla açıklanabilir. Bu, hastalığın belirli bir bölgeden diğerine taşınması ve yeni odakların oluşması için bir mekanizma sağlayabilir. Ayrıca, iklim değişiklikleri ve habitat bozulmaları gibi faktörler de tularemi salgınlarının oluşumunu etkileyebilir. Bu nedenle, tularemi salgınlarının karmaşık bir etiyolojisi olduğu ve birden fazla faktörün bir araya gelerek hastalığın yayılmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (91).



Şekil 25: Türkiye'den serolojik doğrulamaya veya rapor edilen salgına göre tularemi odağı olan bölgeler (91).

Dermacentor reticulatus ve Ixodes ricinus, *Francisella tularensis*'in Avrupa'daki önemli kene vektörlerindendir. Bu keneler hastalığı taşıyan bakteriyi insanlara ve diğer hayvanlara bulaştırabilirler. Dermacentor reticulatus Türkiye'nin de aralarında bulunduğu Avrupa'nın çeşitli bölgelerinde bulunabilen bir türdür. Ixodes ricinus ise Avrupa'nın geniş bir coğrafyasında yaygın olarak bulunur ve Lyme hastalığı gibi diğer önemli zoonotik hastalıkların yanı sıra

tularemiyi de taşıyabilir. Bu keneler, insanların ve hayvanların temas ettiği çalılıklar, ormanlar ve otlaklarda yaşarlar. Bu nedenle dikkatli olmak ve kene ısırıklarından korunmak önemlidir (92).

Tükmechi ve ark. (93) çalışmasında, İran'ın kuzeybatı bölgesinde 500 adet kene toplanmıştır. Bu kenelerin H. aegyptium türüne ait olduğu belirlenmiştir. Keneler, havuzlama yöntemi kullanılarak 5 kene içeren 100 gruba ayrılmıştır. Tüm bu gruplar, 16S rRNA geninin varlığını belirlemek için spesifik primerler kullanılarak Nested-PCR tekniği ile analiz edilmiştir. Daha sonra, pdpD ve RD1-R genlerine özgü primerler tasarlanarak PCR gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, 100 grubun 15'inde (%15) hem 16S rRNA hem de RD1 pozitif olarak belirlenmiştir. Bu gruplarda *Francisella tularensis subsp. holarctica* türü tespit edilmiştir. Ancak, 100 grupta pdpD geninin varlığı saptanamamıştır.

Yousefi-Bezhadi ve ark. (94) yaptığı çalışmada 2019 sonbaharında (6-11 Kasım arası), sığır ve koyunlardan Kuzey İran'ın çeşitli bölgelerinde 133 kene toplamıştır. PCR analizleri için 16SrRNA ve ISFTu2 primerleri kullanılmış olup, yapılan analizlerde hiçbir örnekte *Francisella tularensis*'e ait DNA pozitifliği saptanamamıştır.

Stensvold ve ark. (95) çalışmasında, Danimarka'daki 22 veteriner kliniğine gelen köpeklerin üzerinden 1-2 adet kene toplanmıştır. Her bir köpekten alınan keneler, havuzlama yöntemi kullanılarak bir grubu oluşturacak şekilde birleştirilmiştir. Bu şekilde toplamda 661 adet kene, 345 farklı gruba ayrılmıştır. *Francisella tularensis*'in varlığını belirlemek amacıyla Ft-M19 geni araştırılmıştır. Yapılan real-time PCR analizleri sonucunda, hiçbir örnekte *Francisella tularensis*'e ait DNA pozitifliği tespit edilmemiştir.

Duzlu ve ark. (96) Kayseri'de tulareminin endemik olduğu bilinen bir bölgede yaptıkları çalışmada 1477 kene örneği incelemiştir. Keneler daha önce yürütülen çeşitli projelerden (107O533 ve 113O202 kod numaralı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu) elde edilmiştir. Ancak, bu örneklerin hiçbirinde *Francisella tularensis*'in pozitif bulunmaması dikkat çekicidir. Bu bulgu, özellikle endemik bir bölgede beklenmeyen bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte, negatif sonuçlarının çeşitli faktörlere bağlı olabileceği unutulmamalıdır.

Akveran ve ark. (97) Çorum'da yaptığı çalışmada, 261 kene örneği toplanmıştır. Keneler kaplumbağaların yaşadığı habitatlardan toplanmıştır. Ancak yapılan real-time PCR

analizlerinde hiçbir örnekte *Francisella tularensis*'e ait DNA pozitifliği saptanmamıştır. Bu sonuçlar Çorum'daki kene popülasyonunda tularemi bakımından düşük bir risk olduğunu veya en azından bu belirli çalışma süresi boyunca hastalığın bölgede yaygın olmadığını gösterebilir.

Güneş ve ark. (98) yaptığı çalışmada, Mayıs-Temmuz 2017 tarihleri arasında Sinop'un 20 farklı bölgesindeki ormanlık alanlarından 2734 kene toplanmıştır. Keneler ormanlık alanlardaki ağaç yaprakları, çimenler ve çalılardan battaniye sürükleme yöntemiyle toplanmıştır. Battaniyeye yapışan her kene forseps ile toplanmıştır. Ancak, yapılan real-time PCR analizlerinde hiçbir örnekte *Francisella tularensis*'e ait DNA pozitifliği saptanmamıştır.

Herge ve ark. (99) olgu sunumunda, Avusturya'da artropod (eklem bacaklılar) ısırıkları sonrası gelişen 3 tularemi vakası bulunmaktadır. İlk vakada, 64 yaşında bir kadın hasta ateş, titreme ve genel bir rahatsızlık hissi ile acil servise başvurmuştur. Kene ısırık bölgesinden alınan biyopsi kültürü sonucunda bakteri üremesi olmamış, ancak kan kültüründe *Francisella tularensis* üremesi tespit edilmiştir. İkinci vakada ise, 5 yaşındaki bir çocuk hastada kulak kepçesinde kene ısırığı sonrası ısırık bölgesinde ülser şekillenmiştir. Yapılan yara sürüntüsü kültüründe *Francisella tularensis* üremesi saptanmıştır. Üçüncü vakada ise, 76 yaşında bir erkek hasta ateş, genel rahatsızlık, mide bulantısı ve baş dönmesi şikayetleriyle hastaneye kaldırılmıştır. Sol uylukta, muhtemelen bir eklem bacaklı ısırması sonrası gelişen, ortasında kabuk bulunan kırmızı, ağrısız bir deri lezyonu ve kasık lenfadenopatisi (lenf bezlerinde büyüme) kaydedilmiştir. Hastaneye yatışının 8. gününde yapılan anaerob kan kültüründe *Francisella tularensis* üremesi tespit edilmiştir. Karasortava ve ark. (87) Çorum'da yaptığı çalışmada, Mart ayından Kasım 2014'e kadar yerel hastanelere kene ısırması nedeniyle başvuran hastalardan toplam 322 kene örneği toplanmıştır. Ancak, yapılan Taqman real-time PCR analizlerinde hiçbir örnekte *Francisella tularensis*'e ait DNA pozitifliği saptanmamıştır. Yeşilyurt ve ark. (100) olgu sunumunda Yozgat'ta yaşayan, farklı zamanlarda başvuran iki hasta yer almaktadır. Her iki hasta da ateş, titreme ve bölgesel hassasiyet gibi semptomlar yaşamıştır. Hastalardan birini ısıran kenenin Dermacentor spp. olduğu belirlenmiştir. Şüpheli ülseroglandüler tularemi tanısı, mikroaglütinasyon testi *Francisella tularensis* DNA pozitifliğinin saptanması ile doğrulanmıştır. Bu durum, ülkemizde kene kaynaklı tularemi olgularının ilk tespit edilen örneklerdir. Bu olgu sunumu, kene kaynaklı tularemi vakalarının Türkiye'de varlığını vurgulamaktadır. Dermacentor cinsi kenelerin tularemi bakterisi olan Francisella tularensis'i taşıyabileceğini gösterirken, mikroaglütinasyon testi ve PCR gibi

laboratuvar teknikleriyle tanının doğrulanması önemlidir. Bu tür olgu sunumları, kene kaynaklı tularemi vakalarının tanınması ve tedavi edilmesinde klinisyenlere rehberlik edebilir.

