

İç Anadolu Bölgesinde *Francisella tularensis* alt tür *halorctica*'ya Bağlı Su Kaynaklı Bir Tularemi Salgını

A Water-Borne Tularemia Outbreak Caused by *Francisella tularensis* subspecies *halorctica* in Central Anatolia Region

Ayşegül ULU KILIÇ¹, Selçuk KILIÇ², İrfan ŞENCAN¹, Gönül ÇİÇEK ŞENTÜRK¹, Yunus GÜRBÜZ¹, Emin Ediz TÜTÜNCÜ¹, Bekir ÇELEBİ², Özlem KICIMAN³, Önder ERGÖNÜL⁴

¹ SB Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

¹ Ministry of Health Diskapi Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinics, Ankara, Turkey.

² Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ulusal Tularemi Referans Tanı Laboratuvarı, Ankara.

² Refik Saydam National Public Health Agency, Department of Communicable Diseases Research, National Tularemia Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

³ Çankırı İl Sağlık Müdürlüğü, Bulaşıcı Hastalıklar Şubesi, Çankırı.

³ Cankiri Local Health Authority, Infectious Diseases Branch, Cankiri, Turkey.

⁴ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Marmara University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 13.12.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 21.01.2010

ÖZET

Bu çalışmada, 18 Kasım 2009-24 Aralık 2009 tarihleri arasında Çankırı ili, Çerkeş ilçesi, Kadıözü köyünde meydana gelen su kaynaklı tularemi salgını araştırılmıştır. 18 Kasım 2009 tarihinde aynı köyden gelen iki hastaya orofarengal tularemi tanısı konulmasının ardından, o bölgede hastaların klinik özelliklerini ve risk faktörlerini belirlemek amacıyla aktif sörveyans çalışması yapılmıştır. Saha taramasında hastalar muayene edilmiş, olgulardan ve salgının kaynağı olabileceği düşünülen su kaynaklarından örnekler alınmıştır. Orofarengal, glandüler ve pnömonik formda olan olgulardan alınan boğaz sürüntüsü, lenf nodu aspiratları ile salgın bölgesindeki su kaynaklarından alınan örneklerde, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleriyle *Francisella tularensis* varlığı araştırılmıştır. Tüm köy halkından alınan serum örneklerinde mikroaglütinasyon testi (MAT) ile *F.tularensis* antikorları taranmıştır. Klinik ve laboratuvar sonuçlarına dayanarak, 11'i orofarengal, üçü glandüler ve biri pnömonik formda olmak üzere toplam 15 hastaya tularemi tanısı konulmuştur. Hastaların yaşları 6-75 yıl arasında değişmekte olup (ortalama yaş:

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Ayşegül Ulu Kılıç, SB Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara. **Tel (Phone):** +90 312 596 2793, **E-posta (E-mail):** draysegululu@yahoo.co.uk

52.5 yıl), 31 (%54.7)'i kadındır. Tularemi olgularının MAT titrelerinin 1/160-1/5120 arasında değiştiği gözlenmiştir. Beş hastadan alınan klinik örneklerin ikisinde (bir boğaz sürüntüsü ve bir lenf nodu aspiratı olmak üzere) etken üretilmiştir. PCR ile bir boğaz sürüntüsü ve dört lenf nodu aspiratında *F.tularensis* DNA'sı gösterilmiştir. Köylülerin ortak kullandığı kaynak suyu örneğinde PCR ile *F.tularensis* saptanmıştır. İki olgudan alınan lenf nodu aspiratının birisi direkt floresan antikor yöntemiyle pozitif olarak bulunmuştur. Etken, konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle *F.tularensis* alt tür *holarctica* olarak tanımlanmıştır. Hastalar aminoglikozid (streptomisin, gentamisin ve amikasin) ve kinolon (siprofloksasin veya levofloksasin) ile tedavi edilmiş, ancak beş olguda tedavide gecikmeye bağlı olarak tedavi başarısızlığı saptanmıştır. Tularemi olgularının ve kontrollerinin özellikleri ve risk faktörleri karşılaştırıldığında; yaş ve evde kemirgen atığı ile temas istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.001$ ve $p= 0.002$). Kaynak sularının toplandığı deponun temizlenmesi ve suların klorlanması ile salgın kontrol altına alınmıştır. Tularemi, ülkemizde endemik olmayan bölgelere yayılmakta ve halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Tularemi; *Francisella tularensis* alt tür *holarctica*; salgın; kültür; PCR; DFA; Türkiye.

ABSTRACT

In this study, we investigated a waterborne tularemia outbreak occurred in Kadiozu, a village of Cerkese county of Cankiri province (located in North-west part of central Anatolia, Turkey) between 18 November 2009-24 December 2009. Active surveillance was conducted to determine clinical characteristics and risk factors of cases after two patients from the same village had been diagnosed as oropharyngeal tularemia. All villagers were examined, and clinical specimens from cases and water samples which may be the source of outbreak in the field investigations were taken. Cases were in the form of oropharyngeal, glandular and pneumonic. Polymerase chain reaction (PCR) and cultures were conducted from lymph node aspirates, throat swabs taken from cases and samples from water sources of epidemic zone. All serum samples taken from the villagers were screened for *F.tularensis* antibodies with microagglutination test (MAT). Oropharyngeal tularemia was diagnosed in 11 patients, glandular form in 3 patients and pneumonic form in one patient according to clinical and laboratory results. Age of the patients ranged between 6-75 years old (mean age: 52.5 years) and thirty one of them (54.7%) were female. MAT titers ranged between 1/160 and 1/5120 in cases of tularemia. Causative agent was grown in the cultures of two patients (including a throat swab and a lymph node aspirate). *F.tularensis* DNA was shown by PCR in a throat swab and four lymph node aspirates. *F.tularensis* was also detected by PCR in the water sample obtained from one of the spring water commonly used by villagers. Only one of the lymph node samples obtained from two different patients, was positive by direct fluorescent antibody method. Causative agent was defined as *F.tularensis* subsp. *holarctica* by conventional and also molecular methods. Patients were treated with aminoglycoside (streptomycin, gentamicin, amikacin) or quinolone (ciprofloxacin, levofloxacin) antibiotics. Treatment failure was observed in five patients, due to the delay in initiating treatment. Comparison of characteristics and risk factors for tularemia cases versus controls yielded age and contact with rodent excreta at home as potential risk factors ($p= 0.001$ and 0.002 , respectively). The epidemic was controlled after cleaning the tank collecting spring water and chlorination of the water. Tularemia which is an emerging disease in Turkey is spreading to non-endemic regions and represent a significant threat for public health.

