

## Koyunlarda Tularemi'nin serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi

Derya KARATAŞ YENİ<sup>1</sup>, Müjgan İZGÜR<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Md. Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 24.01.2015, Kabul Tarihi / Accepted: 27.07.2015

**Özet:** Bu çalışmada önemli bir zoonoz enfeksiyon olan Tularemi'nin tespiti için koyunların serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, Tularemi enfeksiyonunun insanlarda endemik olarak görüldüğü ve son çalışmalarda yaygın olduğu tespit edilen bölgelerden (Ankara; Altındağ, Beypazarı, Bursa; Kemalpaşa, Zonguldak; Kurtköy) koyun kan serumları toplandı. Bu serumlardaki Tularemi antikor varlığını belirlemek için safranin-O ile boyalı *Francisella tularensis* subsp. holartica LVS suşundan hazırlanmış antijeni (*F. tularensis* 10857 NTCC) ile mikroaglutinasyon testi yapıldı. Test sonucunda incelenen 207 koyun kan serumundan 50'sinde (%24.1) 1:10-1:80 arasında titre saptanırken 157 (%75.9) serumda *F. tularensis* özgül antikorlar belirlenemedi. *F. tularensis* antikorları pozitif bulunan 50 serumun 36 (%72)'sında ise hayvanlar da Tularemi için çeşitli araştırmalarda pozitif kabul edilen  $\geq 1/20$  titresi tespit edildi. Titre veren 50 serumdan 6'sında ise, *Brucella* Mikro Aglutinasyon Test (MAT) antijeni (*B. abortus* S99 suşu safranin- O ile boyalı) ile çapraz reaksiyon (1:40-1:160) varlığı saptandı.

**Anahtar kelimeler:** *Brucella* spp, Çapraz Reaksiyon, Koyun, Seroloji, Tularemi.

### Determination of the cross reaction of Tularemia titer and *Brucella* on sheep at specific disease focus in Turkey

**Abstract:** As Tularemia is an important zoonosis infection the determination of Tularemia titer serologically on sheep and its cross reaction with is aimed in this study. For this study sheep blood sera collected from the regions (Ankara; Altındağ-Beypazarı, Bursa; Kemalpaşa, Zonguldak; Kurtköy) where Tularemia infection is seen endemically and widespread. In order to indicate Tularemia titer in these sera Tularemia antibody, which is painted with safranin-O, and microagglutination test were done. 207 sheep blood sera were checked and at test result 1:10-1:80 titer indicated in 50 blood sera (%24,1) but it wasn't indicated any titer in 157(%75,9) sera. In 36 serum from 50, in which titer indicated,  $\geq 1/20$  titer, which is accepted in several studies positive for Tularemia was seen. It was seen cross reaction with *Brucella* in 6 blood sera from 50 in which titer indicated.

**Key Words:** *Brucella*, Cross reaction, Serology, Sheep, Tularemia.

### Giriş

Tularemi, kemiriciler öncelikli olmak üzere, hayvanların bir patojeni olan insanlara da bulaşarak çeşitli klinik tablolara sebep olan *Francisella tularensis*'in etken olduğu zoonotik bir hastalıktır [4,10,9]. Ülkemizde son yıllarda pınar suları ile ilişkilendirilen salgınlara yol açması, dünya genelinde ise biyolojik silah olma özelliği nedeniyle güncelleşmiştir [3,7].

Tularemi hastalığı, *F. tularensis*'in etken olduğu kuzey yarım kürede görülen bir zoonoz hastalıktır. Hastalık Japonya ve Rusya'da 1800'lü yıllarda bilinmesine rağmen, 1911 San Francisco depremin-

den sonra McCoy tarafından Kaliforniya'nın Tulare bölgesinde sincaplarda görülen veba benzeri bir hastalık olarak tanımlanmıştır [14].