Bu çalışma, merada gezen hayvanların üzerinden pensle toplanan 540 kene örneğinde diğer çalışmalara benzer şekilde *Francisella tularensis* DNA'sının pozitif bir şekilde tespit edilememesiyle sonuçlandı. Bu bulgu, bölgedeki kenelerin bu patojenle enfekte olmadığını veya enfekte olmuş olsalar bile DNA düzeyinde belirgin bir iz bırakmadığını düşündürmektedir. Bunun nedeni kene örneklerinin toplandığı omurgalı hayvanlar olabilir. Örnekleri topladığımız keçi, koyun ve sığır gibi omurgalı hayvanlar kemirgenlerin aksine *Francisella tularensis* için doğal rezervuar konakçı değildir. Bununla birlikte, negatif sonuçlar genellikle birçok etkenin bir arada değerlendirilmesini gerektirir. Örneğin, kullanılan yöntemlerin hassasiyeti ve örnek toplama yöntemlerinin etkinliği gibi faktörler bu sonuçları etkileyebilir. Bununla birlikte, bu sonuçların bazı sınırlamaları da vardır. Örneğin, belirli bir zaman diliminde ve belirli bir bölgede yapılan çalışma, tulareminin yaygınlığı ve patojenin varlığı hakkında genel bir resim sunmayabilir. Ayrıca, kullanılan tanı yöntemleri, bazı durumlarda patojenin varlığını yanlış şekilde dışlamış olabilir. Bu nedenle, gelecekteki araştırmaların daha kapsamlı olması ve farklı bölgelerde ve zaman dilimlerinde benzer çalışmaların yapılması önemlidir.

Çalışmamızda iklim değişikliği nedeniyle Nisan ve Temmuz 2023 tarihleri arasında belirlenen 1000 kene toplama hedefine ulaşılamamıştır. Ancak, Haziran ve Eylül 2023 tarihleri arasında 540 kene toplanmıştır. Bu durum, iklim değişikliğinin biyolojik araştırmalar üzerindeki etkilerini göstermektedir. İklim koşullarındaki değişimler, doğal popülasyonların davranışlarını, yayılımını ve yoğunluğunu etkileyebilir. Bu da araştırma ve veri toplama süreçlerini değiştirebilir. Bu nedenle, araştırmacıların çalışmalarını planlarken ve yürütürken iklim faktörlerini dikkate almaları önemlidir.

Türkiye'de tularemi yaygın bir hastalıktır ve *Francisella tularensis*'in rezervuarları ve vektörlerdeki epidemiyolojisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, hastalığın kontrolü ve önlenmesi için daha fazla araştırma ve çaba gerekmektedir. Özellikle, potansiyel rezervuarları ve vektörleri belirlemek, hastalığın yayılma mekanizmalarını anlamak ve etkili kontrol stratejileri geliştirmek için önemlidir. Bu tür çalışmalar, tularemi ile ilgili riskleri azaltmak ve halk sağlığını korumak için önemli bir adım olacaktır (101).

Türkiye'de tulareminin çoğunlukla su kaynaklı ve çok az vektör kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (101). Bulgularımız bu ifadeyle uyumludur. Sonuçlarımız Türkiye'deki risk faktörlerinin tam olarak değerlendirilebilmesi için daha fazla sayıda kene ve daha fazla örnekleme noktası içeren daha geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bu araştırmalar, tulareminin epidemiyolojisi ve bulaşma yolunun daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir ve koruyucu önlemlerin alınmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca, kene kaynaklı tularemi vakalarının Türkiye'deki yaygınlığı ve etkisi hakkında daha detaylı bir resim sunabilir.

Türkiye'de benekli ateş grubu en sık olarak Marmara Bölgesi'nden bildirilmiştir. Bu hastalığın görülme sıklığı, bölgedeki kene popülasyonuyla doğru orantılıdır. Marmara Bölgesi'nde yaşayan kene türleri arasında Ixodes ricinus, Boophilus annulatus, Hyalomma marjinatum, Hyalomma anatolicum anatolicum, Hyalomma anatolicum excavatum, Hyalomma detritum, Hyalomma aegypticum, Dermacentor marjinatus, Haemaphysalis numidiana, Haemaphysalis sulcata, Haemaphysalis parva, Haemaphysalis inermis, Haemaphysalis punctata, Rhipicephalus sanguineus, Rhipicephalus bursa ve Rhipicephalus turanicus bulunmaktadır. Bu türler, bölgedeki kene popülasyonunu oluşturur ve insanlar ile temasları sonucunda çeşitli hastalıkların bulaşmasına neden olabilirler. Bu nedenle, kene ısırıklarından korunma ve kene ile temas sonrası belirtilerin izlenmesi önemlidir (102).

Rickettsia conorii'nin sebep olduğu akut ateşli bir hastalık olan benekli ateş, kene kaynaklı bir hastalıktır. Bu hastalık, özellikle Akdeniz ülkelerinde sık görülür. İtalya, İspanya, Portekiz, Yunanistan, Türkiye, İsrail, Romanya ve Bulgaristan gibi Avrupa'nın güneyini içeren bölgelerde *Rickettsia conorii*, benekli ateşin ana nedeni olarak bilinir. Bu hastalığın taşıyıcısı olarak Rhipicephalus sanguineus türü keneler belirtilmiştir (103). Ancak Rhipicephalus sanguineus türü keneler ülkemiz Akdeniz bölgesinde sık bulunmasına rağmen, benekli ateş grubu hastalığının bildirimlerin kısıtlı olması dikkat çekicidir. Bildirilen vaka sayısının az olması önemli bir durumdur. Bu durum hastalık tanısının konulamamasından veya hastaların hastaneye başvurmamasından kaynaklanabilir (104). Bu tür faktörler, hastalık izleme ve kontrolü açısından önemlidir ve daha fazla farkındalık ve erken teşhis için çaba gerektirebilir.

Özellikle ilkbahar ve yaz aylarında ateş, kas ağrısı ve ciltte makülopapüler döküntülerle başvuran hastalarda, benekli ateş grubu hastalığı ön tanısı düşünülmelidir. Hastaların kene ile teması açısından sorgulanması önemlidir. Bu belirtiler benekli ateşin yaygın semptomlarıdır ve

hastaların hikâyelerinde kene ısırığı veya doğal ortamlarda bulunma gibi risk faktörlerinin olup olmadığının araştırılması doğru tanı ve tedavi için hayati öneme sahiptir (105).

Getange ve ark. (106) Kenya'da yaptığı çalışmada 216 deveden 2610 kene ve 77 koyun üzerinden 86 kene toplanmıştır. Havuzlama yöntemi kullanılarak 906 grup oluşturulmuştur. *Rickettsia* için ompA genine bakılmış olup 147 (%16,2) grupta pozitiflik saptanmıştır. Gen analizinde 45 grupta *Rickettsia africae,* 102 grupta *Rickettsia aeschlimanni* türü bulunmuştur.

