

ISSN 1016-3573



**ETLİK VETERİNER KONTROL MERKEZ
ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ANKARA**



ETLİK VETERİNER MİKROBİYOLOJİ DERGİSİ

**JOURNAL OF ETLİK VETERINARY MICROBIOLOGY
ANKARA – TURKEY**

Cilt/Volume 24 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2013

Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi
Cilt/Volume 24 ♦ Sayı/Number 1 ♦ 2013
Journal of Etlik Veterinary Microbiology
Yılda iki kez yayımlanır / Published two times per year
ISSN 1016-3573

Sahibi

Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Adına
Dr. Özhan Türkyılmaz
Enstitü Müdürü

Editörler Kurulu / Editorial Board

Baş Editör / *Editor-in Chief*
Dr. Özhan Türkyılmaz

Editör Yardımcıları / *Co-Editors*

Doç.Dr. Armağan Erdem Ütük
Dr. Erhan Akçay
Dr. Asiye Dakman
Dr. Elçin Günaydın
Dr. A. Burak Güngör
Dr. F. İpek Keskin
Tahsin Onur Kevenk

Adres / Address

Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
06020 Etlik – Ankara / TÜRKİYE
Tel : 90 (312) 326 00 90 (10 hat)
Faks : 90 (312) 321 17 55

URL : <http://www.etlikvet.gov.tr/tr/page.asp?id=54>
E-posta : ehh.o@merkezet.gov.tr

Hakem Listesi / Referees List*

Doç.Dr. Tülay Akaylı	İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı
Doç.Dr. İbrahim Balkaya	Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Kemal Gürtürk	Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Murat Karahan	Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Ayşe Kılıç	Fırat Üniversitesi, Sivrice Meslek Yüksekokulu
Doç.Dr. Jale Korun	Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı
Doç.Dr. Barış Sareyyüpoğlu	Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yrd.Doç. Dr. Fatmagün Sarıhan	Çukurova Üniversitesi, Yumurtalık Meslek Yüksekokulu
Doç.Dr. Cem Ecmel Şaki	Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
Doç.Dr. Uğur Uslu	Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Rıfat Vural	Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr. Hakan Yardımcı	Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

** İsimler soyada göre alfabetik dizilmiştir ve bu sayıda görev alanlar yazılmıştır.*

ULAKBİM Yaşam Bilimleri ve Türkiye Atıf Dizini veritabanları kapsamında bulunan “çift hakemli” bir dergidir.

Copyright © Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2013, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

Basım Tarihi / Publishing Date: Haziran / June 2013, Baskı adedi / Circulation: 500

Tasarım ve Baskı / Printing



Medisan Yayınevi Ltd.Şti.

Çankırı Cad. 45 / 347 Ulus - Ankara, Türkiye

Tel : +90 312 311 24 26 – 311 00 57 medisanyayinevi@gmail.com

İçindekiler / Contents

Araştırma Makaleleri / Research Articles

Sayfa /Page

Fertilite sorunu olan Alman sıcakkanlı ırkı kısırakların uteruslarından izole edilen bakteri profili ve antimikrobiyal duyarlılıkları

Uterine bacterial profile of Germany warm blood mares with fertility problems and antimicrobial susceptibility

Gülşen Goncagül, Kamil Seyrek İntaş..... 1

Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum, 1792) in the middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, *Lactococcus garvieae*

Türkiye'nin orta Karadeniz Bölgesindeki gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)'nda laktokokkozis ve *Lactococcus garvieae* etkeninin antimikrobiyal duyarlılığı

Türkey Öztürk, Behire Işıl Didinen, Gaye Doğan, Ahmet Özer, Recep Bircan 7

Sivas yöresi köpeklerinde *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansının araştırılması

Investigation of Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dogs in the Province of Sivas

Kürşat Altay, Cahit Babür, Ahmet Duran Ataş, Yunus Emre Beyhan, Erkan Özkan..... 13

Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats in Kilis province

Kilis yöresi keçilerinde anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının araştırılması

Yunus Emre Beyhan, Cahit Babür, Selçuk Pekkaya, Bestami Dalkılıç 17

Derleme / Review

Tularemi

Tularemia

Derya Karataş Yeni 20

Q Humması

Q Fever

Elçin Günaydın, Hamit Kaan Müştak 26

Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi Yayım Koşulları

1. Dergi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün hakemli, bilimsel yayın organı olup, yılda iki defa yayımlanır. Derginin kısaltılmış adı "Etlık Vet Mikrobiyol Derg" dir.

2. Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde veteriner hekimlik alanında yapılan, başka bir yerde yayımlanmamış olan orijinal bilimsel araştırmalar, güncel derleme, gözlem, kısa bilimsel çalışmalar ve enstitüden haberler bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda orijinal olması, en son yenilikleri içermesi, klasik bilgilerin tekrarı olmaması durumunda kabul edilir. Derlemeyi hazırlayan yazarın, o konuda ulusal ya da uluslararası düzeyde orijinal yayın ve araştırmalar yapmış olması koşulu aranır.

3. Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanacak metinler 12 punto Times New Roman yazı karakterinde, düz metin olarak, çift aralıklı ve kenarlarda 30 mm boşluk bırakılarak, A4 formundaki beyaz kağıda yazılmalıdır. Yazıların tamamı, şekil ve tablolar dahil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalarda 16, derlemelerde 10, gözlemlerde 6 ve kısa bilimsel çalışmalarda 4 sayfayı geçmemelidir.

4. Microsoft Word formatındaki metin ile en az 300 dpi çözünürlükteki JPEG formatındaki resim/lerin tamamı etikvetmikrobiyologdergi@gmail.com e-posta adresine gönderilmelidir.

5. Türkçe orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, İngilizce başlık, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar sırası ile hazırlanmalıdır. İngilizce orijinal çalışmalar konu başlığı, yazar/yazarların adları, adresleri, İngilizce özet ve anahtar sözcükler, Türkçe başlık, Türkçe özet ve anahtar sözcükler, giriş, materyal ve metot, bulgular, tartışma ve sonuç, teşekkür ve kaynaklar şeklinde hazırlanmalıdır. Kısa bilimsel çalışmaların ve derlemelerin başlık ve özet bölümleri orijinal çalışma formatında, bundan sonraki bölümleri ise, derlemelerde; giriş, metin ve kaynaklar şeklinde, kısa bilimsel çalışmalarda ise bölümlendirme yapılmadan hazırlanmalıdır.

6. Orijinal çalışmalar ve gözlemler aşağıdaki sıraya göre düzenlenerek yazılmalıdır.

Başlık, kısa, konu hakkında bilgi verici olmalı ve küçük harflerle yazılmalıdır.

Yazar(lar)ın, ad(lar)ı küçük, soyad(lar)ı büyük harflerle yazılmalı ve unvan belirtilmemelidir.

Özet, Türkçe ve İngilizce olarak, tek paragraf halinde ve en fazla 500 sözcük olmalıdır.

Anahtar kelimeler, alfabetik sıraya göre yazılmalı ve 5 sözcüğü geçmemelidir.

Giriş, konu ile ilgili kısa literatür bilgisi içermeli, son paragrafında çalışmanın amacı vurgulanmalı ve iki sayfayı geçmemelidir.

Materyal ve Metot, ayrıntıya girmeden, anlaşılır biçimde yazılmalıdır. Başlıklar kalın, alt başlıklar italik yazı tipiyle belirtilmelidir.

Bulgular bölümünde veriler, tekrarlama yapmadan açık bir şekilde belirtilmelidir. Tablo başlıkları tablonun üstünde, şekil başlıkları ise şeklin altında belirtilmelidir.

Tartışma ve Sonuç bölümünde, araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulguları ile karşılaştırılmalı ve literatüre olan katkısı kısaca belirtilmelidir.

Teşekkür bölümü, gerekli görülüyorsa kaynaklardan hemen önce belirtilmelidir.

Kaynaklar bölümünde, kaynaklar listesi alfabetik ve kronolojik olarak sıralanmalı ve numaralanmalıdır. Metin içerisindeki kaynak, yazar soyadı yazılıp sıra numarası ile; cümle sonunda ise sadece sıra numarası ile parantez içerisinde yazılmalıdır. Cümle sonunda birden çok kaynak belirtilecek ise kaynak numaraları küçükten büyüğe doğru sıralanmalıdır. Metin içerisinde ikiden çok yazarlı kay-

nak kullanımlarında ilk yazarın soyadı yazılmalı diğer yazarlar ise "ve ark." (İngilizce metinlerde "et al.") kısaltması ile belirtilmelidir. Dergi adlarının kısaltılmasında "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" son baskısı esas alınmalıdır. Kaynaklar listesinde yazar(lar)ın aynı yıla ait birden fazla yayını varsa, yayım tarihinin yanına "a" ve "b" şeklinde belirtilmelidir.

Kaynak yazımı ve sıralaması aşağıdaki gibi yapılmalıdır; Süreli Yayın:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle*. J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

Yazarlı Kitap:

Fleiss JI, (1981). *Statistical methods for rates and proportions*. Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

Editörlü Kitap:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

Editörlü Kitapta Bölüm:

Bak J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes*. Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

Kongre Bildirileri:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenetic trematode from the Alosa fallax in Turkey*. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

Tezler:

Aksoy E, (1997). *Sığır Vebası hastalığının histolojik ve immüno-peroksidad yöntemle tanısı üzerine çalışmalar*. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Anonim:

Anonim, (2009). *Contagious equine metritis*. Erişim adresi: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdf>, **Erişim tarihi: 17.10.2009**.

Peter AT (2009). *Abortions in dairy cows*. **Erişim adresi:** <http://www.wcds.afns.ualberta.ca.htm>, **Erişim tarihi: 14.11.2009**.

Yazışma adresi, çok yazarlı çalışmalarda yazışma adresi olarak yazarlardan sadece birinin adı/soyadı, adresi ve e-posta adresi çalışmanın sonunda belirtilmelidir.

7. Latince cins ve tür isimleri italik yazı tipi ile yazılmalıdır. Tüm ölçüler SI (Système Internationale)'ye göre verilmelidir.

8. Dergide yayımlanmak üzere gönderilen makaleler tüm yazarlar tarafından imzalanan "Yayın Hakkı Devri Sözleşmesi" ve başvuru ilişkin bir dilekçe ile birlikte gönderilmelidir. Yayımlanması uygun görülen çalışmalar, istendiğinde Yayım Komitesi'nin basıma ilişkin kararı, yazar(lar)ına bildirilir.

9. Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi'nde yayımlanacak olan, hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda "Etik Kurul Onayı Alınmıştır" ifadesi aranır.

10. Gönderilen yazıların basım düzeltmeleri orijinal metne göre yapıldığından, yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

11. Ürünlerin ticari adları ile karşılaştırılmalarına yönelik araştırmalar derginin ilgi kapsamı dışındadır.

12. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

13. Şayet varsa araştırmanın desteklediği kurum adı ve proje numarası belirtilmelidir.

14. Dergiye gönderilen yazılar geliş tarihine göre yayımlanır.

15. Yayımlanmayan yazılar, yazarına iade edilmez.

Journal of Etlik Veterinary Microbiology Publication Conditions

1. The Journal is a refereed, scientific publication of Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Directorate of Etlik Veterinary Control Central Research Institute and is published two issues in a year. The abbreviation of the journal is "J Etlik Vet Microbiol".

2. In the Journal of Etlik Veterinary Microbiology, original research articles, actual reviews, case reports, short communications on the issue of veterinary medicine whose one part or whole have not been published in any other place before, and news from the institute are published. The review articles will be accepted only if they are original, actual and not repeating the classical knowledge. The author of the review is asked to possess original publications or researches on the subject at national or international levels.

3. Manuscripts that will be prepared in Turkish and English should be typed as a full text, on A4 paper with 12 pt, in Times New Roman typing character, double-spaced and with 30 mm space in both sides of the paper. Manuscripts including figures and tables should not exceed 16 pages for original research articles, 10 pages for reviews, 6 pages for case reports and 4 pages for short communications.

4. Manuscript written in Microsoft Word format and figures in JPEG format at minimum 300 dpi resolution should be submitted to etlikvetmikrobiyolderg@gmail.com

5. Original research articles and case reports should include in following rank: title, name(s) of the author(s), their addresses, abstract and key words in English, title, abstract and key words in Turkish, introduction, material and method, findings, discussion and conclusion, acknowledgements and references. In short communications and reviews, divisions except summaries should be omitted.

6. Original research articles and case reports should be arranged and composed as in the following.

Title should be brief, explanatory and written in small caps. Explanation(s) about the study should be written as footnotes.

Author(s) should be mentioned by their names and surnames; their surnames should be written in capital letters and author(s) title should not be mentioned.

Summary should be in Turkish and English, single paragraph and composed of at most about 500 words.

Key Words should be written in alphabetical order and should not exceed 5 words.

Introduction not exceeding two pages should include a short review of the literature related with the subject and in the end paragraph; the aim of the study should be mentioned.

Material and Method should be written in an essential and comprehensible manner without getting into details. Subtopics should be mentioned first in bold and after in italic type.

Findings should be shortly explained and data should not be repeated within the text. Legends should be indicated at the top of each table, whereas should be indicated at the bottom of each figure and print. Vertical lines are not allowed in tables.

Discussion and Conclusion must include the evaluation and comparison of results with other researchers' findings. The study's contributions to the existing literature should also be explained briefly.

Acknowledgements must be indicated before references if necessary.

References should be listed alphabetically and chronologically by numbers. In the body of text, reference must be shown by author's surname and list number or only by list number within parenthesis. If there is more than one reference that refers to the same issue, these should be arranged by smallest to biggest reference list numbers at the end of sentence. If the reference is more than two

authors, the surname of the first author should be written and other authors should be mentioned with the abbreviation of "et al.". For the abbreviation of journals, the latest edition of the "Periodical Title Abbreviations: By Abbreviation" should be taken as basis. If the author(s) have more than one publication within the same year, besides the publication date, it should be mentioned as "a" and "b" in the list of references.

The writing of the references and their alignment should be as in the following examples.

For articles:

Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK, (1992). *Induced transplacental transmission of N. caninum in cattle.* J Am Vet Med Ass. 201, 709-713.

For books:

Fleiss JI, (1981). *Statistical methods for rates and proportions.* Second edition. New York: John Wiley and Sons, p.103.

For edited books:

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KI, eds., (1990). *Manual of Clinical Microbiology.* Fifth edition. Washington DC: IRL Press, p.37.

For chapter in edited books:

Bahk J, Marth EH, (1990). *Listeriosis and Listeria monocytogenes.* Cliver DD. eds. Foodborne Disease. Academic press Inc, San Diego. p.248-256.

For congress papers:

Çetindağ M, (1994). *Pronoprymna ventricosa, a new digenic trematoda from the Alosa fallax in Turkey.* Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII), October, 10-14, İzmir-Turkey.

For dissertations:

Aksoy E, (1997). *Siğir Vebası hastalığının histolojik ve İmmunoperoksidaz yöntemle tanısı üzerine çalışmalar.* PhD Thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara.

Corresponding address, in multiple-author studies, as a correspondence address, only one of the authors' name/surname, address and e-mail should be mentioned at the end.

7. Genus and species names in Latin should be written in italic. All measures should be given according to the SI (Système Internationale) units.

8. The articles that are sent to be published in the journal should be sent with a covering letter and "Publication Rights Transfer Agreement" signed by all of the authors. The selected articles for the publication, and if asked for, the decision of the editorial committee concerning the publication, are declared to the article's author/authors.

9. The wording of "Ethical Commission Permission is obtained" should appear in scientific studies based on animal experiments, which will be published in the Journal of Etlik Veterinary Microbiology.

10. As the edition of the sent articles are done in accordance with the original text, all responsibility of the articles bear on the authors.

11. Researches that aim at comparisons of the products with their commercial names are out of the journal's theme scope.

12. The trademarks of materials and products that are subject of the research should not be mentioned.

13. If the research is supported by a foundation, name of the foundation and project number must be mentioned.

14. The articles that are sent to the journal are published in line with their coming date.

15. Unpublished papers are not returned to their author.

Fertilite sorunu olan Alman sıcakkanlı ırkı kısırakların uteruslarından izole edilen bakteri profili ve antimikrobiyal duyarlılıkları

Gülşen GONCAGÜL¹, Kamil SEYREK İNTAŞ²

¹ Uludağ Üniversitesi Mennan Pasinli Meslek Yüksekokulu, Görükle Kampüsü, 16059 Bursa, Türkiye.

² Uludağ Üniversitesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü, 16059 Bursa, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 15.10.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 30.05.2013

Özet: Endometritis kısıraklarda ciddi ekonomik kayıplara yol açan önemli kısırılık nedenidir. Endometritis, çoğunlukla bakteriyel enfeksiyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Patojen bakteriler, kısırakların fertilite problemlerine yol açabilmektedir. Ayrıca yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, endometritisin tedavisinde güçlükler yol açmaktadır. Bu çalışmada Almanya’da fertilite problemi olan kısıraklardan toplanan 342 adet uterus numunesi mikrobiyolojik etkenler ve antibiyotik duyarlılığı yönünden değerlendirildi. Toplam 307 adet (%89,8) numuneden bakteri izolasyonu yapıldı. Pozitif 307 numunenin, %12,7’si β-hemolitik *Streptokok* %1,2 hemolitik *Escherichia coli*, %20,8’i *E.coli*, %4,4’ü koliform bakteriler, %12,3’ü γ-hemolitik *Streptokok*, %14,3’ü α-hemolitik *Streptokok*, %2,9’u maya ve mantarlar, geri kalan %31,4’ü ise 27 farklı bakteri izolasyonlarıdır. Kısırakların fertilitesini en sık etkileyen bakteriler olarak β-hemolitik *Streptokok* ve *E.coli* etkenlerine karşı antibiyogram testi uygulandı. Pozitif numunelerde üreyen bakterilerin, 14 antibiyotiğe karşı duyarlılığı test edilmiştir. Tüm β-hemolitik *Streptokok* izolatları florfenikol, seftiofur, amoksisilin/klavulanik asit, amoksisilin ve sefkuinom’a duyarlıydı. *E.coli*’ye karşı, enrofloksasin, sefkuinom ve kolistin %90’nın üzerinde yüksek etki gösterdiği saptandı. Sonuç olarak, kısıraklarda genital enfeksiyonlara yol açan bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları değiştiği için tedaviler bakteriyolojik kontroller ve antibiyogram sonuçlarına göre yönlendirilmelidir.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal duyarlılık, bakteri, kısırak, uterus svab örnekleri.

Uterine bacterial profile of Germany warm blood mares with fertility problems and antimicrobial susceptibility

Summary: Endometritis is an important cause of subfertility with a high economic impact in mares. Endometritis is mostly associated with a bacterial infection. Pathogen bacteria can cause fertility problems in mares. Furthermore, bacterial resistance to commonly used antibiotics leads to difficulties in the treatment of endometritis. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility was investigated in 342 mares with fertility problems in a retrospective study in Germany. Totally 307 samples (89.8%) were found culture positive. Amongst 307 bacterial isolates, 12.7% were β-hemolytic *Streptococci* and 20.8% *Escherichia coli*, hemolytic *E.coli*, coliform bacteria, 12.3% γ-hemolytic *Streptococci*, 14.3% α-hemolytic *Streptococci*, 2.9% mold and 31.4% 27 some other bacteria isolates. Antibigram test was performed to β-hemolytic *Streptococci* and *E.coli* bacteria commonly resulted to fertility problems in mares. Antibiotic susceptibility of the isolates was determined to against 14 antibiotics. All β-hemolytic *Streptococci* isolates were sensitive to florphenicol, ceftiofur, amoxicillin/clavulanic acid amoxicillin ve cefquinom. For *E.coli* 90% sensitivity rate was determined against enrofloxacin, cefquinom and colistin. As a conclusion, because antibiotic sensitivity of the bacteria leads to genital infections in mares are changes; treatments of the genital infections should be directed with the results of antibiogram and bacteriologic controls.

Key words: Antimicrobial susceptibility, bacteria, mare, uterine swab samples.

Giriş

Kısıraklarda genital kanalın bakteriyel enfeksiyonları infertilitede önemli rol oynamaktadır (10,16,20,22,25). Kısıraklarda bakteriler, doğal aşım veya suni tohumlama yoluyla, doğumlar esnasında, muayeneler sırasında, mevcut fiziksel bariyerlerin

yetersizliğinde genital organlara yerleşerek enfeksiyonlara neden olmaktadır (21). Diğer yandan, bazı kısıraklarda çiftleşme ve aşım sırasında şekillenen kontaminasyonun temizlenmesindeki gecikme, sıklıkla infertiliteye neden olabilmektedir (15).