Dünyada ve ülkemizde riskli bölge yerleşim birimi hızla artan ve güncelliğini koruyan bu hastalığın rezervuarı tam olarak bilinmemektedir. Son yıllarda ülkemizde tularemi vakalarında artış olmasında, iklim değişikliklerin büyük oranda rol oynadığı bildirilmektedir [12]. Yağışlı sezonlardan sonra kemirici popülasyonundaki artışın tularemi vaka sayısının artmasına neden olduğu düşünülmektedir [1]. Tularemi, 2005 yılı öncesinde Marmara ve Batı Karadeniz Bölgelerinde yaygın olarak görülmürken, 2009-2010 yıllarının ilk yarısında özellikle

İç Anadolu Bölgesi olmak üzere diğer bölgelerden yeni vakalar bildirilmiştir [1]. Kemirici hayvanların çıkartıları ve dokularıyla temas, kontamine su ve gıdaların tüketilmesi avcılık ve vahşi tavşan etinin yenmesi, hijyenik olmayan gıdaların tüketilmesi, ev ve çevresinde kemirici sayısında belirgin artış gözlenmesi ile doğayla ilişkili aktiviteler gibi bağımsız değişkenler hastalığın epidemiyolojik risk faktörleri arasında yer almasına neden olmuştur [1].

Tularemi kesin tanı bakterinin çeşitli örneklerden izolasyonu ile konur. Ancak üretmek için özel besiyeri gerektiğinden tanı daha çok serolojik olarak konur.

Evcil hayvanlar arasında koyunlar tularemiye duyarlıdır, ancak hastalık kedi, tavşan, köpek, domuz ve atlarda da bildirilmiştir. Sığırların ise genellikle hastalığa karşı dirençli olduğu bilinmektedir. Enfeksiyonun prevalansını belirlemeye yönelik, evcil hayvanlarda klinik hastalıkların sunumu ve prevalansına dair bilgiler oldukça kısıtlıdır [13].

Tularemi tanısında en sık kullanılan yöntemler hasta serumunda antikor aramaya yönelik aglütinasyon (mikropleyt aglütinasyon testi veya tüp aglütinasyonu) ve ELISA'dır. Tularemi antikorları genellikle ikinci haftadan sonra pozitifleşir, 4-5. haftalarda en yüksek düzeye ulaşır [8].

Tularemi antikorları *Brucella*, *Yersinia* ve *Proteus OX19* ile çapraz reaksiyon verebilir. *Brucella* spp. ile *Francisella tularensis* arasında ortak antijenik yapılar nedeniyle serolojik testlerde çapraz reaksiyonların varlığı tularemi hastalığının ilk tanımlandığı yıllarda dikkat çekmiştir [6,8,15]. Hayvanlar üzerinde tularemi yönüyle yapılan çalışmaların kısıtlılığı göz önüne alınarak, bu çalışmada Tularemiye duyarlılığı ile bilinen koyunların serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* ile *Francisella tularensis* arasındaki çapraz reaksiyonların sıklığının belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metod

Bu çalışmada, Tulareminin tespiti için koyunların serolojik olarak incelenmesi ve *Brucella* spp. ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi amacıyla enfeksiyonun insanlarda endemik olarak görüldüğü ve son çalışmalarda yaygın olduğu tespit edilen bölgelerden

(Ankara; Altındağ, Beypazarı, Bursa; Kemalpaşa, Zonguldak; Kurtköy) toplamda 207 adet koyun kan serumu incelenmiştir. Koyunların vena jugularisinden 9 ml. lik vakumlu jelli tüplere kanlar alındı. Kan numuneleri, 1500 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar 2 ml. lik tüplere aktarıldı. Bu serumlardaki Tularemi antikor varlığını belirlemek için safranin- O ile boyalı *Francisella tularensis* subsp. holartica LVS suşundan hazırlanmış antijeni (*F. tularensis* 10857 NTCC) ile mikroaglütinasyon testi yapıldı (kılıç çapraz reaksiyon). Her iki etkene karşı gelişen antikorları saptamak amacıyla MA testi için U-tabanlı mikropleytlere serum örneklerinin iki katlı seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Serum içermeyen son godeler ise antijen kontrol için kullanılmıştır. Godelerdeki serum dilüsyonlarının üzerine eşit miktarda boyalı antijenler eklenecek şekilde serum dilüsyonları elde edilmiştir. Mikropleytin üzeri kapakla kapatılarak 37°C'de nemli ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirme; pozitif ve negatif kontroller ile antijen kontrolüne göre yapıldı. Antijen-antikor kompleksinin dantela tarzında çökmesi ve süpernatantın tümüyle berrak olması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Açık kırmızı renkli dilüentin çevrelediği merkezde toplanmış düzgün kenarlı düğme şeklinde çökme negatif reaksiyon şeklinde değerlendirildi [8]. Çapraz reaksiyonları görmek amacıyla, çeşitli literatürlerde tularemi yönünden anlamlı kabul edilen 1/20 üzeri titre veren koyun kan serumu örneklerini, *Brucella* Mikro Aglütinasyon Teste tabi tutarak (*B. abortus* S99 suşu safranin O ile boyalı) çapraz reaksiyon yönünden incelendi (Tablo 1).