Phillip ve ark. (107) Teksas'ta yaptığı çalışmada insanlara yapışan 903 kenede *Rickettsia* için rompA, rompB genlerine bakılmıştır. 133 (%14,4) kenede *Rickettsia* saptanmıştır. En sık *Candidatus Rickettsia amblyommii* türü bulunmuştur.

Valeria ve ark. (108) 2012-2013 yıllarında, Sicilya'nın (İtalya) kuzeydoğusundaki Messina kentinde keneler tarafından ısırılan 42 kişiden kene toplanmıştır. *Rickettsia* için ompA, ompB, gltA genlerine bakılmıştır. 42 keneden 14 (%33) tanesi en az 2 tür *Rickettsia* pozitif saptanmıştır. Gen analizinde 4 tür bulunmuştur: Ricketttsia *aeschlimannii, Rickettsia massiliae, Rickettsia conorii, Rickettsia slovaca.*

Stensvold ve ark. (95) çalışmasında, Danimarka'daki 22 veteriner kliniğine gelen köpeklerin üzerinden 1-2 adet kene toplanmıştır. Her köpeğin bir kene grubu vardır. Bu şekilde toplamda 661 adet kene 345 farklı gruba ayrılmıştır. *Rickettsia* tespiti için 16S rRNA geni araştırılmış olup %16 oranında, yani toplamda 55 grup pozitif olarak saptanmıştır. Bu pozitif grupların içinde 44 (%12,5) grup *Rickettsia helvetica,* 3 (%0,8) grup ise *Rickettsia massilia* olarak belirlenmiştir. Ancak, 8 (%2,3) grup belirli bir tür düzeyinde tanımlanamamıştır.

Karasortava ve ark. (87) Çorum'da yaptığı çalışmada, Mart ayından Kasım 2014'e kadar yerel hastanelere kene ısırması nedeniyle başvuran hastalardan toplam 322 kene örneği toplanmıştır. *Rickettsia spp.* için gltA, ompA 23S rRNA genlerine bakılmıştır. Yapılan PCR sonucunda *R. aeschlimannii* (%19,5), *R. slovaca* (%4,5), *R. raoultii* (%2,2), *R. hoogstrali* (%1,9), *R. sibirica subsp. mongolitimonae* (%1,2), *R. monacensis* (%0,31) ve *Rickettsia spp.* (%1,2) pozitif bulunmuştur.

Ji ve ark. (109) Türkiye'de Karaman, Gaziantep, Kahramanmaraş, Şanlıurfa illerinde yaptığı çalışmada sığırlar üzerinden 277 kene toplanmış olup havuzlama yöntemiyle 90 grup oluşturulmuştur. 90 grup *Rickettsia* için 16s rRNA bakılmış ve 7'sinde (%7,7) pozitif tespit edilmiştir. Sonrasında 7 grup için ompA ve gltA genine bakılmış ve 5'inde 2 gende pozitiflik

saptanmıştır. Gen analizinde (16S rRNA, gltA ve ompA) *R. aeschlimannii, Candidatus Rickettsia barbariae* ve *Rickettsia spp.* dahil olmak üzere üç tür bulunmuştur.

Aysen ve ark. (110) yaptığı çalışmada 2006 yılında İstanbul'da insanlardan toplanan toplam 167 kene, Rickettsia türleri açısından taranmış ve gltA ve ompA genlerine bakılmıştır. 69 (%41) kene *Rickettsia* pozitif saptanmıştır. *Rickettsia monacensis* (51), *R. aeschlimannii* (8), *R. conorii subsp. conorii* (3), *R. helvetica* (2), *R. raoultii* (1), *R. africae* (1), *R. felis* (1) ve diğer *Rickettsia spp*. (2) tespit edilmiştir.

Orkun ve ark. (111) yaptığı çalışmada Türkiye'nin üç ilinde (Ankara, Bolu ve Kırşehir) 12 ilçeden oluşan bir coğrafi bölgeden toplam 1019 kene toplanmıştır. *Rickettsia* için gltA geni bakılmış olup 125 (%12,2) kenede pozitiflik saptanmıştır. Daha sonra bu 125 kenede ompA geni bakılmış ve 41 gende pozitiflik saptanmıştır. Yapılan DNA analizinde ompA pozitif 17 kenede *Rickettsia slovaca,* 12 kenede *Rickettsia aeschlimannii,* 2 kenede *Rickettsia sibirica subsp. mongolitimonae,* 1 kenede *Rickettsia raoultii,* 4 kenede *Rickettsia monacensis* türü, gltA pozitif olan 81 kenede *Rickettsia hoogstraalii* türü bulunmuştur.

Güneş ve ark. (98) yaptığı çalışmada, Mayıs-Temmuz 2017 tarihleri arasında Sinop'un 20 farklı bölgesindeki ormanlık alanlarından 2734 kene toplanmıştır Keneler ormanlık alanlardaki ağaç yaprakları, çimenler ve çalılardan battaniye sürükleme yöntemiyle toplanmıştır. Battaniyeye yapışan her kene forseps ile toplanmıştır. Toplam 2531 kene toplamış olup 135 adet grup oluşturulmuştur. *Rickettsia spp*. için ompA genine göre 35 grup (%25,9) havuzu *Rickettsia spp*. pozitif olarak bulunmuştur.

Kuloğlu ve ark. (104) yaptığı çalışmada 2003-2009 yılları arasında Trakya Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran SFG riketsiyozu olan yetişkin hastalarda (≥12 yaş) tanımlayıcı bir çalışma yürütmüşlerdir. Yüksek ateşi, makülopapüler döküntüsü (avuç içi veya ayak tabanını kapsayan) ve/veya kene ısırığının olduğu bölge (tache noire) çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların 60'ı (%46,9) Edirne, 43'ü (%33,6) Kırklareli ve 23'ü (%17,9) Tekirdağ'dan olmak üzere Trakya bölgesindeki 3 ilden geliyordu. Bir hasta (%0,8) Bulgaristan ve Türkiye çifte vatandaşıydı. Ayrıca hastalardan biri (%0,8) İstanbul'dan Edirne'ye yürüyerek gelen ve Yunanistan'a girmeye çalışan yasadışı Pakistanlı göçmendi. Katılımcı hastalar genellikle Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerinin kasaba, köy ve kırsal kesimlerinde yaşayan hastalardı. Hastaların 75'i (%58,6) kene veya kene istilasına uğramış habitatlarla temas bildirilmiştir.

Köpek, sığır, koyun gibi hayvanları besleyen hastalar, keneleri hayvanlardan uzaklaştırmaya çalışırken ellerinde ezildiğini ifade etti. Yüz yirmi sekiz hastanın %88,5'i serokonvansiyel olarak pozitifti. Deri biyopsisi alınmasına izin veren 106 hastanın 77'si PCR olarak pozitifti (gltA ve ompA geni). DNA dizi analizine göre *Rickettsia conorii* olduğu anlaşılmıştır.

Çelebi ve ark. (112) yaptığı çalışmada Tekirdağ'da bahçeli bir evde ailesi, kedi ve köpekle yaşayan bir erkek hastada kene ısırığıyla uyumlu eskardan biyopsi alınmıştır. Yapılan PCR'da ompA ve gltA genlerine bakılmıştır. Yapılan DNA dizilimi ile *Rickettsia conorii* olduğu ortaya konmuştur. Emiroğlu ve ark. (113) yaptığı çalışmada, ailesi Konya ilinde hayvancılıkla uğraşan ailenin 3 yaşındaki kız çocuğu iki gündür devam eden ateş, yaygın kas ve karın ağrısı, boyunda büyümüş ve ağrılı lenf düğümleri şikâyeti nedeniyle hastaneye başvurmuştur. Hastanın kanında *Rickettsia* antikorlarının varlığını araştırmak için *R. conorii* antijeni ile kaplanmış floresan antikor testi (IFAT) yapılmış ve pozitif saptanmıştır.