Kısıraklarda uterus enfeksiyonları, embriyonik ölümlerin, abortusların, perinatal tay kayıplarının

önemli bir nedenidir (20). Bu nedenle, Almanya'da uzun yıllardan beri yetiştirici birlikleri, veteriner fakülteleri ve veteriner işleri koordinasyonu ile belirli bir programa uygun olarak atların genital organlardan bakteriyolojik numuneler alınarak sistematik kontroller uygulanmaktadır. Bakteriyolojik muayeneler, sonbahar ve aşım sezonu olmak üzere genellikle iki dönemde yapılmaktadır. Kısıraklarda genellikle numuneler, bir önceki sezonda gebe kalmayan ve/veya embriyonik ölüm/abort görülenlerden, tayı ölü doğan veya post partum erken dönemde ölmüş olanlardan ve embriyonik ölüm ve rezorpsiyon belirlenenlerden alınmaktadır. Bununla birlikte, östrus siklusunun başlangıcında, aşım veya tohumlama öncesinde ya da herhangi bir zamanda, endometritis bulguları saptanan kısıraklardan da numune alınabilmektedir.

Konu ile ilgili olarak dünya genelinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak uterustan izole edilen bakteriyel etkenler *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Bacteroides fragilis* (*B.fragilis*) ve *Bacteroides ureolyticus* (*B.ureolyticus*)'tur (1,4,11,17).

Almanya'da farklı yıllarda yapılmış çalışmalarda (2,13,14) alınan numunelerin %14,7-83,9 kadarı bakteriyolojik açıdan pozitif olarak değerlendirilmiştir. Etken olarak β -hemolitik *Streptococci* %7,7-20,6, hemolitik *E.coli* %0,6-2,8 diğer koliform grubu bakteriler %0,05-23,2, *Klebsiella* %0,2-2,7 oranlarında tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda izole edilen etkenlere yapılan antibiyogram sonucuna göre; β -hemolitik *Streptococci* %100 kolistine dirençli bulunmuşken, %94,6-98,5 arasında penisiline, %91,8-98,5 arasındaki oranlarda eritromisine duyarlı oldukları tespit edilmiştir. İzole edilen hemolitik *E.coli*, penisiline %92,9-100 oranları arasında, *Klebsiella* ise %100 dirençli oldukları bulunmuştur. β -hemolitik *Staphylococci*, uygulanan antibiyotik duyarlılık sonucuna göre %35,7-60,42 oranında penisiline dirençli bulunmuştur (2,13,14).

Kısıraklar ve aygırlar arasındaki bulaşmaların asgariye indirilmesi ile döl veriminin yükseltilmesi sağlanabilmektedir. Bunun için, infertilite problemi olan kısıraklarda, uterus, serviks ve vaginadan üretilen bakteriyolojik patojen etkenlerin güncel spektrumunun belirlenmesi önem taşımaktadır (25).

Bu çalışma ile etkenler ve antibiyotik dirençleri yönünden bir fark olup olmadığının araştırılması ve güncel antibiyotiklere karşı antibiyotik duyarlılığın belirlenmesi ve güncelleştirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 18.01.2006-28.09.2008 tarihleri arasında Justus-Liebig-Üniversitesi Veteriner Hijyen ve Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Justus-Liebig-Universität) Diagnostik Bakteriyoloji Laboratuvarı'na, Almanya'nın Hessen eyaletinin farklı bölgelerinden, bir önceki sezonda kısır kalmış ya da aşım sonrası yapılan kontrollerde gebe kalmadığı bildirilen veya fertilitate problemi belirlenen kısıraklardan alınmış numunelerin, bakteriyolojik identifikasyonları yapıldı ve antibakteriyel duyarlılıkları tespit edildi. Toplam 342 adet numune değerlendirmeye alındı. İncelenen numunelerin 304 (%88,9) tanesi uterus svabı yardımıyla, 9 (%2,6) tanesi uterus lavajı ile, 29 (%8,5) tanesi vaginal svab yoluyla alındı. Numune alınacak kısıraklarda fekal kontaminasyonu engellemek için dış genital bölge, vulva dudakları ve rima vulva antiseptik emdirilmiş kağıt havlularla birkaç defa temizlenerek dezenfekte edildi. Sonrasında serviks, steril bir vaginal spekulum ile görünür hale getirilerek svap (Equivalent uterine culture swab; Kruse, Marslev, Denmark) veya Knudsen kateteri yardımı ile endometriyal örnek alındı. Alınan numuneler steril serum fizyolojik veya Stuart's Transport Medium (Oxoid) içerisinde kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

Mikrobiyolojik Analiz: Teşhis laboratuvarına getirilmiş örnekler geleneksel bakteriyolojik yöntemler yardımıyla her biri kanlı agara (Merck 10886, %10 defibrine koyun kanı), Gassner-Agara (Merck 1282) ve serum buyyona geçilerek direkt kültürleri yapıldı. Ekim yapılan besi yerleri 37°C'de, 24 saat süreyle inkübe edildi. 24 saat sonrasında üreme görülmeyen kültürler 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. 1-4 koloniye kadarki üremeler (önemsiz), 5-50 koloniye kadar olan üremeler (+), 50-200 koloniye kadarki üremeler (++) , 200 koloninin üzerindeki üremeler (+++) kuvvetli, şeklinde değerlendirildi. Toplam 48 saat sonrasında ayırımında şüphe duyulan kolonilerin subkültürleri yapıldı. Mikroorganizmaların standart laboratuvar metodlarından biyokimyasal testler ve API sistemi (BioMérieux, Milan-Italy) yönergesine göre identifikasyonları yapıldı.

Clinical and Laboratory Standarts Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) önerileri doğrultusunda, penisilin (10IU), tulatromisin (30µg), tetrasiklin (30µg), eritromisin (30µg), florfenikol (15µg), seftiofur (30µg), amoksisilin/klavulanik asit (30µg), amoksisilin (25 µg), enrofloksasin (5µg), gentamisin (10µg), sefkuinom (30µg), kolistin (50µg), marbofloksasin (10µg), sulfametoksazol/trimetoprim1:19 (25µg) olmak üzere 14 antibiyotik diski kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle antibiyogram testi yapıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri her bir bakteri için, Mueller Hinton agar besiyeri yüzeyine 0.5 McFarland düzeyinde bakteri süspansiyonu yayıldıktan sonra ilgili 14 antibiyotik diski 2 petri kabına paylaşırılarak disk difüzyon yöntemiyle yapıldı (7).

Bulgular

Alınan 342 adet numunenin 307 adedi (%89,8) bakteriyolojik kontrollerinde pozitif bulundu. 35 adet numuneden izolasyon yapılamadı. 244 adet (%79,5) numuneden birden fazla bakteri tipi izole edildi. Miks kültürlerde β-hemolitik *Streptococci*, *E.coli*, hemoliz yapan *E.coli*, koliform grubu bakteriler, α-hemolitik *Streptococci*, γ-hemolitik *Streptococci* ve basil çoğunlukla izole edildi. Tablo 1'de bu çalışmada izole edilen bakteriler ve sıklığı verilmektedir.

En çok izole edilen bakteriler *E.coli*, hemoliz yapan *E.coli*, koliform grubu (199 izolat, %26,4) bunu takiben α- hemolitik *Streptococci* (108 izolat, %14,3), β-hemolitik *Streptococci* (96 izolat, %12,7), -hemolitik *Streptococci* (93 izolat , %12,3)'dir.

Diğerleri tablo 1'de görüldüğü gibi basil, *Staphylococcus spp.*, *S.aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa*, *Corynebacterium spp.* sırasıyla azalan oranlarda izole edildi. Maya ve mantarlar, bakterilerle birlikte miks kültür olarak izole edildi.

Bakteri izolatlarının antimikrobiyal ilaçlara duyarlılığı disk difüzyon yöntemi (12) kullanılarak incelendi. Kısıraklardan izole edilmiş bakteriler ve bunların antibiyotik duyarlılıkları Tablo 2'de detaylandırılmıştır.

Tablo 1. Alman sıcak kanlı ırkı kısırakların uterustan izole edilen bakteriler ve izolasyon oranları.

Bakteriler	İzolasyon Sayısı (n)	İzolasyon Oranı (%)
<i>Escherichia coli</i>	157	20,8
β-hemolitik <i>Streptococci</i>	96	12,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	4,1
<i>Escherichia coli hemolitik</i>	9	1,2
<i>Coliform bakteri</i>	33	4,4
γ-hemolitik <i>Streptococci</i>	93	12,3
A-hemolitik <i>Streptococci</i>	108	14,3
<i>Bacillus spp.</i>	60	8,0
<i>Proteus spp.</i>	9	1,2
<i>Corynebacterium spp.</i>	29	3,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	33	4,4
<i>Enterococcus spp.</i>	10	1,3
<i>Erwinia spp.</i>	25	3,3
Maya	20	2,6
Diğer*	42	5,6
Toplam	755	100,0

**Streptococcus uberis*, *Moraxella (Branhamella)*, *Actinobacillus equuli*, *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes dentrificans*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus fecalis*, *Nocardia spp.*, *Serratia marcescens*, *Serratia spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus cereus*, Mantar.

Tablo 2. Kısıraklardan İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılığı (%).

Bakteriler		P	TUL	TE	E	FF	EFT	AMC	AML	ENO	GM	CEQ	CO	MAR	SXT
β-hemolitik Streptococci	S ψ	98,9	93,4	81,3	98,9	100,0	100,0	100,0	100,0	97,8	89,0	100,0	6,6	96,7	97,8
	I ¥	1,1	6,6	15,4	1,1	-	-	-	-	-	7,7	-	16,5	1,1	1,1
	R Θ	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	2,2	3,3	-	76,9	2,2
Escherichia coli hemolitik	S	-	57,9	68,4	5,3	89,5	89,4	73,7	36,9	94,7	68,4	94,7	73,7	94,7	52,6
	I	-	42,1	5,3	42,1	-	5,3	15,8	10,5	-	15,8	-	15,8	-	5,3
	R	100,0	-	26,3	52,6	10,5	5,3	10,5	52,6	5,3	15,8	5,3	10,5	5,3	42,1
Klebsiella spp.	S	-	38,1	81,0	-	95,2	61,9	47,6	-	38,0	57,1	52,4	95,2	38,1	28,6
	I	-	19,0	9,5	14,3	4,8	4,8	38,1	-	-	4,8	9,5	4,8	38,1	4,8
	R	100,0	42,9	9,5	85,7	-	33,3	14,3	100,0	62,0	38,1	38,1	-	23,8	66,6
Staphylococcus aureus	S	25,0	50,0	-	25,0	75,0	75,0	75,0	25,0	25,0	25,0	75,0	25,0	25,0	25,0
	I	-	-	50,0	-	-	25,0	25,0	50,0	-	50,0	-	25,0	-	-
	R	75,0	50,0	50,0	75,0	25,0	-	-	25,0	75,0	25,0	25,0	50,0	75,0	75,0
Pseudomonas aeruginosa	S	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	66,7	-	100,0	100,0	-
	I	-	-	33,3	-	-	33,3	-	-	-	33,3	100,0	-	-	-
	R	100,0	100,0	66,7	100,0	100,0	66,7	100,0	100,0	-	-	-	-	-	100,0
Bacillus cereus	S	-	-	-	-	100,0	100,0	-	-	100,0	100,0	-	-	100,0	100,0
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	100,0	100,0	100,0	100,0	-	-	100,0	100,0	-	-	100,0	100,0	-	-
Citrobacter koseri	S	-	100,0	100,0	-	100,0	100,0	100,0	-	100,0	100,0	-	100,0	100,0	-
	I	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-
	R	100,0	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-	100,0
γ-hemolitik Streptococci	S	-	-	-	-	100,0	-	100,0	100,0	100,0	-	-	-	100,0	100,0
	I	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	100,0	100,0	100,0	-	100,0	-	-	-	100,0	100,0	100,0	-	-
Enterobacter spp.	S	-	100,0	-	-	100,0	100,0	-	-	100,0	-	100,0	-	100,0	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-
	R	100,0	-	100,0	100,0	-	-	100,0	100,0	-	100,0	-	-	-	100,0
Enterococcus faecalis	S	100,0	-	100,0	-	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	-	100,0	-	100,0	100,0
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	100,0	-	100,0	-	-	-	-	-	100,0	-	100,0	-	-
Proteus spp	S	-	-	-	-	100,0	100,0	100,0	-	-	-	-	100,0	-	-
	I	-	-	50,0	-	-	-	-	-	50,0	50,0	-	-	-	-
	R	100,0	100,0	50,0	100,0	-	-	-	100,0	50,0	50,0	100,0	-	100,0	100,0

ψ: Sensitive, P: Penisilin, E: Eritromisin, AMC: Amoksisilin/Klavulanikasit, GM: Gentamisin, ¥: Intermediate, TUL: Tulatromisin, FF: Florfenikol, AML: Amoksisilin, CEQ: Sefkuinom, Θ: Resistant, TE: Tetrasiklin, EFT: Seftiofur, ENO: Enrofloksasin, CO: Kolistin, MAR: Marbofloksasin, SXT: Sulfametoksazol/Trimetoprim

Tartışma ve Sonuç

Kısıraklarda infertiliteye sebep olan bakteriyel etkenler ile ilgili olarak önceki yıllarda yapılmış çalışmalarda, bakteri kaynaklı infertilite etkenleri ve antibiyotik duyarlılıkları rapor edilmiştir (2,11,24). Değişik çalışmalarda da en yaygın izole edilen etken β -hemolitik *Streptococci* olup, değişik araştırmacılar tarafından farklı bölge ve yıllarda %39,8 ile %93 arasında değişen oranlarda izole edilmiştir (2,11,14).

Çalışmamızda en fazla *E.coli* α -hemolitik *Streptococci*, β -hemolitik *Streptococci*, γ -hemolitik *Streptococci* ve basil izole ve tanımlanmıştır. Albihn ve ark. (1) yaptığı çalışmada uterus svab örneklerinden en fazla *E.coli*, bunu takiben de β -hemolitik *Streptococci* izole ve tanımlanmıştır. Buna karşılık farklı yıllarda yapılan benzer çalışmalarda dominant suş olarak β -hemolitik *Streptococci*, ikinci sırada *E.coli* izole ve tanımlanmıştır (6,11,13). Hessen eyaletinde eski yıllarla kıyaslandığında son yıllarda dominant suşun değişmiş olmasında, numune alınan farklı kısırak populasyonları bir rol oynayabileceği gibi, diğer taraftan tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin dominant suşların değişmesinde bir rol oynayabileceği de düşünülebilir.

Kısıraklarda 157 adet, infertilite ile çoğunlukla ilişkilendirilmeyen *E.coli* suşları izole edilirken, önemli bakteriyel infertilite kaynaklarından biri olan hemolitik *E.coli* 9 adet izole edilmiştir. Ancak Albihn ve ark. (1), hemolitik olmayan *E.coli* izolatlarının da reproduktif problemlerin oluşmasında etkili olduklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, uterus patojenleri içerisinde *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*'de oldukça önemlidir (3,11). Yaptığımız çalışmada bu patojenler düşük oranlarda izole edilmiştir. *S.aureus* atlarda sık sık uterus sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Kısıraklarda %20,5 oranında fertilitate problemi yarattığı rapor edilmiştir (11,19). Bu etken çalışmamızda %4,2 saptanmıştır.

Bu çalışmada %12,7 oranında β -hemolitik *Streptococci* saptandı. Yapılan antibiyotik duyarlılığına göre etkene florfenikol, seftiofur, amoksisilin/klavulanik asit, amoksisilin ve sefkuinom'un %100 etki gösterdiği, ancak izolatların kolistine %76,9 oranında direnç gösterdiği belirlendi. Çalışmamızda hemolitik *E.coli* %1,2 oranında izole edildi. Etken

için yapılan antibiyogram testinde, enrofloksasin, sefkuinom ve kolistinin %90'nın üzerinde etki ettiği belirlendi. Diğer araştırmacıların yaptığı çalışmalarda %0,61-9,9 oranında hemolitik *E.coli* saptanırken, yapılan antibiyotik duyarlılık testine göre değişen bölge ve yıllarda %92,9-100 oranında penisiline direnç olduğu bildirilmiştir (12,14,24).

Çalışmamızın maya ve mantar (20+2 adet) toplam 22 adet izolatı genellikle bakterilerle birlikte miks kültür olarak izole edilmiştir. Mantar enfeksiyonlarının nedeninin, özellikle kısıraklarda üreme sistemindeki manipülasyonlar, yaygın ve yoğun antibiyotik kullanımı olduğu ifade edilmektedir (5).

Bu çalışmada yapılan benzer çalışmalarda (8,23) birçok bakteri izolatının çok sayıda antibiyotiğe karşı dirençli bulunduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle infertilite problemlerinde, antibiyotik dirençliliğinin önemi üzerinde de durmak gerekmektedir. Farklı ülkelerde kısırakların uteruslarından elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık profilleri farklılık göstermektedir (1,9). Böyle durumlarda kısırağın tedavi için veteriner hekime gönderilmesi ve hemen tedavi öncesinde numune alınması tavsiye edilmektedir. Hızlı ve etkili antimikrobiyal tedaviyi mümkün kılmak için, sürekli olarak hayvanların takibini yaparak belirli periyotlarda izlemek, rutin taramalarını yaparak, dirençlilik yaygınlığını saptamak gerekmektedir. Böylece veteriner hekimler uygun antimikrobiyal ilacı seçebilirler. Bunun sonucu olarak kısırakların uterus enfeksiyonları tedavi edilerek gebe kalma oranları bu sayede artırılabilir.

Fertilitate problemi olan kısıraklar üzerinde 2008 yılında yapılmış bir çalışmada (11) izole ettikleri mikroorganizmalara karşı genellikle amoksisilin klavulanik asit, enrofloksasin, eritromisin, gentamisin, rifamisin, trimetoprim/sulfametoksazol, kanamisin ve ampisilin kullanılmasını önerirken bu çalışmada izole edilen etkenlere karşı 14 antibiyotiğe karşı duyarlılığı test edilmiştir (Tablo 2). Etkenlerin farklı antibiyotiklere değişen oranlarda duyarlılık gösterdiği bulunmuştur. Atlardan üretilen farklı mikroorganizmalarda farklı antibiyotiklere değişen derecelerde direnç gelişimi belirlenmektedir. Tablo 2'de de izlenebileceği gibi β -hemolitik *Streptococci*'nin kolistine karşı %100 dirençli olduğu saptanmıştır. Bakteri suşlarında gelişen antibiyotik dirençliliğinin bu sorunun devam etmesinde önemli nedenlerden biri olabileceği düşünülmektedir. Hatta antibiyotik dirençliliği infertilite olguları-

nın, gittikçe artan bir sağlık problemi oluşturmasına neden olmaktadır (12,18).