Key words: Tularemia; *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*; outbreak; culture; PCR; DFA; Turkey.

GİRİŞ

Tularemi, gram-negatif bir bakteri olan *Francisella tularensis*'in etken olduğu zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır¹. Hastalık insanlara, enfekte hayvanlarla doğrudan temas, ke-ne ve sinek gibi vektörler aracılığıyla, kontamine sularla ve enfekte aerosollerin solunma-

ıyla bulaşmaktadır. *F.tularensis*'in, virülans farklılıkları ve coğrafi dağılımlarına göre; *tularensis*, *holarctica*, *novicida* ve *mediasiatica* olmak üzere dört alt türü mevcuttur. *F.tularensis* alt tür *tularensis* (tip A) ve alt tür *holarctica* (tip B) klinik ve epidemiyolojik açıdan en önemli alt türlerdir². Daha virülen olan tip A, kene gibi vektörlerle ve enfekte hayvanlarla bulaşır ve hemen sadece Kuzey Amerika'da görülür. Tip B ise Kuzey yarımküre boyunca hakim olan ve hafif-orta şiddette enfeksiyona neden olan türdür. *F.tularensis* alt tür *holarctica* bulaşında misk sıçanı, kunduz gibi suyla yaşamsal ilişkisi olan çok sayıda vektör hayvan tanımlanmıştır²⁻⁵.

F.tularensis alt tür *holarctica* Türkiye'de salgınlara neden olan türdür. Kontamine kaynak sularının kullanılması ile ilişkili salgınlar Marmara, Batı Karadeniz ve Trakya bölgelerinden bildirilmiştir⁵⁻¹⁰. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Çankırı ilinden 2005-2008 yılları arasında toplam yedi tularemi olgusu tanımlanmıştır. Bu makalede, daha önce az sayıda sporadik olguların görüldüğü Çankırı ilinde, 18 Kasım 2009-24 Aralık 2009 tarihleri arasında Çerkeş ilçesine bağlı Kadıözü köyünde meydana gelen su kaynaklı tularemi salgını sunulmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İndeks Olgular

Yüksek ateş, boğaz ağrısı ve boyunda şişlik yakınmaları olan, beta-laktam antibiyotik tedavisi ile şikayetleri gerilemeyen iki olgu 18 Kasım 2009 tarihinde SB Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvurdu. Fizik muayenelerinde eksüdatif tonsillit ve servikal zincirde fluktuasyon vermeyen, sert, palpasyonla ağrılı lenfadenopati (LAP) dışında patolojik bir bulgu saptanamayan hastalardan alınan boğaz kültürlerinde normal flora bakterileri üredi. Epstein-Barr virus, sitomegalovirus ve *Toxoplasma gondii*'ye özgül IgM antikorları ile ASO sonucunun negatif olarak bulunması üzerine, orofarengeal tularemi ön tanısıyla serolojik inceleme yapıldı. Serum örneklerinde *F.tularensis* antijeni kullanılarak yapılan mikroaglutinasyon testi (MAT)'nin pozitif (1/640 ve 1/1280) bulunmasıyla klinik tanı doğrulandı.

Salgın İncelemesi ve Olgu Tanımı

İndeks olgulara orofarengeal tularemi tanısı konulduktan sonra aynı köyde benzer semptomlara sahip hastaların bulunduğu öğrenilmesi üzerine İl Sağlık Müdürlüğü ile temasa geçilerek bir saha taraması planlandı ve elde edilen bilgilere dayanarak olgu tanımı yapıldı. Olası olgu; "salgın bölgesinde oturan, beta-laktam veya makrolid grubu antibiyotiklere yanıt vermeyen akut tonsillofarenjit ve/veya servikal LAP varlığı ya da ciltte ülseratif lezyon varlığı ve/veya LAP saptanması" olarak tanımlandı. Olası olgu kriterlerine uyan bir hasta; (a) uygun klinik örneklerden *F. tularensis* izolasyonu ve/veya; (b) tek serum örneğinde yüksek titrede antikor varlığı ($\geq 1/160$) veya en az 10 gün arayla tekrarlanan serolojik incelemede antikor titresinde ≥ 4 kat artış; (c) klinik örneklerde PCR pozitifliği gibi laboratuvar bulgularından en az birinin varlığı durumunda "kesin olgu" olarak kabul edildi.

İl Sağlık Müdürlüğü, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği ve Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı tarafından bir ekip oluşturularak söz konusu köye gidildi. İlk olarak salgını doğrulayabilmek amacıyla boğaz ağrısı, ateş ve/veya boyunda şişlik semptomları ile başvuran ve akut tonsillofarenjit tanısı alan olguların belirlenmesi için aile hekimi ve hastane kayıtları incelendi. İlk olarak indeks olguların yaşadığı evlere gidilerek hastalar ziyaret edildi ve su şebekesinden su örneği, hasta yakınlarından serum örnekleri alındı. Bütün köy halkı ziyaret edilerek şüpheli olgular tularemi açısından tarandı ve serum örnekleri alındı. Tularemi şüpheli olguların demografik özellikleri, epidemiyolojik (içme-kullanma suyu kaynakları, klorlanmamış kaynak suyu tüketimi, durgun sulara yüzme, çevreden yiyecek toplama, hayvan besleme, av hayvanları ve/veya kemirici teması, doğada uğraş ve seyahat öyküsü vb. gibi risk faktörleri), klinik, laboratuvar ve uygulanan tedavi bilgileri "tularemi olgu formu"na kaydedildi. Kliniği tularemi ile uyumlu olan olgulardan kan örneği, uygun olan beş olgudan ise boğaz sürüntüsü ve lenf nodu aspirasyon materyalleri alındı.