2012 yılına kadar Türkiye'de sadece iki riketsiyal tür, *Rickettsia conorii* (Akdeniz benekli ateşi etkeni) ve *Rickettsia akari* (rickettsialpox etkeni) tespit edilmiştir (114). Ancak son zamanlarda *Rickettsia sibirica mongolitimonae, Rickettsia helvetica, Rickettsia monacensis, Rickettsia raoul-Tii, Rickettsia aeschlimannii, Rickettsia massiliae, Rickettsia slovaca, Rickettsia afrika, Rickettsia felis* türleri yabani ve evcil hayvanlar ile insanları istila eden kenelerde tespit edilen *Rickettsia* türleridir (110). Riketsiyal hastalıkların son derece ciddi sonuçlarına rağmen, Türkiye'de bu enfeksiyonlar ve bunların olası vektörleri hakkında çok az bilgi mevcuttur (115). Aynı zamanda Türkiye'de yapılan çalışmaların çoğu Kırım-Kongo kanamalı ateş'in endemik olduğu İç Anadolu bölgesine odaklanmıştır (116).

Bu çalışmada, *Candidatus Rickettsia barbariae* ve *Rickettsia aeschlimannii* türlerinin varlığı kenelerde %14,8 oranında tespit edilmiştir. Bulgularımız, daha önceki çalışmalarla tutarlılık göstererek Türkiye'de *Candidatus Rickettsia barbariae*'nin mevcudiyetini doğrulamıştır. Bu bulgular, Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki vektör popülasyonlarının ve insan temasının daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesini gerektirmektedir.

Candidatus R. barbariae ilk olarak 2006 yılında Portekiz'deki Rhipicephalus bursa'da izole edilmiştir (117). *Rickettsia massiliae* ilk kez 1992 yılında Fransa'nın Marsilya kenti yakınındaki Rhipicephalus sanguines kenelerinden izole edilmiştir. *Rickettsia massiliae* insanlarda benekli ateşe neden olan bir patojendir. Bu bakteri Avrupa'nın çeşitli bölgelerinde, Afrika'da, kuzeybatı Çin'de, Tayland'da ve Amerika'nın belirli bölgelerinde gözlemlenmiştir.

R. massiliae'nin genişleyen coğrafi dağılımı, çeşitli vektör türleri, rezervuar konakçılarla olan ilişkisi ve ciddi klinik belirtilerin ortaya çıkma potansiyeli önemli halk sağlığı sorunlarına neden olmaktadır (118).

Candidatus Rickettsia barbariae farklı bölgelerde ve konakçılarda keşfedilmesi, bu bakterinin patogenezini ve dağılımını daha iyi anlamak için sürekli araştırma ve izleme ihtiyacını vurgulamaktadır. Bu bakterinin insanlarda hastalıklara neden olma potansiyeli göz önüne alındığında, dünya çapında farklı kene popülasyonlarındaki varlığının izlenmesi önemlidir. Bu, önleme ve tedavi için etkili stratejilerin geliştirilmesine ve sonuçta halk sağlığının iyileştirilmesine yardımcı olacaktır.

Büyükbaş hayvanlardan toplanan kenelerin bazılarının yeni beslenmiş olduğunu fark etmek, araştırmalarda dikkate alınması gereken önemli bir noktadır. Bu durum, bu kenelerin içindeki potansiyel patojenlerin tespiti ve vektör olup olmadıklarının doğrudan sonuçlarını etkileyebilir. Kenelerin enfekte olmuş hayvanlarla beslenmesi beslenme yoluyla mikroorganizmalarla enfekte olabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca DNA tespiti, yeni beslenmiş kenedeki mikroorganizmaların canlı olduğunu göstermez. DNA tespiti, yeni beslenmiş kenelerde bulunan mikroorganizmaların sadece genetik izlerini belirlemek için kullanılır. Bu nedenle, DNA tespiti sonuçları, patojenlerin aktif bir şekilde enfeksiyon yayma potansiyelini doğrudan göstermez. Sonuç olarak, tıkalı kenenin içinde bulunan patojenlerin tespiti ve değerlendirilmesi, dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Çalışmamıza yeni beslenmiş keneler dahil edilmemiştir.

Bununla birlikte, *Rickettsia spp.*'lerin Hyalomma kenelerinin ve diğer bazı kene cinslerinin endosembiyoz ortağı olarak kabul edildiği bilinmektedir. Örneğin, *R. aeschlimannii*'nin, Hyalomma kenelerinin büyük bir yüzdesinde tanımlandığı ve klinik öneminin henüz belirlenmediği bildirilmiştir. Bu bulgular ışığında, Hyalomma dışındaki kene türlerinin de bu bakteri türünü taşıma potansiyeline sahip olabileceği önerilebilir (119). Çalışmamızda bulunan 25 adet Hyalomma marginatum türü kenede herhangi bir pozitiflik saptanmamıştır.

Rickettsia'nın kenelerdeki varlığına dair yapılan çalışmalar hem vektör kontrolü hem de halk sağlığı açısından kritik öneme sahiptir. *Rickettsia*'nın kenelerle olan etkileşimini anlamak için, farklı kene türlerinin incelendiği çalışmalar yapılmalıdır. Kenelerin beslendikleri konaklar ve bu konaklar arasındaki geçişler incelenmelidir. Bu çalışmalar, *Rickettsia*'nın yayılımını

anlamak, etkileşimlerini belirlemek ve koruyucu önlemler geliştirmek adına önemli veriler sağlayacaktır. Bu bağlamda, bilim dünyası ve halk sağlığı uzmanları arasında iş birliği, *Rickettsia* ve benzeri zoonotik patojenlere karşı etkili bir mücadelede temel bir unsurdur. Farklı bölgelerdeki kene popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar, salgın riskini belirlemek açısından önemlidir. Kene-*Rickettsiae* etkileşimleri üzerine devam eden araştırmalar, eklembacaklılarla bulaşan patojenlerin ortaya çıkışı ve dağılımını ve bunların birlikte evrimini etkileyen faktörlerin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.

Sonuç olarak, *Candidatus Rickettsia barbariae* ve *R. aeschlimannii*'nin Türkiye'deki varlığı hem bilimsel hem de klinik açıdan önemli bir bulgudur. Bu bulgular, ülkemizdeki vektör-bulaşıcı hastalıkların izlenmesi ve kontrolüne yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Ancak, bu türlerin potansiyel halk sağlığı riskleri göz önünde bulundurularak, ilgili tarafların daha fazla araştırma yapması gerekmektedir.

Babesiosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, Lyme hastalığı, Kırım Kongo kanamalı ateşi ve Kayalık Dağları benekli ateşi gibi keneler ve kene kaynaklı hastalıklar hayvan ve insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Kene kaynaklı sığır enfeksiyonun insan popülasyonlarına yayılması, istenmeyen hayvan kesimlerini tetikleyebilir ve sığır sahipleri için büyük ekonomik kayıplara neden olabilir. Sıcak havaların kene büyümesini kolaylaştırması nedeniyle gelecekte iklim değişikliği nedeniyle artış yaşanacaktır.

Hayvanlarla uğraşan çalışanları *Rickettsia, Francisella tularensis* ve benzeri zoonotik patojenler konusunda bilgilendirmek, onların sağlığını korumak ve hastalığın yayılmasını önlemek için önemlidir. Çalışanları bilgilendirmek için kullanılabilecek bazı stratejiler geliştirilmelidir.