## Bulgular

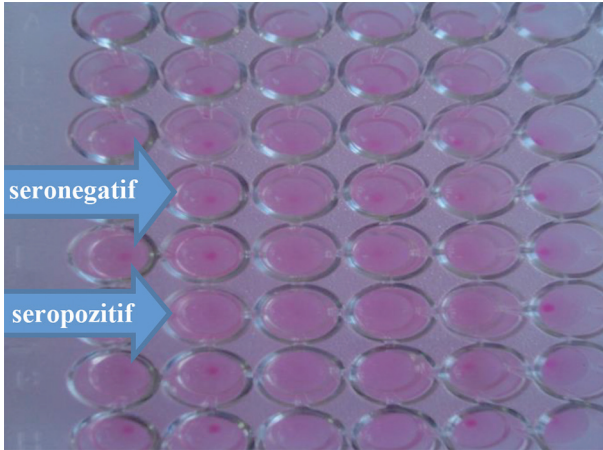
Tularemi açısından incelenen 207 koyun kan serumundan 36 (%17.3)'ünde çeşitli araştırmalarda hayvanlarda Tularemi için pozitif kabul edilen  $\geq 1/20$  titresini belirlendi. Toplanan 207 koyun kan serumunun titre dağılımı; 11'inde 1:10, 31'inde 1:20, 3'ünde 1:40 2'sinde 1:80 olarak saptandı (Tablo 2). Tularemi seropozitif 50 kan serumundan 6 (%12)'ünde 1:40-1:80 arasında titreler saptanmış, *Brucella* Mikro Aglütinasyon Test (MAT) antijeni (*B. abortus* S99 suşu safranin O ile boyalı) ile çapraz reaksiyon bulunmuştur (Tablo 2).

**Tablo 1.** Çalışmadaki koyunlarda belirlenen mikroaglutinasyon test yöntemi ile belirlenen tularemi titreleri sonuçları.

Yerleşim Birimi	Örnek Sayısı	Pozitif	Tularemi Seropozitif Titrelet							
			%	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
Ankara/Altındağ	46	20	36.95	3	15	1	1	-	-	-
Ankara/Beypazarı	101	17	16.83	7	10	-	-	-	-	-
Zonguldak/Kurtköy	20	1	5	1	-	-	-	-	-	-
Bursa/M.Kemal Paşa	40	12	30	3	6	2	1	-	-	-
Total	207	50	22.7	14	31	3	2	-	-	-

**Tablo 2.** Çalışmadaki koyunlarda Tularemi yönünden seropozitif titrelerin Brusella ile çapraz reaksiyon sonuçları.

Yerleşim Birimi	Örnek Sayısı	Tularemi Seropozitif Örnek Sayısı (>1/20)	Brusella ile çapraz reaksiyon veren örnek sayısı	1/40 1/80 1/160		
				1/40	1/80	1/160
Ankara/Altındağ	46	15	3	-	2	1
Ankara/Beypazarı	101	10	1	1	-	-
Bursa/ M.Kemal Paşa	40	6	2	1	1	-
Total	207	31	6	2	3	1

**Şekil 1.** Mikroaglutinasyon test yönteminde *F. tularensis* seronegatif ve seropozitif görüntüsü

## Tartışma

Tularemi enfeksiyonunun koyunlarda ve diğer yabani hayvanlarda serolojik olarak incelenmesi ve Brusella ile çapraz reaksiyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda farklı bulgular elde edilmiştir.