Çevresel İnceleme

İndeks olguların orofarengeal formda olması nedeniyle, salgın incelemesi su kaynaklı geçiş üzerinde yoğunlaştırıldı. Şebeke suyu olarak kaynak suyunun kullanıldığı ve şebekeye verilmeden önce bir depoda toplandığı öğrenildi. Köyün su ve kanalizasyon altyapısı incelendi ve ana su deposuna giriş bölümü, su deposundan, şebekeden, köy çeşmesinden, hasta evlerinden ve kaynak sularından (her bir noktadan 500-1000 ml) bakteriyolojik ve kimyasal inceleme için toplam 10 su örneği alındı ve klor incelemeleri yapıldı. Alınan su örnekleri, mikrobiyolojik (koliform basil) ve *F.tularensis* incelemesi için Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığına gönderildi. Su örneklerinde *Escherichia coli* ve diğer koliform bakterilerin mikrobiyolojik analizi "Part-1 membran filtrasyon" yöntemiyle (TS EN ISO 9308-1) yapıldı. Evler ve bahçeler, su deposu, kaynak suları ve diğer durgun su kaynakları, kemirgen karkasları veya çıkartıları varlığı açısından gözden geçirildi. Evlerdeki kilerlerde ya da ev dışında bulunan kemirici dışkıları mikrobiyolojik inceleme amacıyla toplandı.

Salgın Kontrol Önlemleri

Köyün kaynak suyu tarafından beslenen su deposu boşaltılıp, klorlu su ile yıkandıktan sonra süperklorizasyon işlemi uygulandı. Ana su deposuna hayvan temasını önlemek amacıyla fiziksel bariyer yapısının güçlendirilmesi ve su şebekesinin tamiri için rapor yazıldı. Suyun şebekeye verilmeden önce İl Sağlık Müdürlüğü personeli tarafından düzenli aralıklarla klorlanması sağlandı. Salgın bölgesinde yaşayan halk ve sağlık çalışanları tularemi hastalığı hakkında bilgilendirildi. Köy halkına, başka kaynaklardan su temin edilmemesi, eğer kaynak-pınar suları kullanılacak ise, kaynatılarak tüketilmesi veya bireysel klorlama işlemi yapılması önerildi ve klor tabletleri dağıtıldı.

Rutin Laboratuvar Testleri

Tularemi şüpheli olgular ve aile üyelerinden kan örnekleri alındı. Kliniği tularemi ile uyumlu olan olgulardan başvuru ve takiplerinde alınan kan örneklerinde; tam kan sayımı,

eritrosit sedimentasyon hızı ve C-reaktif protein düzeyleri ölçüldü. Tularemi şüpheli olgulardan uygun olanlardan boğaz sürüntüsü ve lenf nodu aspirasyon materyalleri alındı. Klinik olarak tularemi düşünülen bu hastalara ait kan ve doku örnekleri *F.tularensis* kültürü, MAT, direkt floresan antikor (DFA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri için Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Tularemi Referans Merkezine gönderildi.

Serolojik İnceleme

F.tularensis'e özgül aglütininler, *F.tularensis* LVC (NCTC 10857) suşundan hazırlanmış antijenin kullanıldığı MAT ile araştırıldı. Bu yöntemde, U-tabanlı mikrotitrasyon plaklarında hasta serumlarının 1/5-1/2560 sulandırılmaları hazırlandı ve üzerine eşit hacimde antijen eklenerek 1/10-1/5120 son dilüsyonlar elde edildi. Nemli ortamda, oda ısısında 18-20 saatlik inkübasyondan sonra çukurlardaki aglütinasyon değerlendirildi. Standart olgu tanımına uygun olarak MAT'da $\geq 1/160$ titreler pozitif olarak kabul edildi⁵. Ayrıca, *F.tularensis* ve *Brucella* spp. ile çapraz reaksiyon varlığını saptayabilmek amacıyla tüm serum örneklerinde *Brucella* tüp aglütinasyon testi çalışıldı.

Direkt Floresan Antikor Testi (DFA)

Lenf nodu aspiratlarında *F.tularensis* antijenlerinin saptanması ve şüpheli izolatların doğrulanması amacıyla DFA yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde; lenf aspiratlarının ve bakterisi süspansiyonlarının lama yayılmasıyla hazırlanan preparatlar ısı ile fikse edildi. DFA lamları floresan izotiyosiyanat ile konjuge anti-*Francisella* serum (BulBio-NCIPD, Sofia, Bulgaria) ile kaplanarak nemli ortamda, oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Preparatlar iki kez fosfatlı tampon (PBS) ile yıkandıktan sonra, üzerlerine gliserol damlatılarak floresan mikroskopunda (Leica DFC290, Almanya) değerlendirildi.

Çevresel Örneklerde Kültür ve PCR

Klinik olarak tularemi ile uyumlu olgulardan alınan boğaz sürüntüsü ve lenf aspiratları ile su örneklerinden kültür yapıldı. Klinik örnekler hem kanlı agar ve EMB besiyerine hem de *F.tularensis* için seçici besiyerine (glukozlu-sisteinli kanlı agar; GCBA) ekildi. Boğaz sürüntü örnekleri, normal flora bakterilerinin baskılanması amacıyla antibiyotik (100.000 U/L penisilin veya *H.pylori* selective supplement, Oxoid SR0147) içeren seçici GCBA besiyerine ekildi. Su örnekleri (500-1000 mL) 0.45 µm çapındaki filtrelerden geçirildi ve filtre kağıtları seçici besiyeri (*H.pylori* selective supplement Oxoid SR0147 içeren GCBA) yüzeyine yerleştirildi. Plaklar, %5 CO₂'li ortamda 37°C'de 7-12 gün inkübe edilerek, kültürler üreme açısından günlük olarak kontrol edildi. GCBA'da şüpheli kolonilerin doğrulanması amacıyla Gram boyama, biyokimyasal testler (oksidaz, katalaz ve gliserol fermentasyonu), DFA ve PCR yöntemi kullanıldı.