1. Eğitim programları

    a. Çiftlikler veya veteriner klinikleri, çalışanlarına yönelik düzenli eğitim programları düzenlemelidir. Uzman veterinerler veya halk sağlığı uzmanları seminerlere katılarak güncel bilgiler verebilir.
2. İş sağlığı ve güvenliği el kitapları
    a. El kitaplarında *Rickettsia, Francisella tularensis* ve benzeri zoonotik benzeri patojenlerin neden olduğu hastalık belirtileri, korunma yolları ve acil müdahaleleri hakkında bilgi bulunmalıdır.

3. Kişisel koruyucu materyaller
    a. Çalışanlara uygun kişisel koruyucu ekipmanları nasıl kullanacağı konusunda eğitim verilmelidir.

SONUÇLAR

Haziran ve Eylül 2023 tarihleri arasında merada otlanan hayvanlar üzerinden 540 kene toplandı. Elde edilen DNA'lar tul4, gltA, ompA, ve 23S rRNA primerleri kullanılarak konvansiyonel PCR yapıldı. Çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- Toplanan 540 kene 3 tür kene türünden oluşmaktadır: Rhipicephalus annulatus, Rhipicephalus sanguines, Hyalomma marginatum.

- Çalışmamızda *Francisella tularensis'*e ait tul4 geni tespit edilmemiştir.

- Çalışmamızda 54 gruptan gltA geni pozitif olan 4 grup *Candidatus Rickettsia barbariae* olarak, ompA geni için pozitif olan 8 grup *Rickettsia massiliae* olarak isimlendirilmiştir. Ortak olan 4 grup *Candidatus Rickettsia barbariae* ve *Rickettsia massiliae* olarak isimlendirilmiştir. Pozitiflik oranımız %14,8 olup Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarla uyumludur.
- Pozitif grup sayısı/ toplanan kene sayısı'nın köylere göre dağılımı şu şekildedir:
    - Aliço Pehlivan 0/10
    - Koyuntepe 0/30
    - Yapıldak 3/170 (*Rickettsia massiliae)*
    - Kılıçköy 0/3

- Büyükdoğanca 0/42
- Orhaniye 1/30 (*Rickettsia massiliae)*
- Kızkapan 2/165 (*Candidatus Rickettsia barbariae* ve *Rickettsia massiliae)*
- Karahisar 6/90 (*Candidatus Rickettsia barbariae* ve *Rickettsia massiliae)*

ÖZET

Vektör olan keneler insanlara ve hayvanlara taşıdıkları bakteriyel, viral ve paraziter patojenleri bulaştırabilirler. Bu durum insan ve hayvan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı; ülkemizde *Francisella tularensis* ve *Rikettsia spp.*'nin insanlara bulaşmasında önemli bir rol oynayan kenelerin potansiyel rollerinin ortaya çıkarılmasıdır.

Haziran ve Eylül 2023 tarihleri arasında Edirne Keşan köyleri olan Karahisar, Kılıçköy, Kızkapan, Orhaniye, Büyükdoğanca ve İpsala köyleri olan Yapıldak, Koyuntepe, Aliçopehlivan köylerinde merada otlanan ahır hayvanlarının üzerinden toplanan 540 adet kene çalışmaya dahil edildi. Bu keneler havuzlama sistemi kullanılarak 54 farklı gruba ayrıldı. Her grup için DNA ekstraksiyonu yapıldı. *Francisella tularensis* için tul4 geni, *Rickettsia spp*. için ompA, gltA, 23 sRNA genlerine bakıldı.

Çalışmamızda *Francisella tularensis'*e ait tul4 geni tespit edilmemiştir. Sonuçlar belirlenen köylerde toplanan kenelerde *Francisella tularensis* olmadığını göstermektedir.

Yapılan analizler sonucunda 54 grupta, *Rickettsia spp*. için 4 grupta ompA geni, 8 grupta gltA geni geni pozitif bulunmuştur. 23S rRNA geni tespit edilememiştir. Farklı olan 2 gruba sekanslama analizi yaptırılmıştır. Sekanslama dizi analizi sonucunda gltA geni pozitif olan 4 grup *Candidatus Rickettsia barbariae* olarak, ompA geni için pozitif olan 8 grup *Rickettsia*

massiliae olarak isimlendirilmiştir. Ortak pozitif olan 8, 10, 20, 23 grupları *Candidatus Rickettsia barbariae* ve *Rickettsia massiliae* olarak isimlendirilmiştir.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 2023/18.

Anahtar kelimeler: *Francisella tularensis, Rickettsia spp*., ixodes kene, PCR

Molecular Detection of *Francisella tularensis* and *Rickettsia spp*. in Ticks Collected on Animals in the Pasture, EDIRNE

SUMMARY

Ticks, which are vectors, can transmit bacterial, viral and parasitic pathogens to humans and animals. This situation poses a significant threat to human and animal health. The purpose of this study; The aim is to reveal the potential roles of ticks, which play an important role in the transmission of *Francisella tularensis* and *Rickettsia spp*. to humans in our country.

Between June and September 2023, 540 ticks collected from animals grazing in the pastures in Edirne Keşan villages of Karahisar, Kılıçköy, Kızkapan, Orhaniye, Büyükdoğanca and İpsala villages of Yapıldak, Koyuntepe and Aliçopehlivan were included in the study. These ticks were divided into 54 different groups using a pooling system. DNA extraction was performed for each group. The tul4 gene for Francisella tularensis, Rickettsia spp. ompA, gltA, 23 sRNA genes were examined.

In our study, the tul4 gene of *Francisella tularensis* was not detected. The results show that there is no *Francisella tularensis* in the ticks collected in the determined villages.

As a result of the analysis, *Rickettsia spp*. was detected in 54 groups. ompA gene was found positive in 4 groups and gltA gene was found positive in 8 groups. The 23S rRNA gene could not be detected. Sequencing analysis was performed in 2 different groups. As a result of

sequencing analysis, 4 groups positive for the gltA gene were named *Candidatus Rickettsia barbariae*, and 8 groups positive for the ompA gene were named *Rickettsia massiliae*. The common positive groups 8, 10, 20, 23 were named *Candidatus Rickettsia barbariae* and *Rickettsia massiliae.*

This study was funded by Scientific Research Projects Unit of Trakya University Project number: 2023/18.

Keywords: *Francisella tularensis, Rickettsia spp*., ixodes ticks, PCR

KAYNAKLAR

1. Springer A, Glass A, Probst J, Strube C. Tick-borne zoonoses and commonly used diagnostic methods in human and veterinary medicine. Parasitol Res 2021;120(12):4075-90.
2. Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. Infect Dis Clin North Am 2008;22(2):195-215, v.
3. Inci A, Yildirim A, Duzlu O, Doganay M, Aksoy S. Tick-Borne Diseases in Turkey: A Review Based on One Health Perspective. PLoS Negl Trop Dis 2016;10(12):e0005021.
4. Gürcan S. [Francisella tularensis and tularemia in Turkey]. Mikrobiyol Bul 2007;41(4):621-36.
5. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann N Y Acad Sci 2007;1105:1-29.
6. Kılıç S. Biyolojik Silah Olarak Bakteriler:"Kategori A ajanlar". Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2006;63(1):21-46.
7. KY M. Mediterranean spotted fever in Israel: a tick-borne disease. IMAJ 2002;4:44-9.
8. Hirschmann J. From squirrels to biological weapons: the early history of tularemia. The American journal of the medical sciences 2018;356(4):319-28.
9. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. Jama 2001;285(21):2763-73.
10. Telford III SR, Goethert HK. Ecology of Francisella tularensis. Annual review of entomology 2020;65:351-72.