Sonuç olarak elde edilen bulgulara göre, koliform mikroorganizmalar ve β -hemolitik *Streptococci* kısırlıklarda endometritislerde en sık karşılaşılan etkenler olduğu ancak farklı yıl ve bölgelerde yapılan çalışmalardan alınan izolasyon ve antibiyogram testi sonuçlarının değişken olduğu görülmüştür. Bu nedenle yapılacak düzenli ve sürekli monitoring çalışmaları ile ve saptanan pozitif kültürle uygulanacak antibiyotik duyarlılık testleri, büyük önem taşımaktadır. Çünkü herhangi bir enfeksiyonda yapılacak kör tedavi için kullanılacak antibiyotikğin doğru seçimi, tedavi başarısını arttıracak gibi, ekonomik kayıpların ve ileride antibiyotiğe karşı gelişebilecek direncinde böylece önüne geçilmesini sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Albihn A, Baverud V, Magnusson U, (2003). *Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems*. Acta Vet Scand. 44, 121-129.
2. Amsberg G, Karabisch P, (1975). *Ergebnisse der bakteriologischen Zervixtupferuntersuchung von Warmblutstuten in den Jahren 1969-1973*. Dtsch. Tierärztl Wschr. 82, 97-136.
3. Atherton JG, Pitt TL, (1982). *Types of Pseudomonas aeruginosa isolated from horses*. Equine Vet J. 14, 329-332.
4. Barrelet A, (1995). *Laboratory aids to routine gynaecological management*. Proc. Equine Stud. Medicine and AI Course British Equine Vet. Assoc. New-market, UK, p.52-56.
5. Blue MG, (1983). *Mycotic invasion of the mare's uterus*. Vet Rec. 113, 131-133.
6. Burlison MD, LeBlanc MM, Riddle WT, Hendricks KEM, (2010). *Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares*. Anim Reprod Sci Suppl. 121, 103.
7. CLSI (2005). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, approved Standard M100-S15*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. Cohen ML, (1992). *Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era*. Science. 257, 1050-1055.
9. Ensink JM, Klinger B, Houwers DJ, Klein WR, Vulto AG, (1993). *In-vitro susceptibility to antimicrobial drugs of bacterial isolates from horses in the Netherlands*. Equine Vet J. 25, 309-313.
10. Erdeğer J, Altay G, Akan M, Vural R, Dakman A, Çelebi M, (1999). *Kısırlıkların genital organlarından izole edilen β hemolitik streptokok'ların identifikasyonu ve serogrupleştirilmesi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 46, 69-76.
11. Frontoso R, Carlo E, Pasolini MP, Meulen K, Pagnini U, Iovane G, Martino L, (2008). *Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems*. Res Vet Sci. 84, 1-6.
12. Graef EM, Decostere A, Devriese, LA, Haesebrouck F, (2004). *Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs*. Microb Drug Resist. 10, 65-69.
13. Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Justus-Liebig-Universität Giessen (1996). *Betr: Jahresbericht*.
14. Krüger A, (1976). *Bakteriologische untersuchungen von Cervixtupfern von Stuten im Rahmen der zucht-hygienischen überwachung der hannoverschen Warmblutzucht in den Jahren von 1971 bis 1975*. Der praktische Tierarzt. 7, 411-416.
15. Leblanc MM, (2003). *Persistent mating induced endometritis in the mares: pathogenesis, diagnosis and treatment*. In: Ball, B.A. (Ed.), Recent Advances in Equine Reproduction. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA (www.ivis.org).
16. Neves AP, Keller A, Trein CR, Möller G, Jobim MIM, Castilho LFF, Cardoso MR, I. Leibold W, Zerbe H, Klug E, Gregory RM, Mattos RC, (2007). *Use of leukocytes as treatment for endometritis in mares experimentally infected with Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*. Anim Reprod Sci. 97, 314-322.
17. Nielsen JM, (2005). *Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy*. Theriogenology. 64, 510-518.
18. Oliver A, Canton R, Campos P, Baquero F, Blazquez J, (2000). *High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection*. Science. 288, 1251-1254.
19. Ricketts SW, Young A, Medici EB, (1993). *Uterine clitoral cultures*. In: Mckinnon, A.O., Voss, J.L. Equine Reproduction. Lea and Febinger, Philadelphia, 234-245.
20. Schliesser T, Behtelsmann U, (1976). *Bakteriologische Ergebnisse bei der deckhygienischen Überwachung von Warmblutstuten in Hessen*. Berl Münch Tierärztl Wschr. 89, 93-95.
21. Seyrek İntaş K, Bostedt H, Herfen K, Seyrek İntaş D, (1997). *Kısırlıklarda modifiye caslick metodu ile pneumovagina'nın operatif sağaltımı ve postoperatif sonuçlar*. Vet Cer Derg. 3, 10-15.
22. Seyrek İntaş K, Ülgen M, Mısırlıoğlu D, (1997). *Bursa yöresinde kısırlıklarda klinik, bakteriyolojik ve sitolojik muayeneler ile genital enfeksiyonların belirlenmesi*. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 44, 31-38.
23. Siu LK, (2002). *Antibiotics: action and resistance in gram-negative bacteria*. J Microbiol Immunol. 35, 1-11.
24. Sonnenschein B, Weiss R, (1978). *Ergebnisse der bakteriologischen zervixtupferuntersuchung von Warmblut und traberstuten in den jahren 1974-1977*. Berl Münch Tierärztl Wschr. 91, 123-128.
25. Zonturlu AK, Kaçar C, (2004). *Kısırlıklarda endometritisin tanı ve tedavi yöntemleri*. Kafkas Üniv Vet Fak. 10, 131-134.

Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in the middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, *Lactococcus garvieae*

Türky ÖZTÜRK¹, Behire Işıl DİDİNEN², Gaye DOĞAN¹, Ahmet ÖZER¹, Recep BİRCAN¹

¹ Sinop Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Sinop

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Eğirdir, Çünür, Isparta

Geliş Tarihi / Received: 03.01.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 24.06.2013

Summary: In this research study, we isolated *Lactococcus garvieae* from rainbow trout in the middle Black Sea region in Turkey. The diseases outbreak occurred at average water temperature of 16.7°C during April-May 2009. Clinically stagnation, inapetence, darkening of the skin, exophthalmia, opacification in the cornea, hemorrhages in the eyes and at the base of pectoral and anal fins, swollen abdomen and wounds on the body surface were observed in infected fish. In necropsy; the existence of accumulation of bloody fluid in the body cavity, ascites in the intestines and the stomach characterized with a yellowish-colored liquid, enlarged and darkening in the spleen and kidney, fading in colour, existence of petechial hemorrhages and enlarged in the liver were detected. In order to isolate the aetiological agent, 20 infected rainbow trout weighting between 50-100 gr were used. As the result of conventional tests used in the identification of the bacteria, the aetiological agent was identified as *L.garvieae*. The isolated *L.garvieae* strain was determined as susceptible to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, chloramphenicol, doxycycline, enrofloxacin, pristinamycine and tetracycline.

Key words: *Lactococcus garvieae*, phenotypic identification, antimicrobial sensitivity, rainbow trout.

Türkiye'nin orta Karadeniz Bölgesindeki gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)' nda laktokokkozis ve *Lactococcus garvieae* etkeninin antimikrobiyal duyarlılığı

Özet: Bu çalışmada, Türkiye'nin Karadeniz Bölgesindeki gökkuşağı alabalıklarından *Lactococcus garvieae* izole edildi. Hastalık salgını ortalama 16.7°C su sıcaklığında Nisan-Mayıs 2009 aylarında görüldü. Hasta gökkuşağı alabalıklarında klinik olarak durgunluk, iştahsızlık, renkte koyulaşma, tek ya da çift taraflı eksoftalmus, korneada opaklaşma, gözlerde, pektoral ve anal yüzgeç tabanlarında hemoraji, karında şişkinlik, vücut yüzeyinde yaralar görüldü. Nekropside vücut boşluğunda kanlı-renkli bir sıvının varlığı, barsak ve midede sarı berrak renkte sıvı ile karakterize asites, dalak ve böbrekte büyüme, renklerinde koyulaşma, karaciğerde büyüme, renginde açılma ve peteşiyel kanamaların olduğu tespit edildi. Hastalık etkenini izole etmek için yaklaşık 50-100 g ağırlığında hasta 20 adet gökkuşağı alabalığı bakteriyolojik incelemelerde kullanıldı. Bakterilerin identifikasyonunda konvansiyonel testler kullanıldı ve hastalık etkeni *L.garvieae* olarak tanımlandı. İzole edilen *L.garvieae* suşu, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, chloramphenicol, doxycycline, enrofloxacin, pristinamycine ve tetracycline duyarlı olduğu tespit edildi.

Anahtar sözcükler: *Lactococcus garvieae*, fenotipik identifikasyon, antimikrobiyal duyarlılık, gökkuşağı alabalığı.

Introduction

Lactococcus garvieae is an etiological agent of the lactococcosis disease which is effecting many different fish species in marine and freshwater aquaculture. It is a pathogen, which often present in rearing waters. It can cause serious economical losses with a death rate of %50-80 in fish which are not yet in the marketable size (50-80 gr) in trout farms (17,20). In addition, *L.garvieae* has been isolated from many of

the aquatic and terrestrial animals other than various species of fish (8). The isolation of the disease in human showing its zoonotic character is also important (19, 21, 22). In order to prevent lactococcosis outbreaks, necessary treatment and control methods should be developed. Furthermore, antimicrobial susceptibility test is necessary to initiate favorable therapeutics and prophylactic measures in order to limit the economic losses generated by these infections in aquaculture.

Lactococcosis epidemics are related with environmental conditions such as stress, overcrowding, sudden water temperature changes, and low water quality. Water temperature is the most important factor in the development of the disease making it seasonal and the appearance of the disease is associated with high water temperature. Most of the acute outbreaks appear when water temperature is over 18 °C, although acute outbreaks have been described at water temperatures of 14-15 °C (20). Normally, the disease follows a peracute route and causes hemorrhagic septicaemia. Among the clinical symptoms of the Lactococcosis; lethargy, anorexia, melanosis, erratic swimming, unilateral or bilateral exophthalmia, hemorrhages in the ocular zone, perianal area, fins, puffiness in the belly, wounds on the body surface and anal prolapsus have been listed (11,20). Outbreaks affecting rainbow trout have been reported in several countries, such as Australia, South Africa, Japan, Taiwan, England and some countries of the Mediterranean area (11). It has been reported that Lactococcosis is regularly seen in *Oncorhynchus mykiss* culture farms since 2001 in Turkey (2,6,10,13,16). Since then, such infections have been reoccurred, especially during the warm summer months. Therefore, *L.garvieae* is now considered one of the most important pathogens in the rainbow trout industry in Turkey (3,10). Therefore, a lot of studies on antimicrobial susceptibility phenotypic, genotypic, biotypic, immunogenic, antigenic profiles determination of *L.garvieae* strains have been conducted (1,4,9,14,18). Despite several studies on *L.garvieae* detected in the western and southern parts of Turkey, there is a few studies on *L.garvieae* isolation from Black Sea region.

The purpose of this study is to elucidate the antimicrobial susceptibility and the phenotypic characteristics of *L.garvieae* isolated from Black Sea region along with its general disease characteristics on rainbow trout.

Materials and Methods

A total of 20 rainbow trout (body weight 50-100 gr) suspected of showing the clinical signs of the disease were collected from a cage farm in Bafra dam lake in the middle Black Sea region of Turkey (at average water temperature of 16.7°C during April-May 2009). Bacteriological samples were collected from spleens, kidney and liver using sterile

swabs and streaked onto trypticase-soy-agar (TSA, Merck). Plates were incubated at 22°C for 48 hours. Single colonies were restreaked on the same media to obtain pure isolates. At the end of this period, the morphology and the color of the developed bacterial colonies in the medium were determined. Five isolates obtained from sick fish identified by physiological, biochemical, and enzymatic characterization. The morphology and the color of the developed bacterial colonies in the medium were determined. Gram staining method was applied for the determination of the cell morphology. In order to determine to other phenotypical features of the strain; motility, oxidase reaction (Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride; Sigma), catalase production (3% H₂O₂), nitrate reduction test, oxidation/fermentation test (O/F main medium, Merck with 1% glucose), Methyl Red and Voges-Proskauer tests (MR-VP Broth; Merck), citrate usage (Simmon's Citrate Agar, Merck), gelatinase tests, detection of the hemolysis feature, development at 4 and 45°C and 0%, 2.5%, 6.5% ve 8% NaCl were made (5).

Antimicrobial susceptibility of the isolated *L.garvieae* strain was determined with ATB VET (Bio Mérieux). The isolates were inoculated API suspension medium with a turbidity equivalent to 0.5 McFrand. 200 µl from this suspension was inoculated onto ATB S medium. Then, 135 µl from bacterial suspension in ATB S medium were inoculated into each well in ATB VET strips. The strips were inoculated in at 25°C for 24 hours. After the incubation, clarity in well was evaluated as sensitive, turbidity as resistant. Macroscopic examinations were made in Sinop University, Fisheries and Aquatic Sciences Faculty; and bacteriological examinations were made in Süleyman Demirel University, Eğirdir Fisheries Faculty.

Findings

Throughout the investigation period, a rate of 40-50% mortality was determined in naturally infected *Oncorhynchus mykiss*. Macroscopic findings such as stagnation, inapetence, darkening of the skin (Figure 1a), unilateral or bilateral exophthalmus (Figure 1b), opacification in the cornea (Figure 1c), loss of eye in advanced phases of the disease (Figure 1d), haemorrhages in the eyes and at the base of pectoral and anal fins, swollen abdomen and

wounds on the body surface were observed in infected fish (Figure 1e-f). In necropsy; the existence of accumulation of bloody fluid in the body cavity, yellowish-colored ascites in the intestine (Figure 1g) and stomach, enlarged and darkening in the spleen and the kidney, fading in colour, existence of petechial hemorrhages and enlarged in the liver were detected.

Gram-positive cocci were seen in the samples prepared from the tissues of the eyes, liver and kidney. As a result of the biochemical and physiological characteristics determined by conventional tests (Table 1) proved that the bacteria isolated from infected fish was *L.garvieae*. Antimicrobial sensitiv-

ity of the isolated *L.garvieae* strain was determined with ATB VET (Bio Mereux) and listed in Table 2.

Lactococcus garvieae isolates were examined using 28 different antimicrobials for sensitivity test and results were given in Table 2. *L.garvieae* strain was found to be susceptible to Amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, cholaramphenicol, doxycycline, enrofloxacin, pristinamycin, tetracycline and to be resistant to apramycin, cefoperazone, colistin, cotrimoxazole, erythromycin, flumequin, fusidic acid, gentamicin, kanamycin, lincomycin, metronidazole, nitrofurantoin, oxacillin, oxolinic acid, penicillin, rifampicin, spectinomycine, sulfamethizole and tylosin.

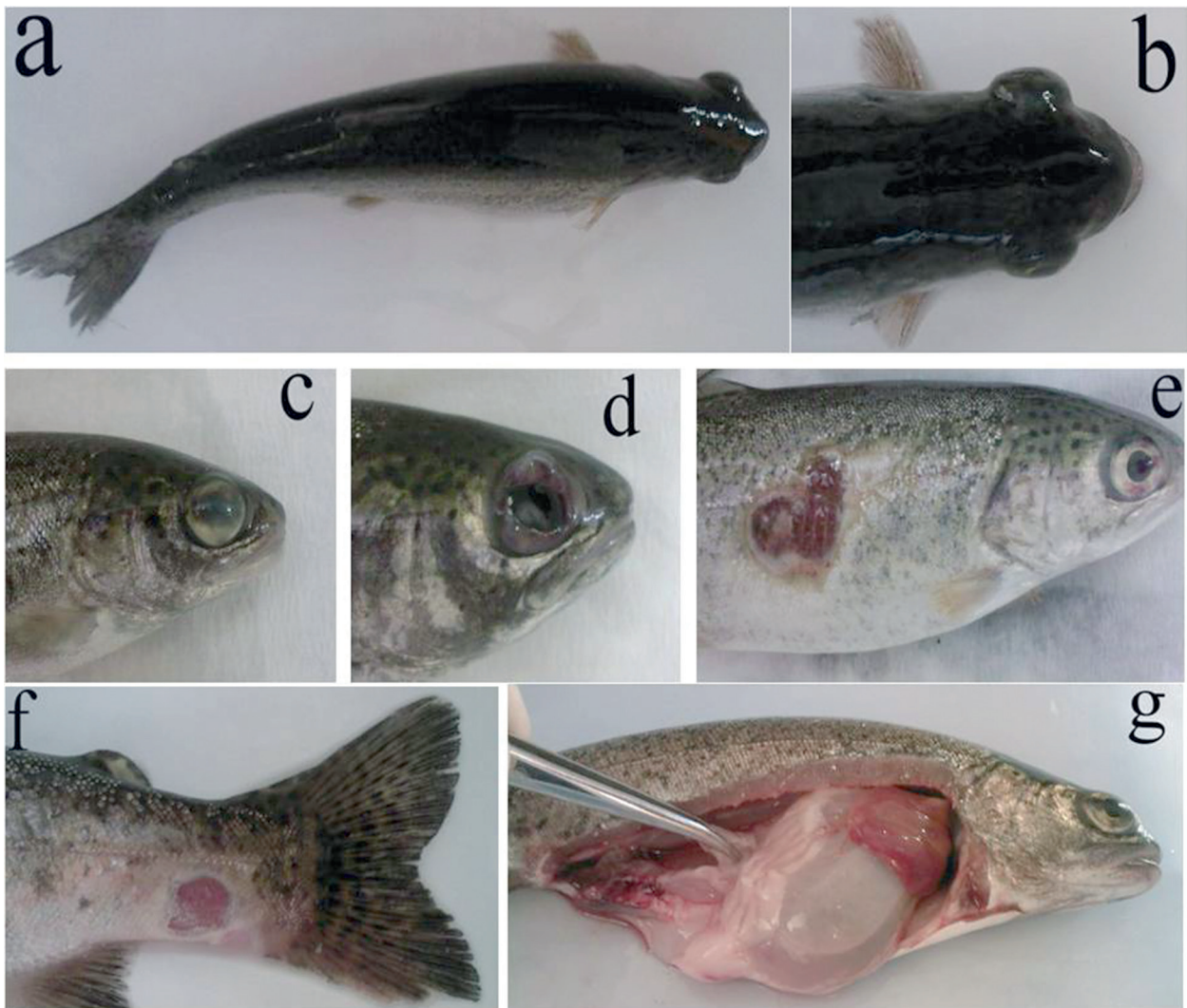


Figure 1. The macroscopic appearances observed in infected fishes. **a:** darkening of the skin, **b:** bilateral exophthalmus, **c:** opacification in the cornea, **d:** loss of eye in advanced phase, **e-f:** wounds on the body surface, **g:** ascites in the intestines.

Table 1. Phenotypic characteristic of *L.garvieae* strain with conventionally tests.

Phenotypic characteristics	
Gram staining	+
Motility	-
Oxidase	-
Catalase	-
O/F	+/+
H ₂ S production	-
Hydrolysis of gelatine	-
Hydrolysis of starch	-
Hydrolysis of indole	-
MR	+
VP	+
Utilization of citrate	-
Hemolysis (sheep blood)	α
Growth in TSA with 0% NaCl	+
Growth in TSA with 2.5% NaCl	+
Growth in TSA with 6.5% NaCl	+
Growth in TSA with 8% NaCl	-
Growth at 4°C	+
Growth at 25°C	+
Growth at 37°C	+
Growth at 45°C	+

Table 2. Antimicrobial sensitivities of *L.garvieae* strain (S: Susceptible, R: Resistant).

Antimicrobial drugs	Concentration (mg/mL)	<i>L.garvieae</i> strain
Amoxicillin (AMO)	4	S
Amoxicillin/ clavulanic acid (AMC)	4/2	S
Apramycin (APR)	16	R
Cefoperazone (CFP)	4	R
Cephalothin (CFT)	8	S
Chloramphenicol (CMP)	8	S
Colistin (COL)	4	R
Cotrimoxazole (TSU) (Trimethoprim/ sulphamethoxazole, TSU)	2/38	R
Doxycycline (DOT)	4	S
Enrofloxacin (ENR)	0.5	S
Erythromycin (ERY)	1	R

Flumequin (FLU)	4	R
Fusidic Acid (FUC)	2	R
Gentamicin (GEN)	4	R
Kanamycin (KAN)	8	R
Lincomycin (LYN)	2	R
Metronidazole (MTR)	4	R
Nitrofurantoin (FUR)	25	R
Oxacillin (OXA)	2	R
Oxolinic Acid (OXO)	2	R
Penicillin (PEN)	0.25	R
Pristinamycin (PRI)	2	S
Rifampicin (RFA)	4	R
Spectinomycin (SPE)	64	R
Streptomycin (STR)	8	R
Sulfamethizole (SUL)	100	R
Tetracycline (TET)	4	S
Tylosin (TYL)	2	R

Discussion and Conclusion

The typical symptoms such as changes in the skin pigmentation, opacification in the cornea, exophthalmia, swelling in the belly and hemorrhage in various body parts have been reported in the infections caused by gram-positive cocci. In the present study, *L.garvieae* produced clinical findings such as darkness in colour, opacification in the cornea, exophthalmia, swelling in the belly, the existence of a bloody-colored liquid in the body cavity, yellowish-colored ascites in the intestine and the stomach, growth and darkness in the spleen and the kidney, fading in color, existence of petechial hemorrhages and growth in the liver in infected *O.mykiss*. The similar clinical findings have been reported by Bragg and Broere (7), Muzquiz et al., (15), Eldar and Ghittino (11), Diler et al., (10), Altun et al., (2), Vendrell et al., (20). Here in the present study, open wounds were also observed on the body surfaces of the infected fish in addition to the previous findings as a result of possible subacute route of the disease.

Phenotypic characteristic of *L.garvieae* strain in our study are similar to those reported by Akşit and Kum (1), Altun et al., (4), Çağırğan, (9), Diler et al., (10), Kubilay et al., (14) and Türe, (18).