Olası olgulardan alınan klinik örnekler ile köydeki su deposundan ve kaynak sularından alınan çevresel örnekler *F.tularensis* varlığı açısından konvansiyonel PCR ile araştırıldı. Klinik ve çevresel örneklerden bakteri DNA'sı, QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak saflaştırıldı. Lenf nodu aspiratları ve boğaz sürüntü örnekleri, 2 ml PBS içerisinde oda ısısında üç saat inkübe edildikten sonra saflaştırma işlemi yapıldı. Evlerin yakınından ve kilerlerden toplanan kemirici dışkılarından DNA saflaştırılması "QIAamp

DNA Stool Mini Kit" (Qiagen, Almanya) ile yapıldı. *F.tularensis*'in tür düzeyinde tanımlanması ve alt türlerin tayinine yönelik olmak üzere iki aşamalı PCR yöntemi kullanıldı. İlk aşamada, klinik örneklerden direkt olarak genetik materyalin saptanması ve izolatların doğrulanması amacıyla 17 kDa membran proteinini kodlayan *tul4* geni araştırıldı¹¹. Pozitif örneklerde, *F.tularensis* alt türlerinin ayırımı için de "Farklılık Bölgeleri 1 (Regions of Difference; RD1)"i hedef gen dizileri amplifiye edildi¹².

İstatistiksel Analiz

Veriler, STATA version 11 (ABD) istatistik programı ile analiz edildi. Kategorik değişkenlerin istatistiksel anlamlılığı ki-kare testi, sürekli değişkenlerin anlamlılığı ise t-testi ile araştırıldı. Anlamlılık, $p < 0.05$ olarak tanımlandı. Çok değişkenli analizde; 40 yaş üzeri, çevreden yiyecek toplama, kemirici atığı ve/veya kemirici ile temas ve kaynak suyu kullanmak regresyon modeline dahil edildi.

BULGULAR

Çalışmaya katılan toplam 53 olgunun yaş ortalaması 52.5 (yaş aralığı: 6-75) yıl olup, 31 (%57.4)'i kadındır. Yirmi olgu seropozitif olarak saptanmış ve enfeksiyon atak hızı %37.7 olarak bulunmuştur. Seropozitif bulunan olguların beşinde asemptomatik klinik seyir gözlenmiştir. Semptomatik olguların yaş ortalaması 47 yıl olarak saptanmıştır. Klinik olarak, 11 hasta orofarengeal, üç hasta glandüler ve bir hasta pnömonik tularemi tanısı ile izlenmiştir. Dört hastada konjunktival tutulum, iki kadın hastada yaygın deri döküntüleri görülmüştür. Döküntüler daha çok ekstremitelerde ve eritema multiforme ve eritema nodosum tarzındadır. Hastalar aminoglikozid ve kinolon grubu antibiyotiklerle tedavi edilmiştir. Aminoglikozid kullanan dört hastada ve siprofloksasin kullanan bir hastada tedavi başarısızlığı görülmüştür (Tablo I).

Olguların laboratuvar bulguları Tablo II'de verilmiştir. Sadece pnömonik formda izlenen bir hastanın karaciğer fonksiyon testlerinde yükseklik saptanmıştır. Ultrasonografi ile servikalde daha fazla olmak üzere submandibuler ve parotis bölgesinde lenf nodu tutulumları tespit edilmiştir.

Köy içerisinde yapılan ev ziyaretlerinde, alınan serum örneklerinin 20'sinde tularemi antikorları 1/160-1/5120 arasında değişen titrelerde pozitif olarak saptanmıştır. Asemptomatik tularemi olgularında ise tularemi antikorları 1/160-1/1280 titrelerde pozitif bulunmuştur. Tularemi antikorları pozitif olan olguların sadece birinde 1/20 titrede *B. abortus* antijeni ile aglütinasyon saptanmıştır (Tablo II).

Beş olgudan alınan lenf aspiratı ve boğaz sürüntü örneklerinden yapılan *F.tularensis* kültürlerinin ikisinde (bir boğaz sürüntüsü ve bir lenf nodu aspiratı olmak üzere) etken üretilmiştir (izolasyon oranı: %20). Klinik örneklerden yapılan *F.tularensis* "in-house" PCR testi ile beş lenf nodu aspiratının 4 (%80)'ünde pozitiflik saptanırken, beş boğaz sürüntüsünün 1 (%20)'inde *F.tularensis* DNA'sı gösterilmiştir. *F.tularensis* kültürleri ve PCR pozitif örneklerde RD1 bölgesi kullanılarak yapılan PCR ile etkenin *F.tularensis* subsp. *holarctica* olduğu saptanmıştır (Resim 1). DFA testi ile çalışılan iki lenf nodu aspiratının 1 (%50)'ünde pozitiflik saptanmış (Resim 2), pozitif bulunan örneğin kültür ve PCR ile de pozitif olduğu gözlenmiştir (Tablo II).

Tablo 1. Olguların Demografik ve Klinik Özellikleri

Olgu no	Yaş/ cinsiyet	Klinik form	Konjunktivit	Döküntü	Tedavi ¹	Tedavide	
						Gecikme ²	Başarısızlık ³
1	6/K	OF	-	-	AMC 15 mg/kg/gün IM	-	-
2	12/E	OF	-	-	AMC 15 mg/kg/gün IM	-	-
3	14/E	OF	+	-	SM 1 g/gün IM	-	-
4	19/E	OF	-	-	SM 1 g/gün IM	-	+
5	34/K	OF	+	+	SM 1 g/gün IM	-	+
6*	34/K	OF	-	-	SM 1 g/gün IM	-	-
7	37/E	OF	+	-	SM 1 g/gün IM	-	-
8	45/E	OF	+	-	GM 5 mg/kg/gün IM	+	+
9	45/K	G	-	-	CPR 2 x 500 mg PO	-	-
10	47/K	OF	-	-	SM 1 g/gün IM	-	-
11	50/E	G	-	-	CPR 2 x 500 mg PO	+	+
12	53/K	OF	-	-	SM 1 g/gün IM	-	-
13*	55/K	OF	-	+	SM 1 g/gün IM	+	+
14	61/K	G	-	-	CPR 2 x 500 mg PO	-	-
15	68/E	P	-	-	LEV 2 x 500 mg IV	-	-

OF: Orofarengeal, G: Glandüler, P: Pnömonik, AMC: Amikasin, SM: Streptomisin, GM: Gentamisin, CPR: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin.
* İndeks olgular; ¹ Tedavi süresi 10-14 gündür; ² Semptomlarla tedavi arasında ≥ 3 hafta süre olması; ³ Lenf nodlarında cerrahi drenaj gerekliliği, relaps veya boyutlarında küçülme olmaması.