Gwatkin ve ark. [5], 1942 yılında yaptıkları bir çalışmada, 850 başlık bir koyun sürüsünü tularemi hastalığı yönünden takibe almışlardır. Bu sürüdeki 850 koyundan 24'ünün öldüğü, 5-6'sının ise hastalık sonunda iyileşmiş olduğunu görmüşler-

dir. İncelenen tüm hayvanlarda muayene sırasında çok yoğun kene enfestasyonu olduğu belirtilmiştir. Etkenin varlığını ortaya koymak için ölü koyunlardan 1 koyunda *F. tularensis* izolasyonu gerçekleştirilmişlerdir. Ayrıca iyileşen 2 koyundan serolojik olarak aglutinasyon teste tabi tutmuşlar, serolojik olarak incelemeye alınan 2 koyundan 1'inde 1/400 aglutinasyon titresi bulmuşlardır. Sürüyle ilgilenen bir çobanın hastalandığını, hastalanan çobanın hastalığından 8-9 gün öncesinde sürüdeki koyunlardan 3'ünü yzduğunun bilgisini almışlardır. Bu çalışmalar, tularemi hastalığında insanlar ile koyunlar arası teması belirlemeye örnek teşkil etmiştir.

Şeyda [16], Kars Yöresinde 1600 koyuna ait kan serumu örneğinin mikroaglutinasyon yöntemiyle incelenmesi sonucu 50 hayvanda 1:20 titre üzerini seropozitif olarak bildirmiştir.

Jellison ve ark. [6], ABD'de yaptıkları bir çalışmada, 148 kuzuda %25 oranında *F. tularensis* yönünden seropozitiflik bulmuşlardır. Bu çalışmaya göre 1:20 ve üzeri titre veren kuzular *F. tularensis* seropozitif kabul edilmiştir. Aynı dönemde meradan dönen yetişkinler üzerinde de aynı çalışma yapılmış, 283 koyunda %28.3 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Çapraz reaksiyonun tespiti amacıyla, Tularemi seropozitif olan 83 koyunun Brusella titre tayininde ise yalnız bir koyunda Brusella yönünden seropozitif titre vermiştir.

Mathew ve ark. [11], ABD’de koyunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, dokuz koyun, sekiz tavşan ve sekiz köpek tularemi hastalığı yönünden serolojik olarak incelenmişlerdir. Koyunlarda tamamında 1:40-1:320 arası titre verirken, aynı hayvanlara ait kan serumlarından Brusella ile çapraz reaksiyonu belirlemek amacıyla yapılan serolojik incelemede 7 hayvanda 1:40-1:160 arası titre izlenmiştir. Tavşanlarda yalnız üçünde 1:40 tularemi titresi verirken, Brusella yönünden titre saptanmamıştır. Köpeklerde ise yedisinde 1:40-1:160 tularemi titresi vermiş, Brusella çapraz reaksiyon titresi 6 sında 1:40 oranında saptanmıştır.

Berrada ve ark. [2], Tularemi enfeksiyonun hayvanlarda serolojik çalışmalar yapmışlardır. Bunlardan geyik, köpek, rakun, rat, kokarcada çeşitli yüzdelerde tularemi seropozitiflik saptanırken, tavşan fare ve sincapta tespit edilmemiştir. En yüksek seropozitiflik yüzdeleri kokarca ve rakunlarda belirlenirken, sadece 1 kokarcada ise yüksek oranda tularemi ve aynı zamanda Brusella titresi saptanmıştır.