The antibiotics most often used to control Lactococcosis in rainbow trout outbreaks have been erythromycin, oxytetracycline, amoxicillin

and low-level doxycycline. The study of *L.garvieae* strains from different geographic origin showed that all of them were sensitive to enrofloxacin and nitrofurantoin, and were resistant to oxolinic acid and sulphamethoxazol-trimethoprim. However, the results differed with regard to erythromycin, chloramphenicol, oxytetracycline and ampicillin (20). The reference strains of *L.garvieae* were found sensitive to erythromycin, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.12 mg/ml (12). Recent outbreaks in Turkey have demonstrated that the strains of *L.garvieae* were sensitive to erythromycin, tetracycline, ofloxacin, ampicillin, chloramphenicol (10); penicilin, ampicillin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, erythromycin, oxytetracycline (13); gentamycin, oxitetracycline, neomycin, enrofloxacin, eritromycin and streptomycin (16). On the other hand, some strains of *L.garvieae* were found resistant to penicilin, clyndamycin and cefriaxon (10); clyndamycin, lincomycin, spiramycin, cloxacillin, oxacillin, methicillin, gentamicin, neomycin, bacitracin and sulphamethoxazole/trimethoprim (13); sulphamethoxazole–trimetoprim (16). When the antimicrobial sensitivity test results obtained in this research are examined (Table 2), bacterial resistance seems to be quite higher than the above-mentioned studies. Moreover eritromycine and streptomycine were also found resistant to *L.garvieae* in the present study. Considering the high antibacterial resistance of the streptococci, this resistance could be the result of the insensible antibacterial drug usage in aquaculture.

In conclusion, this paper makes some valuable contribution to our knowledge about known Lactococcosis from the Black Sea region in Turkey by providing data on *L.garvieae* isolation and phenotypic identification. Moreover, the results obtained from this investigation are also important to eliminate resistant and sensitive therapeutics on the etiological agent *L.garvieae*.

References

- Akşit D, Kum C, (2008). Determination of antibiotics susceptibility of frequently isolated pathogen microorganisms from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). YYÜ Vet Fak Derg. 19 (1), 1-7.
- Altun S, Diler A, Diler Ö, Basak, K, Isıklı, BI, (2005). Histopathology of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Bull Eur Ass Fish Pathol. 25, 131-135.
- Altun S, Kubilay A, Ekici S, Didinen BI, Diler O, (2010). Oral vaccination against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16 (Suppl-B), 211-217.
- Altun S, Onuk EE, Çiftçi A, Büyükekiz AG, Duman M, (2013). Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19, 375-381.
- Austin B, Austin DA eds., (1999). *Bacterial fish pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*. 3rd rev.ed. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. p. 457.
- Avcı H, Aydoğan A., Tanrıkul TT, Birinciöglü S, (2010). Pathological and microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16 (Suppl-B), 313-318.
- Bragg RR, Broere JSE, (1986). Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 6, 89-91.
- Chen SC, Lin YD, Liaw LL, Wang PC, (2001). *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16srDNA sequencing. Dis Aquat Org. 45, 45-52.
- Cagırgan H, (2004). Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. E U Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. 21, 267-269.
- Diler Ö, Altun S, Adiloglu AK, Kubilay A, Isıklı B, (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout in Turkey. Bull Eur Fish Pathol. 22, 21-26.
- Eldar A, Ghittino C, (1999). *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different disease. Dis Aquat Org. 36, 227-231.
- Elliott JA, Facklam RR, (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. J Clin Microbiol. 34 (5), 1296-1298.
- Kav K, Erganis O, (2008). Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farm. Bull Vet Inst Pulawy. 52, 223-226.
- Kubilay A, Altun S, Uluköy G, Diler Ö, (2005). The determination of antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus garvieae* strains. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. 1, 39-48.
- Muzquiz JL, Royo FM, Ortega C, de Blas I, Ruiz I, Allonso JL, (1999). Patogenicity of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) dependence on age of diseased fish. Bull Eur Ass Fish Pathol. 19, 114-119.
- Özer S, Bulduklu PS, Dönmez, E, (2008). Streptococcosis occurrence at rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultivated in province Mersin-Turkey. Journal of FisheriesSciences.com. 2, 272-283.
- Salati F, Angelucci G, Viale I, Kusuda R, (2005). Immune response of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to *Lactococcus garvieae* antigens. Bull Eur Ass Fish Pathol. 25, 40-48.

18. **Türe M**, (2012). *PFGE Metodu kullanılarak Lactococcus garvieae'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi*. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Trabzon (TAGEM/HS/10/09/02/179) Proje Sonuç Raporu. 68pp.
19. **Vela A. I, Vazquez J, Gibello A, Blanco MM, Moreno M, Liebana P, Albendea C, Alcalá B, Mendez A, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF**, (2000). *Phenotypic and genetic characterization of Lactococcus garvieae isolated in Spain from Lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources*. J Clin Microbiol. 38, 3791-3795.
20. **Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Girones O, Muzquiz, JL**, (2006). *Lactococcus garvieae in fish: A review*. Comporative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 29, 177-198.
21. **Wang CY, Shie HS, Chen SC, Huang JP, Hsieh IC, Wen MS, Lin FC, Wu D**, (2007). *Lactococcus garvieae infections in humans: Possible association with aquaculture outbreaks*. Int J Clin Pract. 61, 68-73.
22. **Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H**, (1998). *Identification of Lactococcus garvieae by PCR*. J Clin Microbiol. 36, 983-985.

Sivas yöresi köpeklerinde *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansının araştırılması

Kürşat Altay¹, Cahit Babür², Ahmet Duran Ataş¹, Yunus Emre Beyhan², Erkan Özkan¹

¹ Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Sivas

² Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Parazitoloji Referans Laboratuvar Merkezi, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 06.02.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 23.06.2013

Özet: Bu çalışmada, Sivas yöresindeki sahipli ve sokak köpeklerinde *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Sivas yöresinden (Sivas, Hafik, Kangal, Suşehri, Ulaş, Yıldızeli) 60'ı sahipli ve 60'ı sokak köpeği olmak üzere toplam 120 köpekten serum örneği toplanmıştır. Bu örnekler Sabin Feldman Boya Testi ile anti-*T.gondii* antikorlarının varlığı yönünden incelenmiştir. İncelenen 120 köpek serumunun 115 (%95,8)'inde anti-*T.gondii* antikorları belirlenmiştir. *T.gondii* seropozitifliği erkek köpeklerde %95,6, dişilerde %96,2 ($p>0,05$), sahipli köpeklerde %96,7, sokak köpeklerinde %95,0 ($p>0,05$), 0-2 yaş grubunda %93,9, 3-5 yaş grubunda %95,4, 6 yaş ve üstü grupta %100 ($p>0,05$) olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Sivas yöresindeki köpeklerde *T.gondii*'nin oldukça yüksek bir seroprevalansa sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar, köpeklerin *T.gondii*'nin epidemiyolojisinde önemli bir rol oynadıklarını gösterdiğinden, gerek veteriner ve gerekse halk sağlığı bakımından dikkate alınmalıdır.

Anahtar Sözcükler: *Toxoplasma gondii*, seroprevalans, köpek, Sivas.

Investigation of Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dogs in the Province of Sivas

Summary: This study was carried out to investigate the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs in province of Sivas. For this aim, a total of 120 sera samples, which are 60 from owned dogs and 60 from stray dogs, were collected in the region (Sivas, Hafik, Kangal, Suşehri, Ulaş, Yıldızeli). Anti-*T.gondii* antibodies were investigated using Sabin-Feldman Dye Test in the sera samples. The antibodies were detected in the 115 (95.8%) of 120 sera samples. The seroprevalence of *T.gondii* was 95.6% in male dogs, 96.2% in female dogs ($p>0.05$), 96.7% in owned dogs, 95.0% in stray dogs ($p>0.05$), 93.9% in 0-2 age group, 95.4% in 3-5 age group and 100% in over 6 age group ($p>0.05$). The results of the study revealed that *T.gondii* has a high prevalence in dogs in Sivas region. It show that dogs play an important role in the epidemiology of *T.gondii* and this situation should be taken into consideration in veterinary and human medicine.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, seroprevalence, dog, Sivas.

Giriş

Toxoplasmosis, Toxoplasmatidae ailesi, *Toxoplasma* soyunda yer alan yegane tür olan *Toxoplasma gondii*'nin neden olduğu oldukça yaygın bir protozoer enfeksiyondur. Etken, insan dahil hemen tüm memelileri ve kuşları enfekte edebilmektedir. Enfeksiyonun yayılışında, ara konaklardaki bradzoit ihtiva eden doku kistleri ve son konak kedi dışkıları ile atılan sprotoitlerin bulunduğu ookistler önem taşımaktadır (10-12).

Toxoplasma gondii, kozmopolit bir parazit olmakla birlikte enfeksiyonun yaygınlığı ülkeler ve aynı ülkenin coğrafi bölgeleri arasında farklılık gösterebilmektedir. Enfeksiyonun prevalansının bölgenin sıcaklığı, deniz seviyesinden yüksekliği, nem

oranı, kültürel alışkanlıklar ve hijyen kurallarından etkilendiği ileri sürülmektedir (11). Az pişmiş et tüketiminin yaygın olduğu Fransa'da hamile kadınlarda seroprevalansın %84; diğer taraftan Londra'da %22 olduğu belirlenmiştir (8,9). Toxoplasmosis, ruminantlarda da oldukça yüksek bir prevalansa sahiptir. Bu durum, sadece kedi dışkısı ile çıkarılan ookistlerin alınmasıyla veya kongenital bulaşma ile izah edilememektedir. Bu noktadan hareketle birçok yabancı Felidae'nin, toxoplasmosisin yayılmasında önemli rol oynadığı, ayrıca insan yaşam alanlarını kullanan ve parazitin son konakları ile yakın teması bulunan köpeklerin mekanik taşıyıcılığının önemli olduğu düşünülmektedir (11,12,17,19,25).

Köpeklerde toxoplasmosis genellikle asemptomatik bir seyir izlemekle birlikte ölümle sonuçla-

nabilinen klinik enfeksiyonlarda gelişebilmektedir. Köpeklerde ölümle sonuçlana ilk toxoplasmosis vakası Mello (1910) tarafından belirlenmiştir (20). Klinik toxoplasmosiste solunum, sindirim ve sinir sistemi ile ilgili semptomlar görülmektedir. Klinik enfeksiyonlar; 7-12 aylık köpeklerde görülen generalize form; 4 aylıktan büyük köpeklerde görülen merkezi sinir sistemi formu; 3 aylıktan küçük yavru köpeklerde görülen radiculoneuritis formu olmak üzere üç klinik formda toplanmaktadır. Generalize form; intermittent ateş, tonsillitis, solunum güçlüğü, ishal ve kusma ile karakterizedir. Sentral sinir sistemi formunda semptomlar, lezyonların serebrum, serebellum, omurilik veya kaslarda lokalizasyonuna göre değişkenlik göstermektedir. Kasılma ve bilinç kaybı lezyonların serebrumda; ataksi, titreme ve dengesiz yürüyüş lezyonların serebellumda; bacaklarda felçler lezyonların omurilikte; kaslarda zayıflık, yürüyüş bozukluğu ve myositis göstergesi olan kas ağrıları lezyonların kaslarda bulunduğu göstergesidir. Radiculoneuritis formu ise ilerleyici paraliz ile karakterizedir. Toxoplasmosisin nörolojik formu diğer sistemlerden bağımsız olarak birkaç hafta sürebilir. Buna karşılık solunum sistemi formu bir hafta içerisinde ölüme yol açabilmektedir (11,12).

Köpeklerde toxoplasmosisin seroprevalansı farklı ülkelerde %0-100 arasında değişmektedir (11). Yapılan çalışmalar, köpeklerde enfeksiyonun Türkiye'de de yüksek seroprevalansa sahip olduğunu göstermektedir. Bu oran Aydın'da (13) %27,6, Diyarbakır'da (15) %94, Elazığ'da (1) %75,4, Kocaeli'de (24) %69,8, Nevşehir'de (18) %57,8, Şanlıurfa'da (3) %97,5 ve Van'da (7) %10 olarak bulunmuştur.

Bu çalışma Sivas yöresinde köpeklerde *T.gondii*'nin seroprevalansının Sabin-Feldman boya testi ile araştırılması ve köpeklerin yaş, cinsiyet ve menşeyi ile anti-*T.gondii* antikorlarının yaygınlığı arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmanın materyali olan serum örnekleri Sivas yöresindeki (Merkez, Hafik, Kangal, Suşehri, Ulaş ve Yıldızeli ilçeleri ile bunlara bağlı köyler) beledi-

ye hayvan barınağı ve halk elindeki sahipli köpeklerden temin edilmiştir. Bütün köpeklerin yaş, cinsiyet ve menşeleri protokole kaydedilmiştir. Serum çıkarılacak kan örnekleri köpeklerin vena cephalica antebrachii'sinden tekniğine uygun olarak steril vakumlu tüplere alınmıştır. Bu kan örnekleri laboratuvara getirilerek oda ısısında 3000-500 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilip, serumları ayrılmıştır. Serum örnekleri kullanılıncaya kadar - 20°C'de muhafaza edilmiştir. Bölgeden toplam 120 serum örneği toplanmış olup, bunların 60'ı sahipli, 60'ı sokak; 68'i erkek, 52'si dişi ve 33'ü 0-2 yaş arası, 66'sı 3-5 yaş arası, 21'i 6 yaş üstü köpeklerden sağlanmıştır.

Köpeklerden elde edilen serum örneklerinin de anti-*T.gondii* antikorlarının varlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Parazitoloji Referans Laboratuvar Merkezinde Sabin-Feldman Boya Testi (22) ile araştırılmıştır. Serum örnekleri, 56°C'de 30 dakika süreyle inaktive edildikten sonra serum fizyolojik ile 1/16, 1/64, 1/256 ve 1/1024 titrelerde sulandırılmıştır. Daha sonra ilgili protokol takip edilerek test tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 14.0 programında ki-kare testi kullanılmıştır.

Bulgular

Sivas yöresinde anti-*T.gondii* antikorlarının varlığı yönünden incelenen köpeklerin seropozitiflik oranı ile bu oranın cinsiyet, menşe ve yaşa göre dağılımına ek olarak seropozitiflik titreleri arasındaki ilişki Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi incelenen 120 köpeğin 115 (%95,8)'inde anti-*T.gondii* antikorlarının varlığı tespit edilmiştir. Erkek köpeklerdeki seropozitiflik oranı %95,6 (65/68) iken dişilerde bu oran %96,2 (50/52) olarak ortaya çıkmıştır ($p>0,05$). Köpeklerin menşelerine göre seropozitiflik oranının sahipli köpeklerde %96,7 (58/60) ve sokak köpeklerinde %95,0 (57/60) olduğu saptanmıştır ($p>0,05$). Yaş gruplarına göre seropozitiflik oranlarına bakıldığında 0-2 yaş grubunda %93,9 (31/33), 3-5 yaş grubunda %95,4 (63/66) ve 6 yaş üstü grupta ise %100 (21/21) olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). Cinsiyet, menşe ve yaş gruplarına göre seropozitiflik oranları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli olmağı ortaya çıkmıştır.

Tablo 1. Sivas yöresinde köpeklerde *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı ve antikor titrelerinin cinsiyet, menşeye ve yaşa göre dağılımı

		Köpek	Negatif	Pozitif	Pozitiflik	Seropozitiflik Titrelemi			
		sayısı	sayısı	sayısı	yüzdesi (%)	1/16	1/64	1/256	1/1024
Cinsiyet	Erkek	68	3	65	95,6	39	25	1	-
	Dişi	52	2	50	96,2	26	20	4	-
Menşeye	Sahipli	60	2	58	96,7	33	20	5	-
	Sokak	60	3	57	95,0	32	25	-	-
	0-2	33	2	31	93,9	18	12	1	-
Yaş	3-5	66	3	63	95,4	33	26	4	-
	> 6	21	0	21	100	14	7	-	-
	Toplam	120	5	115	95,8	65	45	5	0

Tartışma ve Sonuç

Toxoplasmosis, insan ve hayvanların yaygın bir paraziter hastalığıdır. Hastalık köpeklerde de yaygın olup, klinik tabloya yol açabilmektedir. Diğer taraftan hastalığın insanlara mekanik yolla bulaşmasında köpeklerin rolü de bulunmaktadır (11,19,25).

Toxoplasmosisin yaygınlığının araştırılmasında çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Sabin Feldman Boya Testi, *T.gondii*'ye karşı şekillenen antikorların belirlenmesinde ilk kullanılan yöntemdir (21). Direk aglutinasyon testi, enzyeme-linked immunosorbent assay, indirek immunofluoresan antikor testi, indirek hemaglutinasyon testi, lateks aglutinasyon testleri tanı amacıyla kullanılan diğer yöntemlerdir (2,11).

Türkiye'de köpeklerde toxoplasmosisin yaygınlığının araştırılmasında yaygın olarak Sabin Feldman Boya Testi kullanılmıştır. Bu metotla yapılan çalışmalarda köpeklerde toxoplasmosisin Aydın'da (13) %27,6, Bursa'da (16) %68,57, Diyarbakır'da (15) %94, Elazığ'da (1) %75,4, İstanbul'da (4) %72, Kocaeli'de (24) %69,8, Konya'da (23) %64,02, Nevşehir'de (18) %57,8, Şanlıurfa'da (3) %97,5, Van'da (7) %10 oranında yaygın olduğu belirlenmiştir. Sivas yöresinde yürütülen bu çalışmada 120 köpeğin 115 (%95,8)'inde seropozitiflik tespit edilmiştir. Bu yüksek seropozitiflik gerek barınağa alınmış ve gerekse halk elindeki çoban köpeklerinin enfekte çığ etlerle beslenmesinin rolü olabileceği düşünülmektedir.

Toxoplasmosisin seroprevalans oranını cinsiyete göre karşılaştıran çok sayıda araştırma bulun-

maktadır. Elazığ yöresinde yürütülen bir çalışmada (1), dişi köpeklerdeki seroprevalansın %75,8, erkeklerdekinin %75, Kocaeli yöresinde (24) dişilerde 78,1, erkek köpeklerde %59,6, Nevşehir yöresinde (18) dişilerde %62,34, erkek köpeklerde %52,38 olarak belirlenmiştir. Buna karşılık Bursa'da (16) dişilerde %62,7, erkek köpeklerde %77,7, Şanlıurfa yöresinde (3) dişilerde %96,2, erkeklerde %100 seroprevalans oranı saptanmıştır. Sivas yöresinde yürütülen bu çalışmada toxoplasmosisin seroprevalansı Elazığ, Kocaeli ve Nevşehir yöresinde yürütülen çalışmaların (1,18,24) sonuçlarına benzer şekilde dişi köpeklerde (%96,2), erkek köpeklerden daha yüksek bulunmuştur. Ancak, bu farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Toxoplasmosisin seroprevalansı üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler incelendiğinde, hastalığın seroprevalansı ile yaş arasındaki ilişkinin farklılık gösterdiği görülmektedir. Bazı çalışmalarda (5,6,14) seroprevalansın yaşla birlikte arttığının belirlenmesine karşılık, diğer bazı çalışmalarda (3,16) bu oranın gençlerde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sivas yöresinde yürütülen bu çalışma seroprevalans oranının yaşla birlikte arttığı; 0-2 yaş grubunda %93,9, 3-5 yaş grubunda %95,4 ve 6 yaş üstü grupta %100 olduğu saptanmıştır. Yaşla birlikte seroprevalans oranındaki artışın, daha uzun süre çevresel kontaminasyona maruziyetle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Kocaeli yöresinde yürütülen bir çalışmada (24), toxoplasmosisin seroprevalansının sokak köpeklerinde (%71,7), sahipli köpeklerden (%62,5) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma da ise

her iki grupta da oldukça yüksek bir seroprevalans saptanmakta birlikte, sahipli köpeklerdeki seroprevalansın (%96,7), sokak köpeklerinden (%95,0) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sahipli köpeklerde, sokak köpeklerine benzer şekilde yüksek bir seroprevalansın görülmesi ($p>0,05$), çalışmaya dahil edilen sahipli köpeklerin çoban köpeği olması, bunlarında belli oranda çiğ etle beslenmelerinden kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır.

Bu çalışma ile Sivas yöresindeki köpeklerde toxoplasmosis araştırılmış olup, enfeksiyonun köpeklerde oldukça yüksek bir seroprevalansa (%95,8) sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Halk sağlığı açısından önemli bir enfeksiyon olan toxoplasmosisin köpeklerdeki yüksek seroprevalans oranı gerekli koruyucu tedbirlerin uygulanmasında dikkate alınmalıdır.