11. Chróst A, Gielarowiec K, Kalużewski S, Rastawicki W. The occurrence of infections caused by Francisella tularensis in humans in Poland and laboratory diagnosis of tularemia. Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia 2017;69(1):55-63.

12. Green R. The occurrence of Bact. tularense in the eastern wood tick, Dermacentor variabilis. American Journal of Epidemiology 1931;14(3):600-13.

13. Ellis J, Oyston P, Green M, Titball R. Tularemia Clin Microbiol Rev, 15 (2002). View in Scopus 631-46.

14. Cronquist SD. Tularemia: the disease and the weapon. Dermatologic clinics 2004;22(3):313-20.

15. Hüseyin K. Die Tularämie in der Türkei. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1937;119(4):425-30.

16. Gürcan S. Francisella tularensis and tularemia in Turkey. Mikrobiyoloji bulteni 2007;41(4):621-36.

17. Gürcan Ş. Epidemiology of tularemia. Balkan medical journal 2014;2014(1):3-10.

18. NCBI: National Center for Biotechnology Information [Internet] [cited 2024 May 7]. Available from:(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=262).

19. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. Francisella tularensis: an arthropod-borne pathogen. Veterinary research 2009;40(2).

20. Senol M, Ozcan A, Karincaoglu Y, Aydin A, Ozerol I. Tularemia: a case transmitted from a sheep. Cutis 1999;63(1):49-51.

21. Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, Jorgensen TR, Cotter B, Lieftucht A, et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. Emerging infectious diseases 2002;8(1):69.

22. Jellison WL, Kohls GM, Butler W, Weaver JA. Epizootic Tularemia in the Beaver, Castor canadensis, and the Contamination of Stream Water with Pasteurella tularensis. 1942.

23. Parker RR, Steinhaus E, Kohls G, Jellison W. Contamination of natural waters and mud with Pasteurella tularensis and tularemia in beavers and musk-rats in the Northwestern United States 1951.

24. Oyston PC. Francisella tularensis vaccines. Vaccine 2009;27:D48-D51.

25. Friend M. Disease emergence and resurgence: the wildlife-human connection: US Department of the Interior, US Geological Survey; 2006.

26. Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. Veterinary research 2009;40(2).

27. Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. Frontiers in cellular and infection microbiology 2017;7:281.

28. NCBI: National Center for Biotechnology Information [Internet]. [cited 2024 May 7]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6939.

29. Overholt EL, Tigertt W, Kadull PJ, Ward MK, David CN, Rene RM, et al. An analysis of forty-two cases of laboratory-acquired tularemia: treatment with broad spectrum antibiotics. The American journal of medicine 1961;30(5):785-806.

30. Pedati C, House J, Hancock-Allen J, Colton L, Bryan K, Ortbahn D, et al. Notes from the field: increase in human cases of tularemia--Colorado, Nebraska, South Dakota, and Wyoming, January-September 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015;64(47):1317-8.

31. Johansson A, Berglund L, Eriksson U, Göransson I, Wollin R, Forsman M, et al. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. Journal of Clinical Microbiology 2000;38(1):22-6.

32. Guryčová D. First isolation of Francisella tularensis subsp. tularensis in Europe. European journal of epidemiology 1998;14:797-802.

33. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology: Jones & Bartlett Learning; 2020.

34. CDC: Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. [cited 2024 May 7]. Available from: https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=12438.

35. CDC: Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. [cited 2024 May 7]. Available from: https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=12440.

36. Francis, E. and A.C. Evans, Agglutination, cross-agglutination, and36. Francis E, Evans AC. Agglutination, cross-agglutination, and agglutinin absorption in tularaemia. Public Health Reports (1896-1970) 1926:1273-95.

37. Ransmeier JC, Ewing CL. The agglutination reaction in tularemia. The Journal of Infectious Diseases 1941:193-205.

38. Massey ED, Mangiafico JA. Microagglutination test for detecting and measuring serum agglutinins of Francisella tularensis. Applied Microbiology 1974;27(1):25-7.

39. Celebi B, Kılıç S. Development of a novel Francisella tularensis antigen stained with tetrazolium-blue for tularemia microagglutination test. Mikrobiyoloji Bulteni 2013;47(3):514-22.

40. Larsson P, Oyston PC, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius H-H, et al. The complete genome sequence of Francisella tularensis, the causative agent of tularemia. Nature genetics 2005;37(2):153-9.

41. Gunnell MK, Adams BJ, Robison RA. The genetic diversity and evolution of Francisella tularensis with comments on detection by PCR. Current Issues in Molecular Biology 2016;18(1):79-92.

42. Yuan B-f, Hao Y-h, Tan Z. Universal sensing strategy for the detection of nucleic acid targets by optical biosensor based on surface plasmon resonance. Clinical chemistry 2004;50(6):1057-60.

43. Klimpel GR, Eaves-Pyles T, Moen ST, Taormina J, Peterson JW, Chopra AK, et al. Levofloxacin rescues mice from lethal intra-nasal infections with virulent Francisella tularensis and induces immunity and production of protective antibody. Vaccine 2008;26(52):6874-82.

44. Boisset S, Caspar Y, Sutera V, Maurin M. New therapeutic approaches for treatment of tularaemia: a review. Frontiers in cellular and infection microbiology 2014;4:40.

45. Kaushal A, Gupta K, Shah R, van Hoek ML. Antimicrobial activity of mosquito cecropin peptides against Francisella. Developmental & Comparative Immunology 2016;63:171-80.

46. Sarkarai Nadar V, Chen J, Dheeman DS, Galvan AE, Yoshinaga-Sakurai K, Kandavelu P, et al. Arsinothricin, an arsenic-containing non-proteinogenic amino acid analog of glutamate, is a broad-spectrum antibiotic. 2019.

47. Gedikoğlu S. Francisella tularensis isolation from various clinical specimens. Clinical Microbiology and Infection 1996;2(3):233-5.

48. Helvacı S, Gedikoğlu S, Akalın H, Oral HB. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. European Journal of Epidemiology 2000;16:271-6.

49. Helminiak L, Mishra S, Kim HK. Pathogenicity and virulence of Rickettsia. Virulence 2022;13(1):1752-71.

50. Abdad MY, Abdallah RA, Karkouri KE, Beye M, Stenos J, Owen H, et al. Rickettsia gravesii sp. nov.: a novel spotted fever group rickettsia in Western Australian Amblyomma triguttatum triguttatum ticks. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2017;67(9):3156-61.

51. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clinical microbiology reviews 1997;10(4):694-719.

52. Ngwamidiba M, Blanc G, Ogata H, Raoult D, FOURNIER PE. Phylogenetic Study of Rickettsia Species Using Sequences of the Autotransporter Protein-Encoding Gene sca2. Annals of the New York Academy of Sciences 2005;1063(1):94-9.

53. Blanton LS. The rickettsioses: a practical update. Infectious Disease Clinics 2019;33(1):213-29.

54. Kim HK, Premaratna R, Missiakas DM, Schneewind O. Rickettsia conorii O antigen is the target of bactericidal Weil–Felix antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences 2019;116(39):19659-64.

55. Mansueto P, Vitale G, Cascio A, Seidita A, Pepe I, Carroccio A, et al. New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. Journal of Immunology Research 2012;2012.

56. Yazid Abdad M, Stenos J, Graves S. Rickettsia felis, an emerging flea-transmitted human pathogen. Emerging Health Threats Journal 2011;4(1):7168.