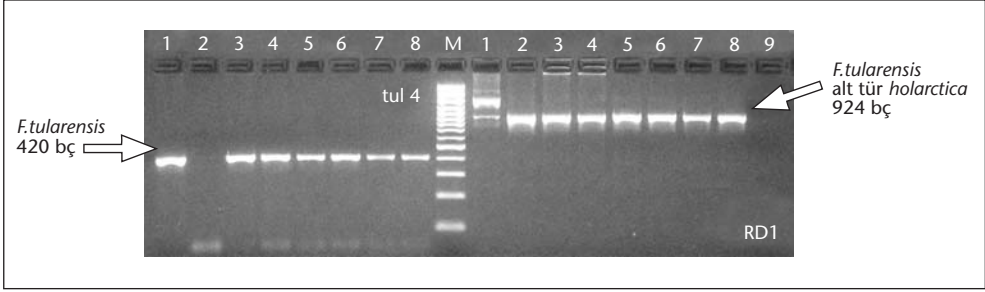
Salgın bölgesinin coğrafi özellikleri değerlendirildiğinde; Kadıözü köyünün, Çankırı iline 110 km ve Çerkeş ilçe merkezine 10 km uzaklıkta, hafif dağlık arazide, 33 haneli ve 152 nüfuslu bir yerleşim alanı olduğu belirlenmiştir. Köyün içme-kullanma suyu incelendiğinde; şebeke suyunun iki pınar suyundan geldiği, kaynağından çıktuktan sonra yaklaşık 2 km doğuda serbest ilerleyip daha sonra borularla iki depoda (70 m³ ve 50 m³) toplandığı gözlenmiştir. Şebeke borularının toprak yüzeyden 60 cm derinlikte olup, yer yer kırıklar olduğu ve yüzeyde açık olarak bulunduğu tespit edilmiştir.

Kadıözü köyünde tularemi tanısı alan olgular, köy merkezinde bulunan köy pınarı ile 70 m³lük köy deposunun suyunu kullandıklarını beyan etmişlerdir. Deponun oldukça eski olduğu ve çevresel faktörlerle kolayca kirlenmeye müsait ve içerisine kemiricilerin girmesine izin verecek boyutlarda deliklerin olduğu ve deponun uzun zamandır temizlenmediği, suyun klorlanmasının da düzenli olarak yapılmadığı öğrenilmiştir. Suyun biriktirildiği depodan ve şebekeden alınan su örneklerinin koliform basille kontamine olmadığı tespit edilmiştir. Alınan su örneklerinde *F.tularensis* üretilmemiştir, ancak köylüler tarafından sıklıkla kullanılan doğal kaynak sularının birinden alınan su örneğinde PCR ile

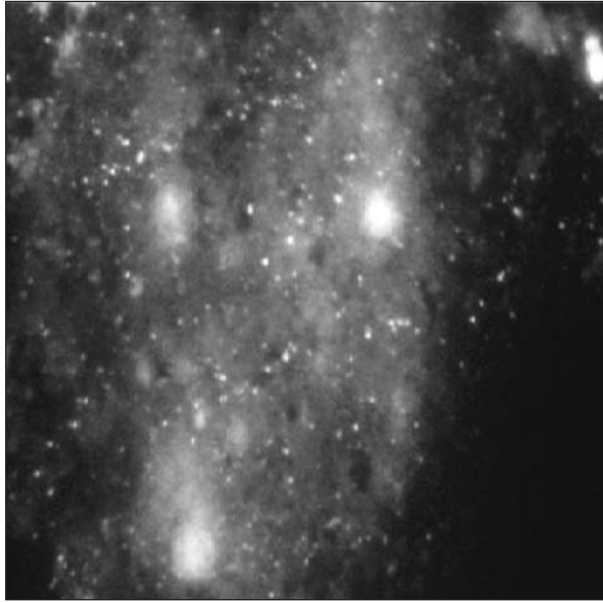
Tablo II. Tularemi Olgularının Laboratuvar Bulguları

Olgu no	Lökosit ↑	ESH ↑	CRP ↑	KCFT ↑	Brusella STA	Boyun USG	F.tularensis MAT	LA kültür	LA PCR	Boğaz kültürü	Boğaz sürüntüsü PCR	LA DFA
1	-	+	+	-	-	JD	1/2560					
2	-	-	-	-	-	Arka servikal	1/640					
3	-	-	-	-	+(1/20)	Juguler, parotis	1/2560					
4	+	+	+	-	-	JD	1/2560	-	+	+	+	
5	-	+	+	-	-	SM	1/1280	-	-	-	-	
6	-	+	+	-	-	SM, ön servikal	1/1280					
7	-	+	+	-	-	Arka servikal, juguler	1/2560	-	+	-	-	-
8	+	+	+	-	-	Juguler	1/5120	+	+	-	-	+
9	-	+	-	-	-	Ön servikal	1/160					
10	+	-	-	-	-	Servikal, JD	1/1280					
11	-	+	-	-	-	Ön servikal	1/160					
12	-	-	-	-	-	Juguler	1/1280					
13	+	+	+	-	-	Servikal	1/640	-	+	-	-	
14	-	-	-	-	-	SM	1/160					
15	-	+	+	+	-	-	1/1280					

ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP: C-reaktif protein, KCFT: Karaciğer fonksiyon testleri, STA: Standart tüp aglütinasyon, USG: Ultrasonografi, LA: Lenf aspirati, MAT: Mikroaglütinasyon testi, PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, DFA: Direkt floresan antikor, JD: Jugulodigastrik, SM: Submandibuler.



Resim 1. Klinik izolat ve örneklerden PCR sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü **A tul4:** 1. Pozitif kontrol (*F.tularensis*); 2. Negatif kontrol (ddH_2O); 3-8. Pozitif hasta örnekleri. **M:** Moleküler ağırlık standardı. **B RD1:** 1. Pozitif kontrol (*F.tularensis* alt tür *holarctica*); 2-3. Pozitif klinik izolatlar; 4-8. Pozitif hasta örnekleri; 9. Negatif kontrol (ddH_2O).



Resim 2. Lenf nodu aspiratının pozitif DFA görüntüsü.