Kaynaklar

1. Aktaş M, Babür C, Karaer Z, Dumanlı N, Köroğlu E, (1998). *Elazığ'da sokak köpeklerinde toxoplasmosisin seroprevalansı*. Vet Bil Derg. 14, 47-50.
2. Altıntaş K, (1992). *Toxoplasmosisin serolojik tanısı*. T Parazitol Derg. 16, 107-113.
3. Babür C, Altaş MG, Çelebi B, Sevgili M, Özkan AT, Gökçen A, (2007a). *Şanlıurfa yöresi sokak köpeklerinde toxoplasmosis, leishmaniosis ve listeriosis seroprevalansı*. Türk Hij Den Biyol Derg. 64, 11-16.
4. Babür C, Bıyıkhoğlu G, Pişkin FC, Erdal N, (1997). *Istanbul sokak köpeklerinde toxoplasmosisin seroprevalansı*. T Parazitol Derg. 21, 413-416.
5. Babür C, Göz Y, Altuğ N, Özkan AT, Kılıç S, (2007b). *Van ili köpeklerinde Sabin-Feldman Boya Testi ile Toxoplasma gondii'nin seroprevalansı*. YYU Vet Fak Derg. 18, 1-4.
6. Balkaya İ, Aktas MS, Özkanlar Y, Babür C, Celebi B, (2010). *Seroprevalance of Toxoplasma gondii in Dogs in Eastern Turkey*. Isr J Vet Med. 65, 58-61.
7. Ceylan E, Berktaş M, Ağaoğlu Z, (2001). *Van'da askeri köpeklerde Toxoplasma gondii'nin seroprevalansı*. T Parazitol Derg. 25, 332-334.
8. Desmots G, Couvreur J, (1974a). *Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies*. N Engl J Med. 290 (20), 1110-1116.
9. Desmots G, Couvreur J (1974b). *Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus*. Bull NY Acad Med, 50(2): 146-159,
10. Dubey JP, (2008). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Second Edition. New York: CRC Press, p. 161-167.
11. Dubey JP, Beattie CP, (1998). *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Florida; CRC Press,
12. Dumanlı N, Aktaş M, (2010). *Toxoplasmatidae (Toxoplasma, Neospora)*. Dumanlı N ve Karaer Z. eds. Veteriner Protozooloji. Medisan, Ankara. s.119-136.
13. Eren H, Babür C, Özlem MB, Durukan A, Ulutaş B, (1998). *Aydın ili kedi ve köpeklerinde anti-Toxoplasma gondii antikorlarının Sabin-Feldman boya testi ile araştırılması*. Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg. 37,23-28.
14. Gıcık Y, Sarı B, Babür C, Çelebi B, (2010). *Kars Yöresinde Köpeklerde Toxoplasma gondii ve Listeria monocytogenes'in Seropozitifliği*. T Parazitol Derg. 34, 86-90.
15. İcen H, Babür C, Bademkiran S, Çelebi B, Şimşek A, Özyurtlu N, Özkan AT, (2010). *Diyarbakır bölgesindeki sahihsiz köpeklerde toxoplasmosis, leishmaniasis ve listeriosis seroprevalansı*. T Prazitol Derg. 34, 6-10.
16. İnci A, Babür C, Kalınbacak A, (1996). *Gemlik askeri harası köpeklerinde anti-T.gondii antikorlarının Sabin-Feldman Boya Testi ile araştırılması*. T Parazitol Derg. 20, 413-416.
17. Kean BH, (1972). *Clinical toxoplasmosis - 50 years*. R SocTrop Med Hyg. 66, 549-571.
18. Kırbaş A, Babür C, Balkaya İ, Yavuz Ü, (2011). *Nevşehir ilindeki köpeklerde listeriosis ve toxoplasmosisin seroprevalansının araştırılması*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 22, 68-73.
19. Lindsay DS, Dubey JP, Buther JM, Blagburn BL, (1997). *Mechanical transmission of Toxoplasma gondii oocysts by dogs*. Vet Parasitol. 73, 27-33.
20. Mello U, (1910). *Un cas toxoplasmose du chien observe a Turin*. Bull Soc Pathol Exot. 3, 359-363.
21. Reiter-Owona I, Peteresen E, Joynson D, ve ark., (1999). *The past and present role of Sabin Feldman Dye Test in serological diagnosis of toxoplasmosis*. Bull Word Health Org. 77(11), 929-935.
22. Sabin AB, Feldman HA, (1948). *Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomen affecting a proton parasite (Toxoplasma)*. Science. 108, 660-663.
23. Sevinç F, Dik B, Babür C, Kamburgil K, Uslu U, (2000). *Konya sokak köpeklerinde Toxoplasma gondii'nin Sabin Feldman Boya Testi, Indirekt Fluoresan antikor testi ve Modifiye Aglutinasyon testi ile seroprevalansı*. T Parazitol Derg. 24, 61-64.
24. Şimşek S, Ütük AE, Babür C, Köroğlu E, (2006). *Kocaeli yöresi köpeklerinde Toxoplasma gondii seroprevalansı*. T Parazitol Derg. 30, 171-174.
25. Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM, (2000). *Toxoplasma gondii: From animals to humans*. Int J Parasitol. 30,1217-1258.

Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in goats in Kilis province

Yunus Emre BEYHAN¹, Cahit BABÜR¹, Selçuk PEKKAYA², Bestami DALKILIÇ³

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Parazitoloji Referans Merkez Laboratuvarı, Ankara.

² Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Biyokimya Laboratuvarı Ankara.

³ Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep Meslek Yüksek Okulu, Gaziantep.

Geliş Tarihi / Received: 10.06.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 28.06.2013

Summary: This study was conducted to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Kilis and Halep goats in Kilis province. 105 serum samples of goats were examined by Sabin Feldman Dye Test (SFDT) and 95.24% of seropositiviy have been found. These results show that toxoplasmosis is quite common in goats in the region of study.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Sabin-Feldman, seroprevalence, goat, Kilis.

Kilis yöresi keçilerinde anti-*Toxoplasma gondii* antikorlarının araştırılması

Özet: Bu çalışma Kilis yöresindeki Kilis ve Halep keçilerinde *Toxoplasma gondii* seroprevalansını belirlemek amacıyla yapılmıştır. 105 keçiye ait serum örneği Sabin Feldman Dye Testi (SFDT) ile incelenmiş ve %95,24 oranında seropozitifliğe rastlanılmıştır. Bu sonuçlar çalışmanın yapıldığı bölgede keçilerde toxoplazmozisin oldukça yaygın olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, Sabin-Feldman, seroprevalans, keçi, Kilis.

Introduction

Toxoplasmosis is important zoonotic infection that affects both humans and animals. It is caused by *T.gondii* which is obligate intracellular parasite. The definite hosts are domestic cats and other felidae family and intermediate hosts are warm-blood animals and humans (4,6,22). The disease is transmitted by ingestion of oocysts in contaminated food and water or ingestion of bradyzoites with undercooked or raw meat (5,6).

Toxoplasmosis is commonly subclinical although shows a few general symptoms such as fever, increase of body temperature, degeneration of retina and ataxi (6,9).

Infective animals harbour cysts in their tissues particularly muscle. They would constitute infectious reservoirs for other animal species and humans. So the determination of prevalence of *T.gondii* infection in goats may be of epidemiological importance (4,6,7).

Toxoplasma gondii infection can be detected using serological and histological ex-

aminations. Sabin-Feldman Dye Test (SFDT), Indirect Hemagglutination (IHA), Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Complement Fixation Test (CFT) and Latex Agglutination Test (LAT) are commonly used serological tests. Sabin-Feldman Dye Test is considered the most specific, sensitive and gold standart test for the detection of antibodies to *T.gondii* (6,8).

The shami and kilis goats are distributed East Meditarrean and Southeast Anatolia region of Turkey. The prevalence of toxoplasmosis in goats investigated with some studies and it is 12.1-88.17% (2,11,13,25) in Turkey.

The purpose of this study was to detect the prevalence of *T.gondii* in Shami and Kilis goats from the Kilis province of Turkey.

Material and Methods

The study was carried out on 105 adult goats (53 Kilis and 52 Shami) from Kilis province of Turkey. Kilis is located in the Southeast Anatolia region of

Turkey. It is in Turkey-Syria border and between 360 N latitude and 320 E longitude. The age and sex of goats were recorded. All of were female except two of Kilis goats. The age ranged from 1 year to 10, with 52 animals from 1 to 3 years, 22 from 3 to 5 years and 13 animals older than 5 years. Sheep and goats of less than 6 months of age were not included in the study to avoid measuring antibodies passively transferred in colostrum. Serum samples were collected following centrifugation at 3000 rpm for 10 min of 5 ml of blood samples obtained from the jugular vein of goats. All sera were stored a -20°C and later assayed for *Toxoplasma* antibodies.

Sabin-Feldman Dye Test (SFDT) for Toxoplasmosis: Serum samples were tested for toxoplasmosis with the Sabin Feldman Dye Test (SFDT), using live tachyzoites and methylene-blue dye. positive and negative controls, and test sera were diluted with saline in a series of 4-fold serial dilutions (1/16; 1/64; 1/256; 1/1024). Each dilution, 25 µl, was transferred to a tube and an equal volume of activator sera which is seronegative for *T.gondii* and rich in C2, C3, C4, Mg₂ and properdin was added. For antigen, 48 hours passage of *T.gondii* Rh strain derived from periton fluid of 3-4 week aged white swiss albino mice were used and per tube. The tubes were then incubated at 37 °C for 50 min. Then 10 min. incubation at 37 °C was performed in the presence of 25 µl of alkaline methylene blue (pH 11). After incubation, 20 µl of each sample was examined under a 40 objective. Dilutions for which ≥ 50% of the observed *T.gondii* tachyzoites remained unstained were considered positive. An antibody titer of 1:16 or higher was considered positive.

Statistical Analyses: The chi-square test (x²) was performed to assess the correlation between Kilis and Shami goats. The differences were considered statistically significant when probability (p) value ≤0.05.

Results

Among the 105 goats tested, 100 (95.24%) were detected to be seropositive. All of the Shami goats were found positive (100%) while Kilis goats were 90.38%. From 100 positive samples with SFDT, 76 samples (76%) were seropositive at 1:16 dilution, 22 samples (22%) at 1:64 dilution and 2 (2%) samples at 1:256 dilution (Table 1). A total of 49 serum

samples from 1-3 years old, 17 serum samples from 3-5 years old and 10 serum samples from 5-10 years old were examined. The seropositivity of *T.gondii* was found 93.88%; 94.12% and 90% respectively.

No statistically significant difference was observed between the Kilis and Shami goats using the Chi Square test (p>0.05).

Table 1. Goat species and SFDT results with dilutions

Goats	1:16	1:64	1:256	Negative	Total
Shami	40	12	1	-	53
Kilis	36	10	1	5	52
Total	76	22	2	5	105

Discussion and Conclusion

Toxoplasmosis is one of the most important zoonotic infections that affect both humans and animals. The frequency of infection is variable in the different regions of the world. Depending on factors such as age, education, sanitation, life and aliment style the seroprevalence of the disease range from 0% to 90% in humans (6). As well as all other the world toxoplasmosis is common in Turkey and the seroprevalence has been reported in humans 23.1-57.6% (15).

Antibodies against to *T.gondii* in goats have been reported by using different serological methods. In previous studies carried out in different parts of Turkey, the seroprevalence of toxoplasmosis among goats varied between 12.1% and 88.17%.

The SFDT used in this study is known to be the most reliable and sensitive method for the diagnosis of toxoplasmosis. Its main disadvantages are its high cost and the human hazard of using live organisms (6). The prevalence of toxoplasmosis in goats by using SFDT was found 63.15% in Cankırı (1); 43.87% in Eskisehir (2); 80.61% in Van (13); 54% in Ankara (25) and 81.75% (23); 88.17% in Hatay (11); 41.30% in Nigde (14); 27.9% in Diyarbakır (21); 51.6% in Ankara, Cankırı, Kastamonu, Adana and Yozgat (24). Seroprevalence was found 15% by IHA and 12.1% by ELISA in in goats in Adana (18). The overall prevalence recorded in goats in the present study is higher (95.24%) compared to the previous reports from Turkey. But the prevalence of toxoplasmosis in Hatay (88.17%) which is in the

same region of Kilis is near to our study, the reason of this may be geographical.

In other countries mainly the other serological methods were used to detect to antibodies against *T.gondii*. It was found 51.82% in Zimbabwe by IFA (12); 66% in Chech Republic by ELISA (3); 28.93% by LAT (19) and 19-19.5% by IHA, ELISA and IFA in Brazil (10); 24-25.9% in Ethiopia by MDAT and ELISA (17); 59.8% in Bulgaria by IHA (20) and 34.2-78.3% in Poland by DAT (16). Also our result is higher than these reports, even though a different serological method was used.

The results of the present study further confirm the high prevalence of *Toxoplasma* infections in goat populations in Kilis, Turkey. May be some reasons of that in this region are presence of reservoir cats and farm animals; suitable temperature and humidity; potentiality of environment for sporulation of oocytes; traditional breeding systems and suitable pastures.

Toxoplasmosis in goats results economic losses because of abort and reduction of reproduction. Goat meats are not widely consumed in Turkey but contaminated meats are also risk for human toxoplasmosis. So some precautions should be taken to decrease the prevalence of *T.gondii* in this region.

References

- Babür C, Pişkin FC, Biyikoğlu G, Dündar B, Yaralı C, (1999). *Eskişehir Çifteler harası Ankara Keçilerinde Anti-Toxoplasma gondii antikorlarının Sabin-Feldman Dye Test (SFDT) ile araştırılması*. Türkiye Parazit Derg. 23, 72-74.
- Babür C, İnci A, Karaer Z, (1997). *Çankırı yöresinde koyun ve keçilerde Toxoplasma gondii seropozitifliğinin Sabin-Feldman boya testi ile saptanması*. Türkiye Parazit Derg. 21, 409-412.
- Bartova E, Sedlak K, (2012). *Toxoplasma gondii and Neospora caninum antibodies in goats in the Czech Republic*. Vet Med Czech. 57, 111-114.
- Dubey JP, (1994). *Toxoplasmosis*. J Am Vet Med Assoc. 205(11), 1593-1598.
- Dubey JP, (1998). *Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 28, 1019-1024.
- Dubey JP, Beattie CP, (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. Florida: CRC Press, p.220.
- Dubey JP, Frenkel JK, (1998). *Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology*. Vet Parasitol. 77, 1-32.
- Dubey JP, Thulliez P, Romand S, Kwok OCH, Shen SK, Gamble HR, (1999). *Serologic prevalence of Toxoplasma gondii in horses slaughtered for food in North America*. Vet Parasitol. 86, 235-238.
- Eckert J, Kutzer E, Rommel M, Burger HJ, Korting W, (1992). *Veterinarmedizinische Parasitologie*. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg. p.905.
- Figueiredo JF, Silva DAO, Cabral DD, Mineo JR, (2001). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in goats by the indirect haemagglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the region of Uberlandia, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96, 687-692.
- Güzel M, Yaman M, Babür C, Düzgün A, Yağcı S, Kiliç S, (2007). *Seroprevalence of toxoplasmosis and babesiosis in Shami goats*. Indian Vet J. 84, 241-242.
- Hove T, Lind P, Mukaratirwa S, (2005). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in goats and sheep in Zimbabwe*. Onderstepoort J Vet. 72, 267-272.
- Karaca M, Babür C, Çelebi B, Akkan HA, Tütüncü M, Keleş I, Uslu BA, Kiliç S, (2007). *Investigation on the seroprevalence of toxoplasmosis, listeriosis and brucellosis in goats living in the region of Van, Turkey*. Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak. 18, 45-49.
- Karatepe B, Babür C, Karatepe M, Çakmak A, Nalbantoğlu S, (2004). *Seroprevalence of toxoplasmosis in sheep and goats in the Niğde province of Turkey*. Indian Vet J. 81, 974-976.
- Kuk S, Özden M, (2007). *Hastanemizde Dört Yıllık Toxoplasma gondii Seropozitifliğinin Araştırılması*. Türkiye Parazit Derg. 31, 1-3.
- Michalski M, Platt Samoraj A, (2004). *Extent of Toxoplasma gondii invasion in goat and sheep from the Olsztyn region*. Medycyna Wet. 60, 70-71.
- Negash T, Tilahun G, Patton S, Prevot F, Dorchie PH, (2004). *Serological survey on toxoplasmosis in sheep and goats in Nazareth, Ethiopia*. Rev Med Vet. 155, 486-487.
- Öz İ, Özyer M, Çorak R, (1995). *Adana yöresi koyun ve keçilerinde ELISA ve IHA testleri ile toxoplasmosisin yaygınlığının araştırılması*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 8, 87-99.
- Pita Gondim LF, Barbosa HV, Ribeiro Filho CH, Saeki H, (1999). *Serological survey of antibodies to Toxoplasma gondii in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil*. Vet Parasitol. 82, 273-276.
- Prezelov P, Koinarski V, Georgieva D, (2008). *Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection among sheep and goats in the Stara Zagora Region*. Bulg J Vet Med. 11, 113-119.
- Sarnıç H, (1976). *Toxoplasma gondii antikorlarının araştırılması*. Dicle Üniv Tıp Fak. 5, 565-585.
- Soulsby EJJ, (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. Seventh Edition, London: Bailliere Tindall, p 809.
- Ural K, Alıç Ural D, Çelebi B, Haydardedeoğlu AE, Babür C, Barıtcı I, Kılıç S, (2009). *Seroprevalence of listeriosis, toxoplasmosis and brucellosis in Saanen X Kilis and Angora goats in Ankara*. Fırat Üniv Sağ Bil Vet. 23, 79-82.
- Weiland G, Dalchow W, (1970). *Toxoplasma infektionen bei Haustieren in der Türkei (Serologische Untersuchungen in Sabin-Feldman test), Berliner und Münchener Tierarztl Woch. 83, 65-68*.
- Yağcı S, Babür C, Karaer Z, Çakmak A, (1997). *Ankara yöresinde keçilerde toxoplasmosis*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 1, 94-98.

Tularemi

Derya KARATAŞ YENİ

Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 18.02.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 14.04.2013

Özet: Tularemi, esas olarak kemiriciler başta olmak üzere hayvanların bir patojeni olan fakat insanlara da bulaşarak değişik klinik tablolara yol açan *Francisella tularensis*'in etken olduğu zoonotik bir hastalıktır. Bu derlemede ülkemizde son yıllarda sular ile ilişkilendirilen salgınlara yol açması, dünya genelinde ise biyolojik silah olma özelliği nedeniyle güncel bir zoonoz olduğu kabul edilen tularemi hastalığı hayvanlar yönünden incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: *F.tularensis*, hayvan, zoonoz.

Tularemia

Summary: Tularemia is a zoonotical disease of animals especially rodents caused by *F.tularensis* and it causes different clinical symptoms in infected people. In this paper tularemia, which is accepted as a current zoonosis since it causes infections in our country by means of water reviewed and it is regarded as a biological weapon in the world, is researched from the stand point of animals.

Key words: Animal, *F.tularensis*, zoonosis.

Giriş

Tularemi, esas olarak kemiriciler başta olmak üzere hayvanların bir patojeni olan fakat bazen insanlara da bulaşarak değişik klinik tablolara yol açan *Francisella tularensis*'in etken olduğu zoonotik bir hastalıktır. Ülkemizde son yıllarda kaynak suları ile ilişkilendirilen salgınlara yol açması, dünya genelinde ise, biyolojik silah olma özelliği nedeniyle güncelleştirilmiştir.

F.tularensis, laboratuvar bulaşı yönünden dikkatli olunması gereken bir etkidir. Canlı bakteri ile çalışılıyorsa biyogüvenlik düzeyi III (Biosafety level III), şüpheli örneklerle çalışılıyorsa biyogüvenlik düzeyi II' nin sağlanması gerekir (3).

F.tularensis'in rezervuarı tam olarak bilinmemektedir, son yıllarda yapılan çalışmalarda amipler içinde bakterinin yaşadığı bilinmektedir. Bakterinin sulara, çamurda aylarca canlı kalması belki de bu şekilde olmaktadır.