57. Abdad MY, Abou Abdallah R, Fournier P-E, Stenos J, Vasoo S. A concise review of the epidemiology and diagnostics of rickettsioses: Rickettsia and Orientia spp. Journal of clinical microbiology 2018;56(8):10.1128/jcm. 01728-17.

58. Salje J. Cells within cells: Rickettsiales and the obligate intracellular bacterial lifestyle. Nature Reviews Microbiology 2021;19(6):375-90.

59. Bartlett JG. Rickettsia parkeri: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the united states. Infectious Diseases in Clinical Practice 2004;12(4):261-2.

60. Walker DH. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. Clinical Microbiology Reviews 1989;2(3):227-40.

61. Raoult D, Woodward T, Dumler JS. The history of epidemic typhus. Infectious Disease Clinics 2004;18(1):127-40.

62. Socolovschi C, Pagés F, Raoult D. Rickettsia felis in Aedes albopictus mosquitoes, Libreville, Gabon. Emerging infectious diseases 2012;18(10):1687.

63. Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. Rickettsia phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. PloS one 2008;3(4):e2018.

64. Sahni A, Fang R, Sahni SK, Walker DH. Pathogenesis of rickettsial diseases: pathogenic and immune mechanisms of an endotheliotropic infection. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 2019;14:127-52.

65. Kim HK. Rickettsia-host-tick interactions: knowledge advances and gaps. Infection and Immunity 2022;90(9):e00621-21.

66. CDC: Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. [cited 2024 May 7]. Available from:https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/rickettsial-diseases.

67. Dergousoff SJ, Anstead CA, Chilton NB. Identification of bacteria in the Rocky Mountain wood tick, Dermacentor andersoni, using single-strand conformation polymorphism (SSCP) and DNA sequencing. Experimental and Applied Acarology 2020;80:247-56.

68. McClure EE, Chávez ASO, Shaw DK, Carlyon JA, Ganta RR, Noh SM, et al. Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms. Nature Reviews Microbiology 2017;15(9):544-58.

69. Maurin M, Delbano JN, Mackaya L, Colomb H, Guier C, Mandjee A, et al. Human infection with Schineria larvae. Emerging Infectious Diseases 2007;13(4):671.

70. Eremeeva ME, Silverman DJ. Rickettsia rickettsii infection of the EA. hy 926 endothelial cell line: morphological response to infection and evidence for oxidative injury. Microbiology 1998;144(8):2037-48.

71. Valbuena G, Walker DH. Changes in the adherens junctions of human endothelial cells infected with spotted fever group rickettsiae. Virchows Archiv 2005;446:379-82.

72. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clinical microbiology reviews 2013;26(4):657-702.

73. Nickerson A, Marik PE. Life-threatening ANCA-positive vasculitis associated with rickettsial infection. Case Reports 2012;2012:bcr0320125993.

74. Raoult D, Lakos A, Fenollar F, Beytout J, Brouqui P, Fournier P-E. Spotless rickettsiosis caused by Rickettsia slovaca and associated with Dermacentor ticks. Clinical Infectious Diseases 2002;34(10):1331-6.

75. Barreto ML, Teixeira MG, Carmo EH. Infectious diseases epidemiology. Journal of Epidemiology & Community Health 2006;60(3):192-5.

76. Abdad MY, Cook A, Dyer J, Stenos J, Fenwick SG. Seroepidemiological study of outdoor recreationists' exposure to spotted fever group rickettsia in Western Australia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2014;91(3):584.

77. Kelly DJ, Richards AL, Temenak J, Strickman D, Dasch GA. The past and present threat of rickettsial diseases to military medicine and international public health. Clinical infectious diseases 2002;34(Supplement_4):S145-S69.

78. Veterinary Research [Internet]. [cited 2024 May 7]. Available from:*https://www.vetres.org/articles/vetres/full_html/2009/02/v09177/v09177.html.*

79. Ebani VV, Mancianti F. Potential Role of Avian Populations in the Epidemiology of Rickettsia spp. and Babesia spp. Veterinary Sciences 2021;8(12):334.

80. Luce-Fedrow A, Mullins K, Kostik AP, St John HK, Jiang J, Richards AL. Strategies for detecting rickettsiae and diagnosing rickettsial diseases. Future microbiology 2015;10(4):537-64.

81. Whitman TJ, Richards AL, Paddock CD, Tamminga CL, Sniezek PJ, Jiang J, et al. Rickettsia parkeri infection after tick bite, Virginia. Emerging infectious diseases 2007;13(2):334.

82. Karanth SS, Gupta A, Prabhu M. Pure cerebellitis due to scrub typhus: a unique case report. Tropical Doctor 2013;43(1):41-2.

83. Shepard C, Redus M, Tzianabos T, Warfield D. Recent experience with the complement fixation test in the laboratory diagnosis of rickettsial diseases in the United States. Journal of Clinical Microbiology 1976;4(3):277-83.

84. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. Journal of clinical microbiology 1997;35(11):2715-27.

85. Halle S, Dasch GA, Weiss E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against typhus rickettsiae, Rickettsia prowazekii and Rickettsia typhi. Journal of Clinical Microbiology 1977;6(2):101-10.

86. Paris DH, Dumler JS. State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: the use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus. Current opinion in infectious diseases 2016;29(5):433-9.

87. Kim Y-J, Yeo S-J, Park S-J, Woo Y-J, Kim M-W, Kim S-H, et al. Improvement of the diagnostic sensitivity of scrub typhus using a mixture of recombinant antigens derived from Orientia tsutsugamushi serotypes. Journal of Korean medical science 2013;28(5):672.

88. Robinson MT, Satjanadumrong J, Hughes T, Stenos J, Blacksell SD. Diagnosis of spotted fever group Rickettsia infections: the Asian perspective. Epidemiology & Infection 2019;147:e286.

89. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. [cited 2024 May 7]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

90. Gotschlich E, Berkin T. 1936 Yılında Trakyada Tularemiye Ait Yapılan Epidemiyolojik ve Bakteriyolojik Araştırmalar. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2007;64 (1):71-5.

91. Akalın H, Helvacı S, Gedikoğlu S. Re-emergence of tularemia in Turkey. International Journal of Infectious Diseases 2009;13(5):547-51.

92. Bakış GB. A general overview of Francisella tularensis and the epidemiology of tularemia in Turkey. Flora 2010;15(2):37-58.

93. Tukmechi A, Ownagh A, Enferadi A, Khademi P. First molecular detection of Francisella tularensis in turtle (Testudo graeca) and ticks (Hyalomma aegyptium) in Northwest of Iran. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 2024;23:100892.

94. Yousefi-Behzadi M, Moazzezy N, Rohani M, Naddaf SR, Mostafavi E, Mohamadi A, et al. Identification of Intestinal Fungal Microflora and Bacterial Pathogens in the Collected Adult Ixodes ricinus from the Northern Provinces of Iran. Journal of Arthropod-Borne Diseases 2022;16(2):97.

95. Stensvold CR, Al Marai D, Andersen LOB, Krogfelt KA, Jensen JS, Larsen KS, et al. Babesia spp. and other pathogens in ticks recovered from domestic dogs in Denmark. Parasites & vectors 2015;8:1-4.

96. Duzlu O, Yildirim A, Inci A, Gumussoy KS, Ciloglu A, Onder Z. Molecular investigation of Francisella-like endosymbiont in ticks and Francisella tularensis in ixodid ticks and mosquitoes in Turkey. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2016;16(1):26-32.