## Sonuç

Tularemi hastalığının epidemiyolojisinde, koyunlarda seropozitifliğin belirlenmesi önemli bir kriterdir. İnsanlarla hayvanlar arası teması belirleme amacıyla, insan salgınlarının olduğu bölgelerde, hastalığa en çok duyarlı olduğu bilinen koyunlarda seroprevalans çalışmalarının insan hayvan odaklı paralel olarak yürütülmesi gerekmektedir. Ayrıca sıklıkla görülen Bruselloz hastalığı ile ayırıcı tanısının yapılabilmesi için, Tularemi yönünden seropozitiflik saptanan yerleşim birimlerinin Brusella ile çapraz reaksiyon verebileceği göz önünde bulundurularak incelenmelidir. Ayrıca, her iki etkene karşı aglütinlerin saptandığı durumlarda hangisinin çapraz reaksiyon hangisinin gerçek pozitiflik olduğunun gösterilmesi için antikor titre artışının da araştırılması gereklidir [8]. Bundan sonraki çalışmalarda pilot bölgelerin seçilerek, periyodik yoklamaların yapılması, özellikle bu çalışmada da görüldüğü üzere, çapraz reaksiyon veren enfeksiyonlar yönüyle de incelenmesinin, hastalığın seroepidemiolojisine ışık tutacağı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

1. **Anonim**, (2011). *T.C. Sağlık Bakanlığı, Tularemi Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi*, Ankara.
2. **Berrada Z L, Goethert H K, Telford S R**, (2006). *Raccoons and Skunks as Sentinels for Zoonotic Tularemia*. *Emerg Infect Dis*, 12(6), 1019-1021.
3. **Çelebi B, Selçuk KILIÇ, Murat YEŞİLYURT, Bülent ACAR**, (2014). *Francisella tularensis’in Moleküler Tanısında Yeni Geliştirilen Kullanıma Hazır Ticari PCR Kitinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi*. *Mikrobiyol Bul*, 48(1), 135-142.
4. **Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW**, (2002). *Tularemia*. *Clin Microbiol Rev*, 15(4), 631-46.
5. **Gwatkin R, Painter R H, Moynihan I W**, (1942). *Tularemia in Sheep*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 6,163-168.
6. **Jellison Wl, Kohls Gm**, (1950). *Persistence of agglutinins against Pasteurella tularensis in serums of naturally infected sheep*. *J Am Vet Med Assoc*, 117(884),405-408.
7. **Kılıç S**, (2006). *Bacteria As Agents of Biological Weapons: "Category A Agents"*. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 63(1), 21-46.
8. **Kılıç S, Çelebi B, Bayram Y, Çitil B**, (2013). *Francisella tularensis antikorları ile Brucella çapraz reaksiyonlarının araştırılması*. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 70(2), 65-70.
9. **Kilic S, Celebi B, Acar B, Ataş M**, (2013). *In vitro susceptibility of isolates of Francisella tularensis from Turkey*. *Scand J Infect Dis*, 45(5),337-41.
10. **Kilic S**, (2013). *Epidemiological Characteristics of Tularemia in Turkey*. *International Symposium on Francisella tularensis and Tularemia*, 19-23 June, Urgup, Nevşehir, Turkey.
11. **Matthew L, Clifford M, H Donald**, (1978). *A Serological Study of Tularemia in Domestic Animals and the Potential Threat to Humans*. *Ohio j Sci*, 78(2), 92.
12. **Olgen K, Kilic S, Kurtcebe O, Celebi B, Torunoglu M A, Doganay M**, (2013). *Effects of Climate Variability on Tularemia Outbreaks in Turkey: A preliminary Study*. (Poster presentation no: 019) *International Symposium on Francisella tularensis and Tularemia*. 19-23 June, Urgup, Nevşehir, Turkey.
13. **Otlı S**, (2009). *Hayvanlarda Tularemi araştırmaları ve dünyadaki durum*. In: *Francisella tularensis ve Tularemi*. Ed.: Gürcan Ş, *Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*, 161-168.
14. **Sjöstedt A**, (2007). *Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations*. *Ann NY Acad Sci*, 1105, 1-29.
15. **Şeyda T**, (1996). *Kars Bölgesinde Koyunlarda Tularemi Enfeksiyonunun İnsidensi Üzerinde Serolojik ve Kültürel Çalışmalar*. Doktora Tezi, Kafkas Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.