Tarihçe: Tularemi, *F.tularensis*' in neden olduğu kuzey yarım küreye özgü bir zoonozdur. Hastalık, Japonya ve Rusya'da 1800'lü yıllardan beri bilinmesine rağmen, 1911 San Francisco depreminden sonra McCoy tarafından Kaliforniya'nın Tulare

bölgesinde sincaplarda görülen veba benzeri bir hastalık olarak tanımlanmış ve etken izole edilmiştir. Avrupa ve SSCB'de 1930 ve 1940'da kontamine suya bağlı salgınlara görülmesi hastalığın epidemik özellikler taşıyabileceğini de göstermiştir. Ülkemizde tularemi'nin tarihi seroloji ve klinik belirtiler ile bir olgunun tanımlandığı 1913 tarihine dayanmaktadır. Ancak, klinik ve mikrobiyolojik olarak tularemi, ilk olarak Lüleburgaz bölgesinde askeri garnizon ve yakınındaki köylerde açığa çıkan salgın ile 1936 yılında tanımlanmıştır (7).

Hastalığa ABD'de, tulareminin yanı sıra "tavşan ateşi", "geyik sineği ateşi", "pazarıcı hastalığı" denmekte; Japonya'da "Ohara hastalığı", "yabani tavşan ateşi (yato-byo)"; Rusya'da ise "su sıçanı avcı hastalığı" gibi isimler verilmektedir (14).

Etiyoloji: *F. tularensis*, kokobasillar görünüme sahip olma eğilimi gösteren, zayıf boyanan Gram negatif bir çomaktır (0.2x0.2-0.7 mm). Zorunlu aerob, hareketsiz, oksidaz negatif ve katalaz zayıf pozitifdir. Bu zor üreyen organizma üreme için kanlı agara sistin veya sistin eklenmesini gerektirir. MacConkey agarda üremez. *F.tularensis* yüksek lipid içeriğine sahiptir ve infekte hayvanlardan elde edilen virulent izolatlar kapsül oluşturur (12,15).

Nazlı üreyen bir bakteri olan *F.tularensis*'in izolasyonunda birçok besi yeri kullanılmaktadır. Bakterinin üretilmesinde geleneksel olarak Sistein-glukoz içeren kanlı agar (Francis besiyeri) kullanılmaktadır. Bunun dışında %9 ısıtılmış koyun kanı eklenmiş cystein heart agar (CHAB), sisteinle zenginleştirilmiş çukulata agar, non selektif buffered charcoal yeast extract agar (BCYE), %1 hemoglobin-%1 isoVitaleX eklenmiş GC agar base II ve thioglycollate- gulose blood agar (TGBA) gibi besi yerleri de izolasyon için kullanılmaktadır (1,8).

CHAB besiyeri *F.tularensis*'in üretilmesinde en sık kullanılan besiyerlerinden birisidir. Besiyerinde 24-48 saatlik inkubasyondan sonra bakteri kolonileri 2-4 mm büyüklüğünde yeşilimsi beyaz, düzgün yüzeyli, yuvarlak, hafif mukoid şekilde görünürler. Deri ülserlerinden alınan örneklerde kontaminant bakteriler bulunduğu için bakterinin izolasyonu daha güçtür. Bu nedenle antibiyotik eklenerek hazırlanan CHAB besiyerinde (CHAB-A) bakterinin izolasyon oranı antibiyotiksiz besiyerine göre çok daha fazladır. Bugün tulareminin rutin tanısında yaygın olarak kullanılan sentetik besiyerinin çoğunun temelini Chamberlain tarafından canlı aşı üretimi amacıyla kimyasal olarak tanımlanmış besiyeri oluşturmaktadır (1, 15).

Günümüzde kullanılan terminolojiye göre; *F.tularensis*, Proteobacteria sınıfında Gamaproteobacteria takımının, Francisellaceae familyasının Francisella genusunda bulunan bir türdür, bu genusda diğer bir tür ise *F.philomiragia*'dır (11). *F.tularensis*'in dört alttürü bulunmaktadır.

F.tularensis subsp. *tularensis*: Eski adı *F.tularensis* A (Jellison tip A) veya *F.tularensis* subsp. *nearctica*'dır. Esas olarak Kuzey Amerika'da karasal ortamlarda bulunan ve insanlar için en virulan (<10 CFU bakteri enfeksiyon oluşturabilir) olan alttürüdür. Avrupa'da kenelerde, akar ve pirelerde gösterilmiş olmasına rağmen, 1998 yılına kadar Avrupa'dan insan olguları bildirilmemiştir. Ana rezervuarları, tavşan, küçük kara kemiricileri ile Ixodide ve Tabanide lerdir. İnsanlara bulaşma genellikle kene ve tavşanlar aracılığıyla olur. Gliserolu fermente etmesi ve sitrulin üreidaz aktivitesinin varlığıyla *F.tularensis* subsp. *holarctica*'dan ayrılır.

F.tularensis subsp. *holarctica*: Eski adları; *F.tularensis* B (Jellison tip B) veya *F.tularensis* subsp. *palaearctica*'dır. Tavşanlarda hastalık yapmaz ve insanlarda yaptığı hastalık daha hafif seyir-

lidir. Primer olarak Avrupa, Sibirya, Uzak Doğu, Kazakistan ve Kuzey Amerika'da izole edilmektedir. Daha çok su kaynaklı salgınlardan sorumludur. Ana rezervuarları, tavşan ile su ve kara kemiricileridir. Bunun yanında kene ve sivrisinekler aracılığıyla da bulaşabilir.

F.tularensis subsp. *mediasiatica*: Primer olarak Orta Asya'da bulunur. Virulansı zayıftır, insan ve tavşanlarda hafif hastalık yapar.

F.tularensis subsp. *novicida*: sadece Kuzey Amerika'daki kaynaklarında saptanmıştır ve virulansı zayıf olan alttürüdür.

Francisella türlerinin sınıflandırılması üreme, biyokimyasal, virulans ve genotipik özelliklerine göre yapılmaktadır. *F.tularensis* alt türlerinin hepsi insan enfeksiyonları ile ilişkili olmakla birlikte tularensis ve holarctica alt türlerine bağlı enfeksiyonlar daha sık görülmektedir (1,4).

Epidemiyoloji: Tularemi, özellikle kuzey yarımkürede Kuzey Amerika'nın birçok kesimlerinde, Asya ve özellikle Orta ve Kuzey Avrupa'da, İskandinav ülkelerinde genellikle insanlarda sporadik olgular şeklinde ve zaman zaman epidemiler şeklinde görülmektedir. Kırsal alanda yaşayanların hastalığı olarak görülmekle birlikte, nadiren şehirlerde yaşayanlarda da tanımlanmaktadır. *F.tularensis*, doğada oldukça yaygındır. Yaklaşık 250 soğuk ve sıcak kanlı hayvan türünden izole edilmiştir. Bakterinin doğal rezervuarları çoğunlukla lagomorf (tavşan) ve karasal-sucul vahşi kemirici (sincap, su ve tarla faresi, kunduz, geyik ve rakun gibi) hayvanlardır. Tularemi, hayvanlarda genellikle ölümcül hastalık oluşturmaya rağmen, bazı kemiricilerde belirgin bir hastalık tablosu oluşturmadan aylarca varlığını sürdürebilir. Keneler ve at sineği (*Chrysops discalis*) Kuzey Amerika'da önemli vektörlerdir. *F.tularensis* için önemli kene türleri *Dermacentor variabilis*, *D.andersoni* ve *Amblyomma americanum*'dur. Bu keneler hayat sikluslarının her döneminde genellikle daha önceki dönemlerde parazitize olan konakçılardan farklı ve daha büyük olan vertebralı konakçılar üzerinde beslenirler. Evcil hayvanlar arasında direkt bulaşma yaygın değildir (4).

İnsan ve evcil hayvanlar, *F.tularensis*'in rastlantısal konağıdır. İnsanlara hastalık çok farklı şekilde bulaşabilmektedir. Hastalık en sık bakteriyi taşıyan enfekte kene veya sinek gibi vektörler tarafından ısırılmayla bulaşmaktadır (ABD ve

İskandinavya). Enfekte hayvan veya hayvanın idrar, dışkı ya da kanıyla temas sonucunda ya da bu hayvanlar tarafından ısırılma sonucunda deri-mukozal yüzeylerden bulaşmaktadır. Enfekte hayvan dokusuyla kirlenmiş suyun ve besinlerin tüketimi özellikle tularemi epidemilerinde görülen ana bulaş yollarından birisidir. Ülkemizde esas olarak su kaynaklı bulaşa bağlı tularemi görülmektedir. Daha az sıklıkla, kontamine tozların solunması veya hasta hayvanların etlerinin iyi pişirilmeden tüketilmesiyle de hastalık insanlara bulaşmasına neden olabilir. Bulaş yolları nedeniyle; avcılar, tarımla uğraşanlar, ormanda çalışanlar, doğa tutkunları, veteriner hekimler ve laboratuvar çalışanları risk grubunda yer almaktadırlar (4).

Patogenez: *F.tularensis*'in hastalık oluşturma mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, çok düşük miktarlarda infektif olabildiği bilinmektedir. Bazı yazarlarca sağlam deriden bile geçebileceği ileri sürülmüşse de bugün için deriden geçebilmesi için en azından gözle görülmeyen zedelenmelerin olması gerektiği düşünülmektedir. Bakterinin vücuda giriş yolu ve türü ile ilişkili olarak infektif dozu değişmektedir. İntradermal veya inhalasyonla 10-50 bakteri bile hastalık oluştururken, sindirim yolundan girdiğinde 108 bakteri enfeksiyon yapmaktadır. Deriden inoküle olduktan 3-5 gün sonra inokülasyon yerinde küçük bir papül oluşmakta, 2-4 gün sonra aynı bölgede ülserasyon görülmektedir. Bakterinin girdiği yerde çoğalarak bölgesel lenf nodlarına geldiği, daha sonra lenfohematojen yolla yayılarak birçok organı tutabildiği düşünülmektedir. Tularemi geçirildikten sonra hem humoral hem hücrel bağışıklık gelişir. Humoral bağışıklıkta daha çok karbonhidrat antijenlere karşı IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar oluşur ve aglütinasyon testinde yer alırlar; ancak koruyucu olmamaktadırlar. Oponizasyon olsa da bakteri hücre içinde oksijene bağımlı öldürme mekanizmasına ve hidrojen radikallerine dirençlidir. Tularemidde tam iyileşmeyi sağlayan hücrel immun yanıtı ve bakterinin protein antijenlerine karşı gelişir; CD4+ ve CD8+ T hücreleri bu bağışıklıkta yer alır. *F.tularensis* intrasellüler bir patojendir; makrofaj, hepatosit, endotel hücreleri gibi hücrelerin içinde yaşayabilir. Sistemik enfeksiyonun sonlanması α/β T hücrelerinin fonksiyonlarına bağlıdır (14).

İnsanlarda Tularemi: Tularemi, insanlarda asemptomatik veya subklinik bir seyir gösterebile-

ceği gibi, özellikle *F.tularensis* subsp. *tularensis*'in etken olduğu durumlarda hızla ilerleyen ve mortal seyreden dramatik bir tablo da görülebilir. Bu faktörlere göre ülseroglandüler, glandüler, oküloglandüler, orofarengeal, tifoid ve pnömonik tularemi olmak üzere başlıca altı klinik formda sınıflandırılmaktadır (14).

Evcil Hayvanlarda Tularemi: Evcil hayvanlardan koyunlar primer konakçıdırlar ancak tularemi kedi köpek domuz ve atlarda da bildirilmiştir. Sığırlar hastalığa karşı oldukça dirençlidir. Evcil hayvanlarda enfeksiyonun prevalansını belirlemeye yönelik klinik hastalıkların sunumu ve prevalansına dair bilgiler oldukça kısıtlıdır.

Koyunlar diğer türlere oranla hastalığa en duyarlı olandır. Hastalık kene enfestasyonlarına bağlı olarak mevsimsel bir özellik gösterir. Keneler daha çok hayvanın boynu kulak dipleri koltuk altı ve memelerinde yerleşir. Hastalığın inkubasyon periyodu 1-10 gündür. Yüksek ateş, depresyon, solunum güçlüğü, ishal sürünün gerisinde kalma, kilo kaybı, sık ve az miktarda işeme görülen klinik belirtilerdir. Gebe hayvanlar abort yapabilir. Morbidite yaklaşık %20 olup %40' a kadar yükselebilir ve mortalite özellikle kuzularda %50' ye ulaşabilir (9).

Hastalık daha çok barınak şartları uygunsuz, bakım ve beslenmesi düşük, yoğun kene enfestasyonu olan koyunlarda görülebilmektedir (5).

Kedi ve köpekler hastalıktan etkilenirler ancak klinik bulgular daha çok kedilerde gelişir. Hastalık kedilerde hiçbir klinik bulgu görülmeksizin veya lenfadenopati ve ateşle seyreden ılımlı bir enfeksiyon olarak ya da öldürücü halde seyredebilir. Hastalık genel olarak enfekte artropodlar aracılığıyla veya enfekte hayvan dokuları ile direk temas ya da yenmesi ile bulaşır. Genel olarak yüksek ateş, depresyon, lenf nodüllerinde büyüme, apse, dil veya ağızda ülser, gastroenterit, karaciğer ve dalakta büyüme, ikterus, iştahsızlık, kilo kaybı, pnömoni ve şok görülür (9).

Köpekler gerek bakteriyi taşımakla rezervuar olarak gerekse kenelere konakçılık yaparak önemli rol oynarlar (9).

Köpeklerde doğal enfeksiyon nadir olarak bildirilmiştir ve bu hayvanlar hastalığa karşı nispeten dirençlidirler. Seropozitif köpeklerin varlığının bildirilmesi hayvanların bakteri ile doğal hayatta karşı karşıya geldiğini göstermektedir. Klinik enfeksiyo-

nun bildirimini az olmasına rağmen seropozitif köpeklerin varlığı, tabiatında enfeksiyonun nadir olmadığını hastalığın hafif veya subklinik seyrettiği fikrini desteklemektedir. Bunun yanı sıra diğer klinik belirtiler ateş depresyon göz ve burundan mukopurulent (irinli mukus) akıntı temas alanlarında püstüller, şişmiş lenf yumruları ve iştahsızlık belirtileri ile seyreden klinik tablo ortaya çıkmıştır. Olguların çoğunda hayvanlar destek tedavileri ile kendi kendilerine iyileşirler. Genç köpekler yetişkinlere göre daha duyarlıdır. Köpeklere *F.tularensis* ile kontamine dokuların yedirilmesi sonucu oluşan deneysel enfeksiyonda gözlenen belirtiler doğal enfeksiyonda gözlenen belirtilerle aynı özellikleri taşımaktadır. İntradermal inokulasyon sonucu oluşturulan deneysel enfeksiyonda ise ateş, enfeksiyon bölgesinde püstül oluşumu ve bölgesel lenf yumrularında yangı gözlemlenmiştir (13).

Yetişkin domuzlar tularemiye karşı kısmen dirençli olmalarından dolayı hastalık latent seyretilmektedir. Gençlerde ateş, solunum güçlüğü ve depresyon belirtileri gözlemlenmektedir. Yavrularda deneysel enfeksiyonda yaklaşık iki günlük inkübasyon döneminin ardından koordinasyon bozukluğu, depresyon, iştahsızlık ve sinirsel belirtiler görülmektedir (9).

Atlar tularemiye karşı nispeten dirençlidirler ve atlarda klinik belirtilerin bildirimini oldukça azdır. Enfekte atlarda ateş, solunum güçlüğü, depresyon, koordinasyon bozukluğu, ataksi, bacaklarda ödem, yoğun kene enfestasyonu ve serokonversiyon gözlemlenmiştir (9).

Sığırlarda tipik klinik belirtiler tam olarak bilinmemesine rağmen, yaygın olarak seropozitif sığırların bildirilmesi doğal enfeksiyonun varlığını göstermektedir. Sığırlarda kene enfestasyonu ile *F.tularensis* arasında bir ilişkinin mevcut olduğu sonucunu ortaya koyan bir çalışma mevcuttur (9).

Lagomorphalar ve rodentler hastalığa karşı oldukça duyarlıdır. Doğal enfekte olan bu hayvanlar çoğunlukla ölü olarak buldukları için, bu hayvanlarda klinik belirtiler tam ortaya konulamamıştır.

Genel olarak ülkemizde 2005 yılına kadar rodent ve tavşanların suları kirletmesi ve klorlanmamış su ya da kaynak suyu tüketimine bağlı olarak daha çok sulak tip yerlerden (özellikle ormanların arasında küçük tarım alanları olan yoğun ormanlık bölgeler) tularemi olguları bildirilmiştir. Ülkemizde

az sayıda ve sporadik olgular şeklinde bozkır alanlardan tularemi vakaları da gözlenmiştir. Ancak, 2009'un sonbaharında başlayan tularemi salgınında; İç Anadolu Bölgesinde etkenin "bozkır" alanlarında yerleştiği ve giderek daha güney bölgelere indiği görülmektedir. Ayrıca, daha önceki yıllarda olduğu gibi sadece sonbahar ve kış mevsimi ile sınırlı kalmayarak, kurak yaz aylarında da vakaların görülmesi tularemi eko-epidemiolojisinde belirgin bir dalgalanmayı işaret etmektedir. Tularemi olgularının tanımlandığı dönemdeki farklılıklar ve vaka görülen yerlerde ki belirgin artış, tarımsal alanların genişlemesi, vahşi yaşam ve vektör popülasyonundaki değişimlere bağlanabilir. Genel olarak yağışlı yılları takiben kemirici sayısında belirgin bir artış gözlenmektedir. Ülkemizde 2007 ve 2008 yılların yağışlı geçmesine bağlı olarak, tularemi olguları saptanan bölgelerde kemirici hayvan sayısında belirgin olarak artış gözlenmiştir. Ancak, etken herhangi bir salgın oluşturmadan bir odakta uzun süre kalabilmektedir. Doğada daha önceden var olan odaklardaki kemirici sayısındaki önemli artışa bağlı olarak rezervuarların yaşam alanlarına girerek su kaynakları ve gıda depolama alanlarını (kilerleri) kirletmesi salgınların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Köylerde içme sularının klorlama işlemlerinin düzenli yapılamaması, su depolarının düzenli aralıklarla temizlenmemesi, su depolarının küçük hayvanlarının girişini yeterli düzeyde engelleyecek yapıda olmamaları ve köy çeşmelerinin kaynak sularından beslenmesi nedeniyle sular kolayca kontamine olmaktadır. Ancak, köy su depolarının küçük hacimli olması nedeniyle depoların hızlı boşalmasına bağlı olarak sularda anlamlı kirlenme söz konusudur (2).

Kemirici sayısındaki artış tek başına hastalığın bir coğrafyada yerleşmesi ve devamlılığı için yeterli değildir. *F.tularensis*'in doğadaki devamlılığında çok sayıda biyolojik ve mekanik vektör rol almaktadır. Keneler hem konak hem de rezervuar olarak tularemi eko-epidemiolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Tularemi vakalarının görüldüğü bölgelerde diğer kene popülasyonundaki artış rezervuarların daha fazla oranda enfekte olmasına yol açmış olabilir (2).

Teşhis: *F.tularensis*'in kültürlerden başarılı bir şekilde izolasyonu; serolojik tayini ve moleküler yöntemlerle araştırılması için klinik örneklerin uygun bir şekilde alınması ve uygun şartlarda laboratuvara iletilmesi ile yakından ilişkilidir. Kültür işlemleri

nin yüksek güvenilirlikli laboratuvar ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle günümüzde tularemi tanısında klinik ve çevresel örneklerden kültür yerine serolojik testler en sık kullanılan tanı yöntemleridir (3).

Sağaltım: İnsanlarda olduğu gibi hayvanlarda da hastalığın tedavisi ve şiddetinin azaltılmasında streptomisin, gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve florokinolonlar ilk seçenек antitibiotiklerdir.

Tedaviye erken başlanması hastalığın şiddetini ve kayıplarını azaltmaktadır. Etkenin hücre içi patojen olması nedeniyle uzun süreli tedavi gerektirebilir. Gerekli durumlarda antibiyotik tedavisinin yanı sıra destek tedavisi de uygulanmalıdır. Hayvanlarda tularemi tedavisi üzerine yapılan sistemik denemeler oldukça azdır. Bu nedenle insandaki sonuçlara göre tedavi seçenekleri ortaya konulmaktadır. Kuzulara uygulanan oksitetrasiklinin (6-10 mg/kg) penisilin ve streptomisinden daha etkin olduğu bildirilmiştir. Siprofloksasin ve doksisisiklin farelerde tularemi tedavisinde başarıyla kullanılmıştır. Bazı üçüncü ve dördüncü kuşak kinolonların ise (gantifloksasin ve moksifloksasin) farelerdeki in-vivo çalışmalarda *F.tularensis*'e karşı daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. İn vitro antibiyotik duyarlılık testlerinde insan ve hayvan kaynaklı *F.tularensis* suşlarının tularemi tedavisinde kullanılan klasik antibiyotiklere (streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, aminoglikozitler) duyarlı olduğu ancak kinolonların (siprofloksasin ve grepafloksasin) daha etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada beta-laktam antibiyotikler ve azitromisin etkili bulunmamıştır (13).