97. Akveran GA, Karasartova D, Keskin A, Comba A, Celebi B, Mumcuoglu KY, et al. Bacterial and protozoan agents found in Hyalomma aegyptium (L., 1758)(Ixodida: Ixodidae) collected from Testudo graeca L., 1758 (Reptilia: Testudines) in Corum Province of Turkey. Ticks and tick-borne diseases 2020;11(5):101458.

98. Gunes T, Ataş M. The prevalence of tick-borne pathogens in ticks collected from the northernmost province (Sinop) of Turkey. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2020;20(3):171-6.

99. Heger F, Schindler S, Pleininger S, Fueszl A, Blaschitz M, Lippert K, et al. Three Cases of Tickborne Francisella tularensis Infection, Austria, 2022. Emerging Infectious Diseases 2023;29(11):2349.

100. Yeşilyurt M, Kılıç S, Cağaşar O, Celebi B, Gül S. Two cases of tick-borne tularemia in Yozgat province, Turkey. Mikrobiyoloji bulteni 2011;45(4):746-54.

101. Kılıç S. Francisella tularensis ve Türkiye'de tularemi epidemiyolojisine genel bir bakış. Flora 2010;15(2):37-58.

102. Yilmaz E, Akalin H, Mistik R, Heper Y, Engin A, Kilicaslan E, et al. Mediterranean spotted fever: retrospective evaluation of 16 cases. Trakya Universitesi Tip Fakultesi Dergisi 2010;27(2).

103. Ay B, Çalık Ş, Karaca B, Tosun S. An atypic form of mediterranean spotted fever: First report in Aegean site of Turkish literature. Anatolian Journal of General Medical Research 2016;26(2):175-7.

104. Kuloglu F, Rolain JM, Akata F, Eroglu C, Celik AD, Parola P. Mediterranean spotted fever in the Trakya region of Turkey. Ticks and tick-borne diseases 2012;3(5-6):298-304.

105. Özgunes N, Ergen P. Yaz› c› S, Aksoy Y, Bekler G, Sarg› n F: Yirmi riketsiyoz vakas›. Klimik Dergisi 2001;14:91-2.

106. Getange D, Bargul JL, Kanduma E, Collins M, Bodha B, Denge D, et al. Ticks and tick-borne pathogens associated with dromedary camels (Camelus dromedarius) in northern Kenya. Microorganisms 2021;9(7):1414.

107. Williamson PC, Billingsley PM, Teltow GJ, Seals JP, Turnbough MA, Atkinson SF. Borrelia, Ehrlichia, and Rickettsia spp. in ticks removed from persons, Texas, USA. Emerging infectious diseases 2010;16(3):441.

108. Blanda V, Torina A, La Russa F, D'Agostino R, Randazzo K, Scimeca S, et al. A retrospective study of the characterization of Rickettsia species in ticks collected from humans. Ticks and tick-borne diseases 2017;8(4):610-4.

109. Ji S, Ceylan O, Ma Z, Galon EM, Zafar I, Li H, et al. Protozoan and rickettsial pathogens in ticks collected from infested cattle from Turkey. Pathogens 2022;11(5):500.

110. Gargili A, Palomar AM, Midilli K, Portillo A, Kar S, Oteo JA. Rickettsia species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. Vector-Borne and zoonotic diseases 2012;12(11):938-41.

111. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis 2020;94(1):91-5.

112. Çelebi B, Yeşilyurt M, Kılıç S. A Rickettsia case caused by Rickettsia conorii. Mikrobiyoloji Bulteni 2018;52(4):431-8.

113. Emiroglu M, Celebi B, Alkan G, Yilmaz Y. The first human case of Rickettsia slovaca from Turkey. Ticks and Tick-borne Diseases 2021;12(5):101755.

114. Ozturk MK, Gunes T, Kose M, Coker C, Radulovic S. Rickettsialpox in Turkey. Emerging infectious diseases 2003;9(11):1498.

115. İnci A, Yıldırım A, Düzlü Ö. The current status of ticks in Turkey: a 100-year period review from 1916 to 2016. Turkiye Parazitolojii Dergisi 2016;40(3):152-7.

116. Keskin A, Bursali A, Keskin A, Tekin S. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in ticks removed from humans in Turkey. Ticks and tick-borne diseases 2016;7(5):951-3.

117. De Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato C, Torgal J, et al. Rickettsia sibirica isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. Emerging infectious diseases 2006;12(7):1103.

118. Seidi S, Omidi AH, Esmaeili S. Distribution of different Rickettsia species in countries of the WHO Eastern Mediterranean (WHO-EMRO) region: An overview. Travel Medicine and Infectious Disease 2024:102695.

119. Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. Vet Res 2009;40(2):34.

EKLER

Ek 1

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOBAEK 2022/356	
	PROTOKOL ADI	Merada Hayvanlar Üzerinden Toplanan Kenelerde Moleküler Yöntemle Francisella Tularensis ve Rickettsia Spp'nin Araştırılması, Edirne	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi İsmail DAVARCI	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:20/04**	**Tarih:17.10.2022**	
	Fakültemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi İsmail DAVARCI'nın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOBAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülsüm ÖNAL Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN Başkan Yardımcısı	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Selçuk KORKMAZ Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Mehmet Erdal VARDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sernaz TOPALOĞLU Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Sezgi SARIKAYA SOLAK Üye	Deri ve Zührevi Hastalıklar	T.Ü.T.F. Deri ve Zührevi Hastalıklar A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Filiz TÜTÜNCÜLER KÖKENLİ Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Doğan ALBAYRAK Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Burhan Can ÇANAKÇI Üye	Endotonti	T.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi	E	E H	E H	
Doç. Dr. Hilal KEKLİCEK Üye	Protez-Ortez ve Biyomekani	T.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi	K	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye	Emekli Öğretmen	Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Ek 2

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

PROJE NO: 2023/18
PROJE NİTELİĞİ: TIPTA UZMANLIK

1-PROJE BAŞLIĞI

Merada Hayvanlar Üzerinden Toplanan Kenelerde Moleküler Yöntemle Francisella tularensis ve Rickettsia spp'nin araştırılması, Edirne

2-PERSONEL BİLGİLERİ

	Adı ve Soyadı	Unvanı	Telefon
Proje Yöneticisi	Dr.Öğr.Üyesi İsmail DAVARCI	Dr.Öğr.Üyesi	
Araştırmacılar	Arş.Gör.Dr. Eda KIRILMAZ	Arş.Gör.Dr.	

3-PROJE BÜTÇESİ

Teçhizatın Tanımı :	**Detay listesi ektedir.**
Ekonomik Kod	**Toplam Fiyatı (TL)**
830.03.02 TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	12.010,00
830.03.05 HİZMET ALIMLARI	49.991,00
TOPLAM ÖDENEK	62.001,00

3-PROJE GELİŞİMİ

1.Projenin Kabul Tarihi: 08-03-2023		
2.Projenin Başlama Tarihi :17-03-2023	**1.Ara Rapor** : 16-09-2023	**Sonuç :** ..... (+ / -)
3.Projenin Bitiş Tarihi : 16-09-2024	**2.Ara Rapor** : 16-03-2024	**Sonuç :** ..... (+ / -)
4.Projenin Süresi: 18 Ay	**Sonuç Raporu** : 16-09-2024	**Sonuç :** ..... (+ / -)

5.İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE:

Tıp Fakültesi / Temel Tıp Bilimleri Bölümü

6.PROJENİN UYGULAMASI

1. Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58.maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülür.
2. Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.
3. Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.
4. Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.
5. Süresi geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.

	Adı-Soyadı	**Tarih**	**İmza**
Proje Yöneticisi :	Dr.Öğr.Üyesi İsmail DAVARCI	27.03.2023	

Komisyon Başkanı

Prof. Dr. O
Rel