F.tularensis DNA'sı saptanmıştır. Alınan gıda örnekleri ve evlerin etrafından toplanan hayvanların fekal örneklerinde PCR pozitifliği tespit edilmemiştir. Hastaların bulaş kaynağını sorgulayan anket sorularına verdikleri cevaplar incelendiğinde, hastaların tümünün içme suyu olarak şebeke suyunu kullandıkları öğrenilmiştir (Tablo III).

Tularemi olguları ve kontrollerinin özellikleri ve risk faktörlerinin karşılaştırılmasında, yaş ve kemirici atığı ile ev içinde temasın olması risk faktörü olarak tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0.001$ ve 0.002). Çok değişkenli analizde ise <40 yaş olması hastalığın anlamlı bir göstergesi olarak belirlenmiştir (Odds oranı: 5.7; GA 1.43-23.35; $p=0.014$).

Tablo III. Tularemi Olguları ve Kontrollerin Klinik Özellikleri ile Risk Faktörlerinin Karşılaştırılması

Risk faktörleri	Olgular (n= 15) (%)	Kontrol grubu (n= 38) (%)	p değeri
Yaş	38 ± 19	57 ± 15	0.012
Doğal kaynak suyu kullanma	15 (100)	36 (94.7)	0.365
Kemirici sayısında artış	11 (73)	25 (65.7)	0.596
Kemirici teması	5 (33.3)	14 (36.8)	0.810
Kemirici dışkıyla ile temas	10 (66.6)	9 (23.6)	0.002
Çevreden yiyecek toplama	11 (73.3)	26 (68.4)	0.728

TARTIŞMA

Dünyanın kuzey yarım küresinde görülen tularemi, ülkemizi de içeren coğrafyada daha ziyade orofarengeal formda görülmektedir^{1,3-5}. Son beş yıl içinde, Bulgaristan, Kosova ve Gürcistan ile eş zamanlı olarak Türkiye'nin farklı bölgelerinden tularemi salgınları bildirilmiştir¹³⁻¹⁵. Bu ülkelere benzer şekilde, ülkemizde Batı Karadeniz, Marmara ve Trakya bölgesinde meydana gelen salgınlar, kontamine doğal kaynak sularının kullanımı ile ilişkili bulunmuştur^{5-10,16-19}. İç Anadolu'da tularemi çok nadiren küçük salgınlar ve olgu raporları şeklinde bildirilmiştir. Çankırı ilinde daha önce salgın rapor edilmemiştir ancak komşu illerde hastalık endemik olarak görülmektedir^{5,9,19}. Özellikle tarım ve hayvancılıkla uğraşılan kırsal alanlarda, kemirici popülasyonunun varlığı nedeniyle tularemi görülme olasılığı yüksektir. Ayrıca, hastalığın kemiriciler ve vahşi tavşanlar aracılığıyla şehirler hatta ülkeler arasında yayılımı mümkündür⁵. Bu çalışmada dışkı ve idrar gibi kemirici atığı ile ev içinde temasın olması risk faktörü olarak saptanmıştır. Nitekim salgın incelemesi sırasında, kemirici sayısında artışın olduğu ve içme sularının klorlanmadığı köylüler tarafından belirtilmiştir. Benzer şekilde, Kosova'da yiyeceklerin kemirici atığı ile kontamine olması risk faktörü olarak tanımlanmıştır¹³.

Köyden şehire göçe bağlı olarak, köylüler arasında yaş ortalaması 50'nin üzerinde tespit edilmiştir. Kırk yaşın altında olmak, çalışmamızda hastalık için anlamlı bir gösterge olarak tespit edilmiştir. Bu durumun, genç nüfusun aktif olarak çalışması nedeniyle risk faktörlerine daha çok maruz kalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu sonuç ileri yaşlarda hastalığa duyarlılığın artmış olduğunu belirten çalışmalarla çelişmektedir^{10,13,20}.

Yiyecek ve su kaynaklı hastalıklar çoğunlukla bir ailede birden fazla kişiyi etkileyebilir. Kadıöz köyündeki 15 tularemi olgusundan dördünün aynı aileye mensup bireyler olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, daha önce ülkemizde aileleri etkileyen tularemi olguları bildirilmiştir^{5,18,21}.

Tulareminin pnömonik formu su kaynaklı salgınlarda beklenen bir klinik tablo değildir. Ateş, halsizlik, kuru öksürük şikayetleri olan pnömonik formda izlediğimiz bir olguda, ölü fare ve onun çıkartısı ile temas öyküsü mevcuttur. Akciğer muayenesinde dinlemekle bilateral bazal ralleri olan ve akciğer grafisi ve tomografisinde bilateral pnömonik

infiltrasyon ve buzlu cam manzaraları izlenen hastanın karaciğer enzimleri ve akut faz reaktanları yüksek bulunmuştur. Olgumuzda *F.tularensis*'e özgül serum antikor titrelerinin üç hafta içinde dört kattan fazla artmasıyla kesin tanı konulmuştur. Levofloksasin ile 14 gün tedavi sonrasında klinik bulguları ve akut faz reaktanlarında gerileme gözlenmiştir. *F.tularensis*'in özellikle Kuzey Amerika'da pnömoni tablosuyla seyrettiği bilinmektedir^{22,23}. Su kaynaklı salgınlarda ise olgular, sıklıkla orofarengeal formda karşımıza çıkmaktadır. Ancak enfeksiyonun vücuda giriş yerine bağlı olarak, farklı klinik formlarda olgular veya aynı olguda eş zamanlı birden çok form görülebilir²⁴. Tulareminin birçok formunda streptomisin ve gentamisin ilk tercih edilen antibiyotikler olmasına rağmen pnömoni gibi birçok tularemi olguları kinolonlarla başarılı olarak tedavi edilebilmektedir²⁵.

Tularemi hastalığının seyrinde olguların yaklaşık %43'ünde difüz makülopapüler veya vezikülopapüler erüpsiyon, püstül, eritema nodosum, eritema multiforme, akneiform lezyonlar veya ürtiker gibi deri döküntüleri gözlenmiştir. Genellikle hastalığın ilk iki haftası içinde ortaya çıkan ve 2-6 hafta kadar devam eden sekonder deri lezyonları, kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmektedir. Lezyonlar özgül tedavi ile tamamen geriler^{3,4,24}.