F.tularensis tip A ve *F.tularensis* tip B'nin rifampisine duyarlı olduğunu ayrıca aminoglikozidler ve kinolonlarla kombine olarak kullanımında daha da etkili olduğu tespit edilmiştir (6).

Koruma: İnsanlarda meydana gelen tularemi salgınları, enfekte hayvanların ile doğrudan teması ile ortaya çıkabilir, vektörler tarafından hastalığın taşınmasıyla, aerosol yolla veya enfekte su ve gıda maddeleriyle etkenin ağızdan alımı sonucunda oluşabilir. Bazı salgınlar birkaç farklı yoldan ortaya çıkabilir (10). Hayvanlarda tulareminin kontrolü zordur. Kene enfestasyonunun azaltılması ve erken teşhis ve tedavi uygulanması önemlidir. Koyunlarda tularemi salgınlarında ilk yapılacak iş artropod vektörlerin eliminasyonu amacıyla insektisit sprey ve solüsyon uygulanmasıdır (10).

Kenelerin yaygın olduğu bölgelerde hayvanlar çayır ve meralardan uzak tutulmalı ve genel kene mücadelesi yapılmalıdır. Tulareminin endemik olduğu bölgelerde hayvanların başta lagomorf ve rodentler gibi hasta veya ölü hayvanlara temas etmemeleri sağlanmalıdır. Bu bölgelerde kedi ve köpek gibi evcil hayvanlar mümkün olduğunca kapalı alanlarda tutulmalıdır. Pet hayvanlarının lagomorf ve rodentlerin doğal hayat alanlarına girmelerine ve özellikle av köpeklerinin av sırasında tavşanları yemelerine izin verilmemelidir. Tularemi, endemik doğal alanlardaki su kaynakları ve akarsulardan evcil hayvanlar uzak tutulmalıdır. Ayrıca etkenin biyolojik silah olarak kullanılma potansiyeli de dikkate alınmalıdır (10).

Hastalıktan iyileşme sonucunda uzun süreli bir doğal-aktif bağışıklığın kalması söz konusudur. Hayvanlar için canlı attenüe bir aşı geliştirilme aşamasında olmasına rağmen günümüzde hayvanlarda tularemiye karşı aktif koruma amacıyla üretilen bir aşı mevcut değildir (10).

Sonuç

Ülkemizde güncelliğini koruyan ve önemli zoonozlardan biri olan tularemi, veteriner hekimlikte tanı açısından üzerinde durulması gereken bir hastalık haline gelmiştir. Son 50 yıl içinde hastalığın ülkemizde yayılışı sebebiyle, rezervuarlar, vektörler ve iklimsel değişiklerin etkileri konusunda çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- 1- **Anonim**, (2007). *WHO Guidelines on Tularaemia*. Who/cds/epr/2007.7
- 2- **Anonim**, (2011). *T.C. Sağlık Bakanlığı, Tularemi Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi*. **Erişim Adresi:** <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/TularemiSahaRehberi.pdf>, **Erişim Tarihi:** 19.12.2012.
- 3- **Çelebi B**, (2010). *Tularemi: Laboratuvar Tanı, III. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyum Kitabı*.
- 4- **Çelebi G**, (2004). *Tularemi*. **Erişim adresi:** <http://www.klimik.org.tr/bilgi-merkezi/tularemi/tularemi-yrd-doc-dr-guven-celebi-zonguldak-karaelmas-universitesi-tip-fakultesi-infeksiyon-hastalıkları-ve-klinik-mikrobiyoloji-anabilim-dali/>, **Erişim Tarihi:**21.12.2012.
- 5- **Daly R, Miskimins D**, (2005). *Tularemia in Animals in South Dakota*, **Erişim adresi:** <http://www.vetsci.sdstate.edu/vetext/tularemia>, **Erişim tarihi:** 09.06.2011.
- 6- **Ikaheimo I, Syrjala H, Karhukorpi J, Schildt R, Koskela M**, (2000). *In vitro antibiotic susceptibility of Francisella*

- tularensis isolated from humans and animals. J Antimicrob Chemother.* 46, 287-290.
- 7- **Kılıç S**, (2006). *Biyolojik silah olarak bakteriler*. Türk Hij. Den. Biyol. Derg. 63, 21-46.
- 8- **Kolaylı F**, (2009). *Francisella tularensis Kültürü ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri*. Gürçan Ş. ed. *Francisella tularensis ve Tularemi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. p. 273.
- 9- **Otlu S**, (2009). *Hayvanlarda Tularemi Araştırmaları ve Dünyadaki Durum*. Gürçan Ş. ed. *Francisella tularensis ve Tularemi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. p. 161-168.
- 10- **Öztoprak N**, (2009). *Koruma ve Kontrol*. Gürçan Ş. ed. *Francisella tularensis ve Tularemi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. p. 299.
- 11- **Sjostedt A**. *Francisella*. In: **Brenner DJ, Kreig NR, Staley JT, Garrity GM, eds.**, (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. The Proteobacteria. 2nd edition. New York. Springer. p. 199-210.
- 12- **Stewart SJ**, (1995). *Francisella*, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. *Manuel of clinical microbiology*. 6th edition. American Society for Microbiology Press, Washington D.C. p. 545-548.
- 13- **Ünver A**, (2009). *Hayvanlarda Tularemiden Koruma ve Kontrol*. Gürçan Ş. ed. *Francisella tularensis ve Tularemi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. p. 297.
- 14- **Willke A**, (2006). *Tularemi*. ANKEM Derg. 20, p. 222-226.
- 15- **Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL, eds.**, (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. p. 491-497.

Q Humması

Elçin GÜNAYDIN¹, Hamit Kaan MÜŞTAK²

¹ Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı, Ankara

² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 20.06.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 30.06.2013

Özet: Q humması; obligat intrasellüler, faz varyasyonu sergileyen, çevresel şartlara direnç gösteren ve fagolizozomlar içerisinde hayatta kalma kabiliyetine sahip bir bakteri olan, *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu önemli bir zoonozdur. Bu zoonoz hastalığa neden olan etkeninin özelliğinin, bulaş yollarının, hastalığın patogenezinin anlaşılması, teşhisinin hızlı ve doğru bir şekilde yapılmasına yardımcı olacaktır. Bu makalede, etken özellikleri, bulaş yolları, patogeneze ve teşhis metodlarına değinilmiştir.

Anahtar sözcükler: Q humması, *Coxiella burnetii*.

Q Fever

Summary: Q fever is a significant zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular bacterium, exhibiting phase variation, resistant to environmental conditions, capable of surviving in phagolysosomes. Understanding of the features of the agent causing the zoonosis, contamination path, and the pathogenesis will contribute to rapid and accurate diagnosing. In this review, features of the agent, contamination path, pathogenesis and diagnostic methods are mentioned.

Key words: Q fever, *Coxiella burnetii*.

Giriş

Q humması terimi, ilk kez 1935 yılında Edward Holbrook Derrick tarafından Avustralya'nın Brisbane şehrinde, mezbaha işçilerinde meydana gelen ateşli hastalığı tanımlamak için kullanılmıştır (16). Etken, CDC tarafından, 'Kategori B, Kritik Biyolojik Ajan' ve biyoterörizm yönünden potansiyel biyolojik silah olarak kabul edilmektedir (43). *Coxiella burnetii* (*C.burnetii*), Yeni Zelanda ve Antartika dışında, tüm dünyada salgınlara neden olan çok önemli zoonozdur. Q humması, birçok bölgede endemik seyreder, sporadik enfeksiyon ya da salgınlar şeklinde epidemilere yol açar. Q humması'nın oldukça önemli bir zoonoz enfeksiyon olduğu, patlak veren insan salgınlarıyla ortaya çıkmıştır. Hollanda'da 2007 yılında yaşanan salgın ve bu salgını izleyen periyotta, insidensin pik yapması, görüldüğü coğrafik bölgenin progresif genişleyişi, Q humması'na verilen önemi arttırmıştır. Buna rağmen, salgınlara neden olan faktörler tam anlamıyla ortaya konamamıştır. (18,20). Hastalığın insidensi muhtemelen rapor edilenin oldukça üzerindedir.

C.burnetii enfeksiyonları genellikle asemptomatiktir, fakat memelilerde yavru atmaya ve ölü doğumlara yol açabilir (8). Bu hayvanlarda en sık görülen klinik belirtiler; yavru atma, ölü doğumlar ve zayıf yavru doğumlarının yanısıra, pnömonidir (8). İnsanlarda Q humması akuttan öldürücü kronik enfeksiyonlara kadar değişebilen klinik formlarda seyredebilir. 2-5 haftalık bir inkubasyon süresinden sonra gelişen Akut Q humması, grip benzeri hastalık, spesifik olmayan ateş, pnömoni veya hepatit ile karakterizedir. Kronik Q humması vakalarının %75 kadarında kültür negatif endokardit görülür (25). Kalp kapağı lezyonları, vasküler anomaliler ve immün yetmezlik kronik Q humması'nın hazırlayıcı koşullarıdır (25). Etken insanlar, ruminantlar (sığır, koyun, keçi), köpek, kedi ve nadiren kuşlar, sürüngenler ve keneleri içeren geniş bir konakçı spektrumuna sahiptir (30).

Etkenin Özellikleri: Etken, Gram negatif, zorunlu hücreiçi bir bakteri olup, fagositlerin fagolizozomları içerisinde hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir. Daha önceleri, Rickettsiaceae familyası

içerisinde değerlendirilse de, 16 S rRNA sekans analizi baz alınarak yapılan filogenetik analizler, *C.burnetii*'nin Proteobacteria'nın alfa alt sınıfında bulunan *Rickettsia* genusundan uzak olduğunu göstermiştir (3). *C.burnetii*, Rickettsialara benzemek-sizin, küçük, yoğun, oldukça dirençli spor-benzeri formlar oluşturur. (14). Spor-benzeri formlar oluşturma kabiliyeti, *C.burnetii*'nin gelişim siklusunda yer alan, in-vitro çalışmalarla ortaya konulan siklus varyantları; small cell variants (scv; küçük-hücre varyantları), large cell variants (lcv; büyük hücre varyantları), small dense cells (sdc; küçük yoğun hücreler)'lerden ileri gelir (14). İnfeksiyöz partiküller olan sdc ve scv'ler bakterinin ekstrasellüler ortamda hayatta kalmasını sağlayarak, çevresel şartlara direnç gösterme ve bulaşma özelliği kazandırılır (4,18,20). Bakterinin önemli özelliklerinden biri de; infekte hayvan ve insanlardan izole edilen patojenik faz 1 ve in-vitro veya in-ovo pasajlarla attenüe edilen faz 2 antijenik formlarının olmasıdır. Seri pasajlar sonrası, Lipopolisakaritte (LPS) değişimler meydana gelir: Tam uzunlukta LPS O-zincirleri olan faz 1 antijenleri, LPS'nin uzunluğunda azalmalar meydana gelerek, önce ara faza daha sonra faz 2'ye dönüşür. Uzun faz 1 LPS, faz 2 kısmını da içerir. Faz 2 asıl immunojenik determinanttır. Buna karşın, aşılama ise faz 2'den ziyade faz 1 antijeni ile hazırlanan aşılarda efektif olarak yapılabilmektedir. (4,20). Coxiella varyantlarında, QpH1, QpRS ve QpDG olmak üzere 3 plazmid tanımlanmıştır (43). QpDV plazmid ise sadece insanlarda, endokardite neden olan suştan izole edilmiştir (43).

Bulaşma şekilleri: Hayvanlar enfeksiyonu hastalıklı materyal ile direkt temas ve kenelerden alırlar (43). İnsanlar sıklıkla infekte hayvanların dışkıları, sütleri, plasentaları, vücut sıvıları ile etrafa saçılan kontamine aerosollerin inhalasyonu ile infekte olurlar (3). *C.burnetii*'nin bulaşması genellikle evcil ruminantların ve özellikle koyunların yavru atması ile ilişkilidir (3). Koyun ve keçilerde kırkma veya yavru olmanın olduğu ilkbahar döneminde, çevresel kontaminasyona yol açarak ilkbahar ve yaz başlangıcında hastalığın insanlardaki insidensinde artış olduğu bildirilmiştir (43). *C.burnetii*'nin çevrede uzun süre canlı kalması uzaklara rüzgârla taşınmasını sağlar (7, 30) Böylece, Q humması hayvanlarla herhangi bir teması olmayan insanlarda da görülebilir (7,30,43). İnsanlar kontamine yün, gübre veya dışkı ile kontamine elbiselere elle dokunmayla infekte olabilirler (7). Kontamine çiğ süt veya çiğ

süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu etkenin sindirim yoluyla bulaşması nadirdir ve hatta hala tartışılmaktadır (43).

Patogenez: İnfeksiyonun en önemli giriş yolu, bakteri ile infekte tozun inhalasyonudur. Oral yolla etkenin alınışı, ikincil öneme sahiptir. *C.burnetii*'nin ekstrasellüler formu (small cell variant;scv) solunum veya sindirim yoluyla alındıktan sonra, bakteri öncelikle hücre membranına tutunur ve hücre içine girer. Fagolizozomlar, sellüler, asidik lizozomlar ile fagozomun füzyonundan sonra oluşur. Çoklu intrasellüler fagolizozomlar, en son aşamada bir araya gelir ve tek büyük bir vakuolün oluşumunu sağlar. *C.burnetii* ökaryotik hücrelerin fagolizozomlarına adapte olur ve asidik vakuollerde üreme yeteneğine sahiptir (43). Nutrient asimilasyonunu, nükleik asit ve aminoasit sentezini de kapsayacak şekilde asidite, bakterinin metabolizması için önemlidir (43). *C.burnetii* üremesi, klorokin gibi lizozomotropik ajanlar kullanılarak, fagolizozomal pH'da artışla durdurulabilir (43). *C.burnetii*'nin fagolizozom içerisinde hayatta kalma mekanizması hala çalışmalarla ortaya konmaya çalışılmaktadır. Mo ve ark. (1995) (40), Akporiaye ve Baca (1), intrasellüler yaşam için gerekli olan 3 protein tanımlamıştır: superoksidaz dismutaz, katalaz, makrofaj infektivite potentiator (Cbmip). Red ve Thompson (44), Cbmip'in sekresyonunun ve eksportunun invitro şartlarda, asit pH ile sağlandığını ortaya koymuştur. Daha sonraki çalışmalarda, *C.burnetii* üremesinin reaktif nitrojen ve reaktif oksijen araçları (reactive oxygen intermediates; ROI) ile azaltıldığı tespit edilmiştir (9). Hill ve Samuel (2011) (33), *C.burnetii* genomunu analiz ettikleri çalışmalarında, 2 asit fosfataz enzimi tanımlamışlardır. Aynı araştırmacılar, deneysel çalışmalarında, hem rekombinant asit fosfataz enziminin (rACP) hem de *C.burnetii* ekstraktlarının, pH bağımlı asit-fosfataz aktivitesine sahip olduğunu, rACP ve bakteriyel ekstraktların, polimorf nükleer (PMN) hücreler yardımıyla ROI cevabını inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Faz I ve Faz 2 bakteri ile persistent infekte hücreler üzerine yapılan çalışmalarda, infekte ve infekte olmayan hücrelerde benzer mitotik oran rapor edilmiştir (43). Ayrıca, araştırmacılar, infekte hücrelerde asimetric selüler bölünmeler gözlemlemiş ve bu durumun persistent infeksiyonun devam etmesine önderlik ettiğini öne sürmüşlerdir (43). *C.burnetii*'nin intrasellüler siklusu, scv ve lcv olarak bilinen, bakterinin 2 gelişme evresinin formasyonuna önderlik etmektedir (48).

Small cell varyantlar, 0.2-0.5 µm büyüklüğündedir ve metabolik olarak inaktiftir. Sıcaklık, kuruluk, düşük-yüksek pH, dezenfektanlar, kimyasal ürünler, osmotik basınç ve uv ışınları gibi ekstrem şartlara direnç gösterme kabiliyetine sahiptirler. Çevresel koşullara karşı gösterdikleri dirençle, uygun konakçı yokluğunda, bakteri uzun periyotta hayatta kalır (48). *C.burnetii* scv'leri reversible'dır (43). SCV bir kere solunum ya da sindirim yolu ile alındığında, membrana tutunur ve içeri girer. Fagolizozomal füzyon sonrasında, yeni oluşan vakuolün asiditesi, scv metabolizmasının aktivasyonuna ve lcv'ye gelişmesine yol açar. Scv'den lcv'ye morfogenez esnasında, bakteri sayısında herhangi bir artış olmadığı rapor edilmiştir (14). Lcv, *C.burnetii*'nin metabolik olarak aktif intrasellüler formu olarak kabul edilmektedir. Lcv'ler scv'lere nazaran daha pleomorfiktirler ve uzunlukları 1 µm'yi geçer (14). İntrasellüler gelişimleri, çok yavaştır. Scv'ler ikili asimetrik bölünmelerle, spor benzeri bakterilerden ayrılırlar. Endojen spor-benzeri formlar, scv formuna ulaşana kadar meatabolik gelişim ve değişime uğrar. Sonuç olarak, hücre lizisi veya ekzositozis ile dirençli bakteriyi ekstrasellüler ortama salarlar (14). Sporulasyon-benzeri süreçten sorumlu fiziksel ve biyolojik faktörler henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır (14). Rousset ve ark. (46)'nın yaptıkları çalışmaya göre, *C.burnetii*'nin neden olduğu birçok doğal infeksiyon, çevrede mevcut olan pseudospor ve scv'ler orijinelidir. Bundan dolayı, Q humması ile mücadele, hijyenik koruyucu önlemler olarak, çevrede bulunan *Coxiella* pseudosporlarını minimize etmekle başarılıdır. Doğal ve deneysel infekte bireylerde yapılan immun reaksiyon çalışmaları, *C.burnetii* infeksiyonunun kontrolünde, hücrel immünite ve IFN gama sentezinin oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır (46). IFN gama antibiyotik terapisine cevap vermeyen Q humması hastalarının tedavisinde başarıyla uygulanmaktadır (46). Shannon ve ark. (50)'nin yaptıkları çalışmada, in-vivo koruyucu antikor bağımlı immünitenin hücrel Fc reseptörlerinden ve komplemantten bağımsız olduğu ortaya konmuştur. IgG antikorlarını içeren aşı deriviye humoral immun yanıtın proteinlere karşı şekillendiği bildirilmiştir (52). *C.burnetii*'ye karşı doğal humoral immun yanıt, proteinlere ve glikolipid fraksiyonlarına karşı şekillenmektedir (52). Chen ve ark. (12), 8 yeni CD4+ T-hücre epitopu tanımlamışlardır. Ancak tüm CD4+ T hücre epitoplarının da, B-hücre stimü-

lasyonunu ve spesifik antikor üretimine yol açmadığı bilinmektedir. Kronik infeksiyonlarda periferik kan lenfositleri diğer antijen ve mitojenlere karşı proliferasyon olmasına rağmen, *C.burnetii* antijenleri ile karşılaştıklarında proliferasyon olmazlar, bu durum akut infeksiyonlarda ise tam tersidir (43). Ayrıca, hamilelik esnasında hormonal değişim, hamile bireyin bünyesinde reaktivasyona neden olup, immunomodulasyon şekillenir. İmmunomodulasyon, plasentada mikroorganizmanın artışıyla sonuçlanır (43).

Teşhis

Direk Teşhis: Direk teşhis metotları, bakterinin veya komponentlerinden birinin varlığını ortaya koymaya dayalı metotlardır.

a) Boyama ve Direkt Bakı: Smear preparatlarında veya donmuş dokularda, *C.burnetii*'nin direk bakısı Q humması diagnozu için bir metottur. Smearlar abort yapmış hayvanların plasentasından, mide içeriğinden veya diğer vücut dokularından alınır. *C.burnetii* teşhisinde, Gimenez boyama tercih edilir (26). Macchiavello boyama veya Giemsa boyama da kullanılan boyama teknikleri arasındadır. Preparatlarda *Brucella* spp., *Chlamydophila* spp. veya *Chlamydia* spp. gibi diğer patojenlerle *C.burnetii*'nin karışma olasılığından dolayı bakteriyoskopi ile direk bakının sensitivitesi ve spesifitesi, oldukça düşüktür (28).

b) İmmunohistokimya (IHK): IHK, kronik Q humması vakalarının teşhisinde uygulanır. Parafine fikse edilmiş dokularda veya aseton smearlarda kullanım alanı bulmuştur. Dilbeck ve McElwain'in geliştirmiş olduğu avidin-biotin-peroxidase complex Immunohistochemistry (IHC) boyama metodu, aborttan sonra koyun-keçi plasental dokularının rutin incelenmesinde uygulanmıştır (17). Bu teknik hızlı olmakla birlikte teşhis için taze dokulara ve canlı bakteriye gereksinim duymaz ve aynı zamanda saklanmış dokularda retrospektif analiz yapılmasını sağlar. Ancak, geniş çaplı retrospektif analizler için uygun değildir (43).

c) İzolasyon: İn vitro hücre kültürü, bakteriyel infeksiyonların teşhisinde gold standart metottur. *C.burnetii*'nin civciv embriyolarının yumurta sarılarında, kültürü yapılabilmektedir. Aynı zamanda insan embriyo akciğer fibroblastları, yeşil maymun böbrek hücreleri (Vero), L hücreleri vs. de kültür için uygun ortamlardır. Ancak teknik olarak, *C.burnetii* kültürü oldukça zor bir işlem olmakla

birlikte metodun duyarlılığı son derece düşüktür. *C.burnetii* hücre-ari medyumlarda konak hücre dışında da ürer (42). Son yıllarda kullanılan, hücre-ari medyumlar fagolizozom içerisinde organizmanın metabolik ihtiyaçlarını karşılayan kompozisyonlar içerir. Bakteriyel izolasyonun pratikte uygulanmasına bir diğer engel, etkenin yüksek infektivitesinden dolayı Biyogüvenlik Düzey 3 (Biosecurity Level 3;BSL3) laboratuvara gereksinim duyulmasıdır. Bu nedenle kültür veteriner alanda nadiren yapılmaktadır. Bütün bunlara ilaveten, bakteriyel izolasyon temelli epidemiyolojik çalışmalar pratik değildir (3).

d) Polymerase Chain reaction (PCR): Diğer laboratuvar teknikleri ile karşılaştırıldığında, özellikle hastalığın erken döneminde PCR, *C.burnetii* teşhisinde oldukça yararlıdır. (23, 24). PCR ile hücre kültürleri, biyopsi materyali, kan, süt, artropodlar ve serumu içine alan çeşitli örneklerde *C.burnetii* DNA'sı başarılı bir şekilde tespit edilebilmektedir (11,15,21,36,41,51). PCR, özellikle portörleri saptamada güvenilir, duyarlı ve hızlı bir teşhis metodudur (23). *C.burnetii* teşhisi için, konvansiyonel PCR (11,19,35,39,53), nested-PCR (54,55), real-time PCR (49,45,51) gibi birçok PCR tekniği geliştirilmiştir. PCR'ın sensitivitesi ve spesifitesi oldukça yüksektir. Ancak, konvansiyonel PCR'ın yararlılığı, mevcut bakterinin miktarını belirleyememesi dolayısıyla sınırlıdır. (8,10). Real-time kantitatif PCR (RTq PCR) etkenin teşhisinde hızlı bir metod olmakla birlikte, etkenin kantifikasyonu içinde bilgi edinmemizi yardımcı olmaktadır. Özellikle antikorların henüz şekillenmediği, infeksiyonun erken safhasında PCR oldukça güçlü ve güvenilir bir teşhis aracıdır (49). Schneeberger ve ark. (2010)'nın (49), yaptığı çalışmada, seronegatif akut Q humması hastalarının %98'inde ve anti-phase 2 IgM seropozitif hastaların %90'unda *C.burnetii* DNA'sının tespit edilebildiği ortaya konmuştur. Serolojik cevap şekillenmeye başladıktan sonra PCR kademeli olarak negatif sonuç vermektedir (49). Hou ve ark. (34), IgM antikorlarının yokluğu ve pozitif PCR sonuçları arasında önemli bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Hastalığın ilk 2 haftasında örneklemeye yapılan Q humması vakalarında, henüz antikor oluşumu şekillenmediği için serolojiyle sonucun sıklıkla negatif bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, yanlış negatif sonuçların önüne geçmek adına, rutinde PCR ve serolojinin kombine uygulanmasını önermektedirler. Ancak, PCR ve Rtg PCR canlı ve ölü bakteri DNA'sı ayrımını yapı-

mamaktadır (38). Yanlış negatif sonuç alma riskini minimize etmek için, örneklemenin yapıldığı gün PCR uygulanmalıdır. Guatteo ve ark. (29), örneklemenin ilk gününde PCR ile pozitif çıkan süt ve vajinal svap örneklerinin, deepfreeze'de -20 °C'de 3 gün saklanıp, örnekler tekrar PCR'a alındığında süt örneklerinin sadece 2/3'ünde, vajinal svap örneklerinin 1/2'sinde PCR ile pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

e) Genotiplendirme Metotları: O fever'ın epidemiyolojisi, geniş konakçı dağılımı, çevresel koşullara direnç gösterme kapasitesi ve etkenin multifaktöriyel hava-yolu bulaşımı dolayısıyla oldukça komplekstir. Farklı coğrafik alanlarda, Q humması'nın çeşitlilik gösteren epidemiyolojisinin anlaşılması için izolatların karakterizasyonu gerekli olmasına rağmen, moleküler epidemiyoloji açısından ayırt edici tiplendirme metotları halen geliştirilme aşamasındadır (13,37). Genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi (32), Pulsed Field Gel Electrophoresis (31), sekans ve/veya icd (isocitrate dehydrogenase), com1 (outer membrane protein) ve mucZ (mucoidy activation protein) genlerinin PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) analizi (2) gibi birçok tiplendirme metodu, *C.burnetii* suşlarının karakterizasyonunda kullanım alanı bulmuştur. Son yıllarda PCR-tabanlı 2 tiplendirme metodu; multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) (4) ve Multispacer Sequence Typing (MST) (27) *C.burnetii*'nin tiplendirilmesinde izolasyona gereksinim duymadan kullanılmaktadır.

İndirekt Teşhis: İndirekt teşhis metotları, *C.burnetii* infeksiyonlarına karşı spesifik humoral ve hücrel immüniteyi belirler.

a) Komplement fiksasyon testi (CFT): Veteriner hekimliğinde CFT, OIE'ye göre serolojik teşhiste referans metottur (3). CFT genellikle phase 2 antijenlerini kullanır. Klinik infeksiyondan sonra 2. haftada yaklaşık olarak antikorların %65'ini, 4. haftada %90'nını tespit eder (3). CFT, immunofloresan veya ELISA testinden daha zahmetli, spesifitesi ve sensitivitesi daha düşük bir testtir (22). CFT, ELISA ile karşılaştırıldığında, bütün IgG alt sınıflarını tespit etmekte yetersiz kalmaktadır. Ruminantlarda, sadece IgG1 komplemanı fikse eder ve CFT ile teşhis edilebilir. Ayrıca, potansiyel olarak serumda bulunan, IgG2, IgM ve antikomplement substansları, IgG1'in fiksasyonunu interfere eder (47). Rousset

ve ark (55), düşük sensitivitesinden dolayı hayvanların serolojik olarak izlenmesinde CFT'yi önermemektedir.

b) Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA): Bu metot, CFT'ye göre daha duyarlı, uygulanması ve standardizasyonu kolaydır (3). CFT ile karşılaştırıldığında ELISA'nın komplemente bağlanma yetisine sahip olmayan IgG2 alt sınıf antikorlarını tespit edebilmesi yüksek sensitivitesini göstermektedir (37).

c) Immunofloresan Test (IFA): IFA, insan hekimliğinde en çok kullanılan ve referans diagnostik test olarak kabul edilen bir teşhis metodudur (3). Güvenilir, oldukça duyarlı ve özgündür (3). Rousset ve ark (47), keçilerde yaptıkları bir çalışmada, IFA ve ELISA sonuçlarının örtüşüğünü bildirmişlerdir. IFA, *C.burnetii*'nin 2 antijenik varyantını (faz 1 ve faz 2) tespit etme yeterliliğindedir. Akut infeksiyonlarda anti-faz 2 antikorları tespit edilmektedir. Kronik infeksiyonlarda ise anti faz 1 ve anti faz 2 antikorları mevcut olmasına rağmen, anti-faz 1 antikorları predominanttır (3). Anti-faz 2 antikorları infeksiyonun bütün safhalarında bulunduğu için, epidemiyolojik amaçlı izlemeler, anti-faz 2 antikorlarına temel alınarak yapılır (47).

CFT, IFA, ELISA testlerinin diagnostik değeri antikor varlığına bağlıdır. İnfeksiyonun ilk 2-3 haftası boyunca antikor şekillenmemesi, seroloji ile erken teşhis adına dikkate alınması gereken bir olumsuzluktur.

Sonuç

Veteriner hekimliğinde, Q humması şimdiki kadar üzerinde çok fazla durulmayan, göz ardı edilen önemli bir zoonozdur. Hastalık etkeninin faz varyasyonu geçirmesi, çevresel şartlara son derece dayanıklı olması, çok geniş yelpazede hayvan türü ve insanı infekte etmesi, rezervuar hayvanların olması, olası bulaş kaynaklarının çeşitliliği ve hastalığın persistent seyretmesi gibi birçok faktör hem insan hem de hayvan sağlığını risk altına sokmaktadır. Q humması ile mücadelenin yolu; potansiyel bulaş kaynaklarının, hastalığın patogenezinin bilinmesi ve ardından doğru zamanda, doğru örneklemelerle teşhisin konulmasıyla başarılabilir. Bu derlemede, hastalık etkenini farklı kılan özellikleri, patogenezi ve teşhis metotlarına değinilmiştir. Hastalığın erken teşhisi, hem sağlık hem de ekonomik açıdan ülke hayvancılığı, zoonoz olması dolayısıyla da in-

san sağlığı yönünden göz ardı edilemeyecek kadar önemlidir.

Kaynaklar

1. Akporiaye ET, Baca OG, (1983). *Superoxide anion production and superoxide dismutase and catalase activities in Coxiella burnetii*. J Bacteriol. 154, 520-523.
2. Andoh M, Nagaoka H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, (2004). *Comparison of Japanese isolates of Coxiella burnetii by PCR-RFLP and sequence analysis*. Microbiol Immunol. 48, 971-5.
3. Anonim, (2008). *Q fever*. Erişim adresi: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_Q-FEVER.pdf
4. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A., Frangoulidis D, Bodier C, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G, (2006). *Molecular characterization of Coxiella burnetii isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing*. BMC Microbiol. 6, 38.
5. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Roussette E, Rodolakis A, (2005). *Effect of vaccination with phase I and phase II Coxiella burnetii vaccines in pregnant goats*. Vaccine, 23, 4392-4402.
6. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A, (2005). *Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?* Vet Res. 3, 327-349.
7. Aydın N, İzgür M, Diker KS, (2006). *Q Fever*. Aydın N, Paracıkoğlu J. eds. Veteriner Mikrobiyoloji. İlke-Emek Yayınları, Ankara.p. 219-221.
8. Barlow J, Rauch B, Welcome F, Kim SG, Dubovi E, Schukken Y, (2008). *Association between Coxiella burnetii shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle*. Vet Res. 39, 23-27.
9. Brennan RE, Russell K, Zhang G, and Samuel JE, (2004). *Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I Coxiella burnetii infections*. Infect Immun. 72, 6666- 6675.
10. Bruin A, de Groot A, de Heer L, Bok J, Wielinga PR, Hamans M, van Rotterdam BJ, Janse I, (2011). *Detection of Coxiella burnetii in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in The Netherlands*. Appl Environ Microbiol. 77, 6516-23.
11. Cantas H, Muwonge A, Sareyyupoglu B, Yardimci H, Skjerve E. (2011). *Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus*, BMC Vet Res. 17,7:13.
12. Chen C, Dow C, Wang P, (2011). *Identification of CD4+ T cell epitopes in C.burnetii antigens targeted by antibody responses*. Plos One. 6, e17712.
13. Chmielewski, T, Sidi-Boumedine K, Duquesne V, Podsiadly E, Thiéry R, Tylewska-Wierzbanowska S, (2009). *Molecular epidemiology of Q fever in Poland*. Pol J Microbiol. 58, 9-13.
14. Coleman SA, Fischer ER, Mead DJ, Heinzen RA, (2004). *Temporal analysis of Coxiella burnetii morphological differentiation*. J Bacteriol. 186, 7344-7352.
15. Dehkordi FS, (2011). *Prevalence Study of Coxiella burnetii in aborted ovine and caprine fetusus by evaluation of*

- nested and real time PCR assays. Am J Anim Vet Sci. 6, 180-186.
16. **Derrick EH**, (1937). *Q fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation*. Med J Aust. 2, 281-299.
 17. **Dilbeck P. M. and McElwain TF**, (1994). *Immunohistochemical detection of Coxiella burnetii in formalin-fixed placenta*. J Vet Diag Invest. 6,125-127.
 18. **ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)** (2010). *Panel with Representatives from the Netherlands, France, Germany, United Kingdom, United States of America. Risk assessment on Q fever*. ECDC Technical Report, 40 pp. doi:10.2900/28860.
 19. **Edingloh M, Merck CC, Manz E.** (1999). *Multiplex PCR for the diagnostic detection of Coxiella burnetii in cow's milk*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 112, 5-9.
 20. **EFSA (European Food Safety Authority)** (2010). *Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). Scientific Opinion on Q Fever*. EFSA Journal, 8,1595, 114. doi:10.2903/j.efs.2010.1595.
 21. **Fenollar F, Fournier PE, and Raoult D**, (2004). *Molecular detection of Coxiella burnetii in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection*. J Clin Microbiol. 42, 4919-4924.
 22. **Fournier PE, Marrie TJ, and Raoult D**, (1998). *Diagnosis of Q fever*. J Clin Microbiol. 36, 1823-1834.
 23. **Fournier PE and Raoult D**, (2003). *Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever*. J Clin Microbiol. 41, 5094-5098.
 24. **Frangoulidis D, Rodolakis A, Heiser V, Landt O, Spletstoesser W, and Meyer H**, (2009). *DNA microarray-chip based diagnosis of Q-fever (Coxiella burnetii)*. Clin Microbiol Infect. 15, 165-166.
 25. **Gami AS, Antonios VS, Thompson RL, Chaliki HP, Ammash NM**, (2004). *Q fever endocarditis in the United States*. Mayo Clin Proc. 79, 253-257.
 26. **Gimenez DF**, (1964). *Staining rickettsiae in yolk-sac cultures*. Stain Technol. 39, 135-140.
 27. **Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie T, Raoult D**, (2005). *Coxiella burnetii genotyping*. Emerg Infect Dis. 11, 1211-1217.
 28. **Guatteo R, Beaudou F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, and Seegers H**, (2006). *Shedding routes of Coxiella burnetii in dairy cows: implications for detection and control*. Vet Res. 37, 827-833.
 29. **Guatteo R, Beaudou F, Ledoux D, Le Drean E, and Seegers H**, (2007). *Risk of false-negative results when delaying PCR from sampling for Coxiella burnetii detection in dairy cows*. Rev Med Vet. 158, 641-644.
 30. **Hartzell JD, Wood-Morris RN, Martinez LJ, Trotta RF**, (2008). *Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment*. Mayo Clin Proc. 83, 574-579.
 31. **Heinzen R, Stiegler GL, Whiting LL, Schmitt SA, Mallavia LP, Frazier ME**, (1990). *Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate Coxiella burnetii strains*. Ann NY Acad Sci. 590, 504-513.
 32. **Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP**, (1991). *Differentiation of Coxiella burnetii isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE*. J Gen Microbiol. 137, 269-276.
 33. **Hill J and Samuel JE**, (2011). *Coxiella burnetii acid phosphatase inhibits the release of reactive oxygen intermediates in polymorphonuclear leukocytes*. Infect Immun. 79, 414-420.
 34. **Hou MY, Hung MN, Lin PS**, (2011). *Use of a single-tube nested real-time PCR assay to facilitate the early diagnosis of acute Q fever*. Japanese J Infect Dis. 64, 161-162.
 35. **Ibrahim A, Norlander L, Macellaro A, Sjöstedt A**, (1997). *Specific detection of Coxiella burnetii through partial amplification of 23S rDNA*. Eur J Epidemiol. 13, 329-34.
 36. **Kırkan Ş, Kaya O, Tekbıyık S, Parin U**, (2008). *Detection of Coxiella burnetii in cattle by PCR*. Turk J Vet Anm Sci 32, 215-220.
 37. **Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM**, (2009). *Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands*. Emerg Infect Dis. 15, 613-614.
 38. **Kramer M, Obermajer N, Matijasic BB, Rogelj, Kmetec V**, (2009). *Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilized products by real-time PCR and by flow cytometry*. Appl Microbiol Biotech. 84, 1137-1147.
 39. **Lorenz H, Jäger C, Willems H, Baljer G**, (1998). *PCR detection of Coxiella burnetii from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix*. Appl Environ Microbiol. 64, 4234-4237.
 40. **Mo. YY, Cianciotto NP, Mallavia LP**, (1995). *Molecular cloning of a Coxiella burnetii gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue*. Microbiol. 141, 2861-2871.
 41. **Nourollahi Fard SR, Khalili M**, (2011). *PCR-Detection of Coxiella burnetii in ticks collected from sheep and goats in southeast Iran*. Iran J Arthropod-Borne Dis. 5, 1-6.
 42. **Omsland A, Cockrell DC, Howe D**, (2009). *Host cell-free growth of the Q fever bacterium Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106, 4430-4434.
 43. **Porter RS, Czaplicki G, Mainil J, Guatt'eo R, Saegerman C**, (2011). *Q Fever: Current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis*. Int J Microbiol. 248418, 1-22.
 44. **Redd T, Thompson HA**, (1995). *Secretion of proteins by Coxiella burnetii*. Microbiol. 141, 363-369.
 45. **Reichel R, Mearns R, Brunton L, Jones R, Horigan M, Vipond R, Vincent G, Evans S**, (2012). *Description of a Coxiella burnetii abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results*. Res Vet Sci. 93, 1217-1224
 46. **Rousset E, Duquesne V, Russo P, Thi'ery R**, (2007). *Fièvre Q: probl'ematiques et risques sanitaires*. Bull Acad Vet France. 160,107-114.
 47. **Rousset E, Durand B, Berri M**, (2007). *Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds*. Vet Microbiol. 124, 286-297.

48. **Samuel JE**, (2000). *Developmental cycle of Coxiella burnetii in Prokaryotic Development*, Y. V. Brun and L. J. Shimkets, Eds., ASM Press, Washington, DC, USA, p. 427-440.
49. **Schneebereger PM, Hermans MHA, van Hannen EJ, Schellekens JJA, Leenders ACA, Wever PC**, (2010). *Real-Time PCR with serum samples is dispensable for early diagnosis of acute Q fever*. *Clin Vac Immunol.* 2, 286-290.
50. **Shannon JG, Cockrell DC, Takahashi K, Stahl GL, and Heinzen RA**, (2009). *Antibody-mediated immunity to the obligate intracellular bacterial pathogen Coxiella burnetii is Fc receptor- and complement-independent*. *BMC Immunol.* 10, 26-36.
51. **Van den Brom R, van Engelen E, Vos J, Lutikholt SJM Moll L, Roest HIJ, van der Heijden HMJF, Vellema P**, (2013). *Detection of Coxiella burnetii in the bulk tank milk from a farm with vaccinated goats, by using specific PCR technique*. *Small Rumin Res.* 110, 150-154.
52. **Vigil A, Ortega R, Nakajima-Sasaki R**, (2010). *Genome-wide profiling of humoral immune response to Coxiella burnetii infection by protein microarray*. *Proteomics.* 10, 2259-2269.
53. **Willems H, Thiele D, Frölich-Ritter R, Krauss H**, (1994). *Detection of Coxiella burnetii in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR)*. *Zentralbl Veterinarmed B.* 41, 580-587.
54. **Willems H, Thiele D, Krauss H**. (1993). *Plasmid based differentiation and detection of Coxiella burnetii in clinical samples*. *Eur J Epidemiol.* 9, 411-418.
55. **Zhang GQ, Hotta A, Mizutani M**, (1998). *Direct identification of Coxiella burnetii plasmids in human sera by nested PCR*. *J Clin Microbiol.* 36, 2210-2213.