Tularemi hastalığının kesin tanısı, klinik örneklerden *F.tularensis*'in izole edilmesiyle konulmaktadır. Ancak *F.tularensis*, üreme için sülfidril bileşikler (sistein, sistin, tiyosülfat ve isoVitaleX) içeren zengin besiyerlerine gereksinim duyan bir bakteridir. Örneklerin erken dönemde alınması koşuluyla boğaz sürüntüsü ve/veya lenf nodu aspiratının kültürü orofarengeal tulareminin tanısında tercih edilen yöntemdir. Bununla birlikte klinik ve çevresel örneklerden, zenginleştirilmiş besiyerlerinin kullanılmasına rağmen izolasyon oranları düşüktür. Amerika Birleşik Devletleri'nde Evans ve arkadaşları²⁶, olguların ancak %5.5'inde *F.tularensis*'i izole etmişlerdir. Ülkemizde Helvacı ve arkadaşları⁸, 1988-1998 yılları arasında saptamış oldukları 205 hastaya ait seride izolasyon oranını %4.9 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, klinik örneklerin %20'sinden *F.tularensis* izole edildiği halde su örneklerinden yapılan kültürlerin hiçbirinde etken üretilenmemiştir.

F.tularensis'in üreme için zengin besiyerlerine gereksinim duyması, kültür işlemlerinin yüksek güvenilirlikli laboratuvar ve deneyimli personel gerektirmesi gibi nedenlerle, tularemi tanısı genellikle klinik tablo ve serolojik yöntemlerle konulmaktadır^{2,4,5}. Etkenin özgül antikorlar genellikle aglütinasyon ve/veya ELISA yöntemiyle saptanabilir. Ancak hastalığın erken döneminde antikor yanıtının saptanamaması (genellikle 10-21 gün sonra saptanabilir düzeylere ulaşır) ve bazı olgularda serolojik yanıtın gelişmemesi nedeniyle, günümüzde etkeni saatler içinde saptayan PCR ön plana çıkmıştır^{4,5}. Bu çalışmada, olguların daha önceden akut tonsillit tanısı ile özgül olmayan tedavi alması, tularemi tanısının geç konulmasına neden olmuş ve olgulardan ilk alınan serum örneklerinde tularemi antikor pozitifliğinin saptanması ile hastalığın kesin tanısı konulmuştur. On beş tularemi olgusunun, klinik olarak uygun olan beşinden lenf nodu aspiratı ve boğaz sürüntü örnekleri alınmıştır. Sadece iki örnekte bakteri izole edilmiş, hastaların %80'inde lenf nodu aspiratında, %20'sinde ise boğaz sürüntüsünde PCR ile etkenin genetik materyali saptanmıştır. Laboratuvar yöntemlerinin etkinliği değerlendirildiğinde; en yüksek pozitiflik oranı PCR (%50) yöntemiyle saptanmış iken, kültürle %20 oranında pozitiflik elde edilmiştir.

Çalışmamızda, biyopsi ve lenf aspiratı gibi klinik örneklerde etkenin direkt olarak gösterilmesi ve izole edilen suşların doğrulanmasında DFA yöntemi kullanılmıştır. Alınan iki lenf nodu aspiratlarından 1 (%50)'i DFA ile pozitif olarak bulunmuştur (Tablo II). Bu İki örneğin PCR ile pozitif bulunmasına karşın sadece bir örnekte DFA pozitifliğinin saptanması, DFA yönteminin moleküler yöntemlere göre orta derecede duyarlılığa (10^6 bakteri/ml) sahip olduğu yönündeki görüşleri desteklemektedir.

F.tularensis, oldukça patojen bir bakteri olup, çok düşük sayıda (10-15 cfu) bakterinin alınması hastalığa neden olabilmektedir^{2,4}. Oral yolla enfektif dozun daha yüksek olmasına karşın, *F.tularensis* ile kontamine olan su kaynakları salgınlara yol açabilir¹. Ancak rezervuar ile temas sonucunda sudaki kirlenmenin anlık olması ve kırsal bölgedeki su depolarının küçük hacimli olması nedeniyle sirkülasyonun fazla olmasına bağlı olarak bakterinin su içerisinde yüksek oranda seyrelmiş olması ve örneklerin geç alınmasına (temas ile tanı arasındaki sürenin uzun olması ve olgular saptandıktan sonra çevresel örneklerin alınması) bağlı olarak sulardan çoğunlukla etken izole edilememektedir. Ek olarak su, toprak ve çamur gibi çevresel örneklerden *F.tularensis* izolasyonu için kültür işlemi henüz standardize edilememiştir^{1,2}. Su kaynaklı tularemi salgınlarında etkeni suda göstermek için; incelenecek su miktarının fazla olması (en az 1-5 L gibi) ve örnekte etkenin çoğaltılması amacıyla filtrasyon gibi tekniklerin kullanılması önem taşımaktadır^{1,2}. Ülkemizde su kaynaklı olduğu düşünülen çok sayıda salgınlar bildirilmesine rağmen, sulardan etken izole edilememiş ancak PCR gibi daha yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem ile etken gösterilebilmiştir⁵. Bu çalışmada, salgın bölgesindeki farklı su kaynaklarından alınan su örneklerinde üreme gözlenmemişken, PCR ile bir su örneğinde etkenin DNA'sı saptanmıştır. Bu bulgular, PCR'nin sadece insanda tularemi hastalığının tanısında vücut örneklerinde değil aynı zamanda çevresel örneklerde de faydalı olabileceğini göstermektedir.

İndeks olgumuzda tedaviden altı hafta sonra alınan lenf nodu aspiratında PCR pozitifliğinin devam ettiği görülmüştür. Bu bulgu, orofarengeal olgularda lenf nodlarında PCR pozitifliğinin uzun süre saptanabileceğini göstermektedir^{1,2,27}. Çalışmamızda, RD1 bölgesinin amplifikasyonu ile salgına neden olan suşun *F.tularensis* alt tür *holarctica* olduğu gösterilmiştir. Hem klinik örneklerdeki yüksek pozitiflik oranı hem de alt tür tayininin yapılabilmesi PCR yöntemin etkinliğini göstermektedir.

Takip edilen beş olguda, 1/160-1/1280 arasında seropozitiflik saptanmasına rağmen enfeksiyonun asemptomatik olması nedeniyle bu grupta tedavi uygulanmamıştır. Ülkemizde daha önce görülen salgınlarda asemptomatik olgular bildirilmiştir^{5,6,9}. Bir tularemi salgını süreci içinde tespit edilen yüksek antikor titreleri, epidemiyondan sonra düşmektedir. Buna ek olarak, daha az virülen olan alt tür *holarctica* enfeksiyonu daha hafif şiddette, tedavi gerektirmeyen, kendini sınırlayan bir hastalığa neden olabilir⁵. Olgularımızda relaps oranının düşük olması ve tedavi alan hastalarda fatalitenin görülmemesi, hafif-orta şiddette seyir gösteren *F.tularensis* alt tür *holarctica* enfeksiyonunun özelliklerini yansıtmaktadır.

Sonuç olarak, daha önce Çankırı'da çok az sayıda sporadik olgular görülmesine rağmen, salgın bildirim olmamıştır. Ülkemizde endemik olmayan bir bölgede, ateş ve LAP

bulguları ile başvuran hastalarda tularemi akla gelmeli ve kullanılan su kaynakları ve kemirici teması sorgulanmalıdır. Daha fazla risk faktörüne maruz kalan genç popülasyon ve kemirici atığı ile ev içinde teması olan kişiler tularemi enfeksiyonu için risk grubundadır. Tularemi, ülkemizde endemik olmayan bölgelere yayılmakta ve halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır.

TEŞEKKÜR

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığından Dr. Bio. Müge Taner ve Dr. Bio. Hül-ya Şimşek'e su örneklerindeki çalışmalarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Guidelines on Tularaemia. WHO/CDS/EPR/2007.7
2. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. Clin Microbiol Rev 2002; 15(4): 631-46.
3. Penn RL. *Francisella tularensis* (Tularemia), pp: 2674-85. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds), Principle and Practice of Infectious Diseases. 2005, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
4. Sjøstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann NY Acad Sci 2007; 1105: 1-29.
5. Kılıç S. *Francisella tularensis* ve Türkiye'de tularemi epidemiyolojisine genel bir bakış. FLORA 2010; 15(2): 37-58.
6. Gürcan S, Tatman-Otkun M, Otkun M, Arikan OK, Ozer B. An outbreak of tularemia in Western Black Sea region of Turkey. Yonsei Med J 2004; 45(1): 17-22.
7. Karadenizli A, Gurcan S, Kolayli F, Vahaboglu H. Outbreak of tularemia in Golcuk, Turkey in 2005: report of 5 cases and an overview of the literature from Turkey. Scand J Infect Dis 2005; 37(10): 712-6.
8. Helvacı S, Gedikoglu S, Akalin H, Oral HB. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. Eur J Epidemiol 2000; 16(3): 271-6.
9. Çelebi G, Baruönü F, Ayoğlu F, et al. Tularemia, a reemerging disease in Northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses. Jpn J Infect Dis 2006; 59(4): 229-34.
10. Wilke A, Meric M, Grunow R, et al. An outbreak of oropharyngeal tularaemia linked to natural spring water. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 1): 112-6.
11. Sjøstedt A, Kuoppa K, Johansson T, Sandström G. The 17 kDa lipoprotein and encoding gene of *Francisella tularensis* LVS are conserved in strains of *Francisella tularensis*. Microb Pathog 1992; 13(3): 243-9.
12. Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrate extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F.tularensis* subsp. *tularensis*. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 2924-31.
13. Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. Emerg Infect Dis 2002; 8(1): 69-73.
14. Chitadze N, Kuchuloria T, Clark DV, et al. Water-borne outbreak of oropharyngeal and glandular tularemia in Georgia: investigation and follow-up. Infection 2009; 37(6): 514-21.
15. Kantardjiev T, Ivanov I, Velinov T, et al. Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997-2005. Emerg Infect Dis 2006; 12(4): 678-80.
16. Leblebicioglu H, Esen S, Turan D, et al. Outbreak of tularemia: a case-control study and environmental investigation in Turkey. Int J Infect Dis 2008; 12(3): 265-9.
17. Hatipoglu CA, Bayiz U, Firat SK, Erdinc FS, Tulek N, Gedikoglu S. Case report: a case of tularemia with delayed diagnosis. Mikrobiyol Bul 2005; 39(1): 89-94.
18. Barut S, Cetin I. A tularemia outbreak in an extended family in Tokat Province, Turkey: observing the attack rate of tularemia. Int J Infect Dis 2009; 13(6): 745-8.

19. Acicbe O, Aydın H, Doğançlı L. Havza/Samsun Bölgesi'nde tularemi endemisi: izlenen olgularının retrospektif yorumu. *Infeksiyon Derg* 2007; 21(2): 55-58.
20. Christova I, Velinov T, Kantardjiev T, Galev A. Tularemia outbreak in Bulgaria. *Scand J Infect Dis* 2004; 36(11-12): 785-9.
21. Peker E, Ayaydin A, Duran N. Familial tularaemia. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27(3): 272-5.
22. Matyas BT, Nieder HS, Telford SR. Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard: clinical, epidemiologic and ecological characteristics. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1105: 351-77.
23. Bellido-Casado J, Perez-Castrillon JL, Bachiller-Luque P, et al. Report on five cases of tularemic pneumonia in a tularemia outbreak in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(3): 218-20.
24. Ulu Kılıç A, Çiçek Şentürk G, Tütüncü EE ve ark. Atipik bulgularla seyreden iki tularemi olgusu. *Klimik Dergisi* 2010; 23(3): 120-3.
25. Johansson A, Berglund L, Sjøstedt A, Tarnvik A. Ciprofloxacin for treatment of tularemia. *Clin Infect Dis* 2001; 33(2): 267-8.
26. Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA. Tularemia: a 30-year experience with 53 cases. *Medicine* 1985; 64(4): 251-69.
27. Eliasson H, Sjøstedt A, Back E. Clinical use of a diagnostic PCR for *Francisella tularensis* in patients with suspected ulceroglandular tularemia. *Scand J Infect Dis* 2005; 37(11-12): 833-7.