

***Francisella tularensis*'in Moleküler Tanısında Yeni Geliştirilen Kullanıma Hazır Ticari PCR Kitinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi**

Evaluation of a Newly-Developed Ready-to-Use Commercial PCR kit for the Molecular Diagnosis of *Francisella tularensis*

Bekir ÇELEBİ¹, Selçuk KILIÇ¹, Murat YEŞİLYURT², Bülent ACAR¹

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tularemi Referans Laboratuvarı, Ankara.

¹ Public Health Institution of Turkey, National Tularemia Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

² Tekirdağ Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Tekirdağ.

² Tekirdağ State Hospital, Infectious Diseases Clinic, Tekirdağ, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 31.08.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.11.2013

ÖZET

Tularemi, nadir görülen bir zoonoz olmasına karşın, biyolojik silah olarak değerlendirilmesi ve son yıllarda ortaya çıkan salgınlar nedeniyle yeniden önem kazanan bir enfeksiyon olmuştur. Tulareminin laboratuvar tanısı, uygun epidemiyolojik verilerin varlığında semptomların başlangıcından sonra 1-2 hafta arayla alınan serum örneklerinde etkene karşı gelişen antikorların gösterilmesiyle konulmaktadır. Ancak bu yöntem, semptomların yeni başladığı hastalığın erken döneminde ve biyolojik harp ajanların kasıtlı salınması durumlarında, hızlı tanı açısından sınırlı kullanıma sahiptir. Kültür ve serolojideki sınırlamalar yeni tanı tekniklerinin gündeme gelmesine yol açmıştır. Tulareminin hızlı tanısına yönelik olarak, çeşitli konvansiyonel ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rtPCR) yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak PCR yöntemlerinin, tularemi gibi hastalığın endemik olarak görüldüğü yeterli altyapısı olmayan kırsal bölgelerdeki merkezlerde uygulanabilmesi zordur. Ülkemizde biyolojik harp maddelerinin tanısına yönelik olarak sahada kullanılmak amacıyla konvansiyonel PCR için gerekli tüm cihaz, ekipman ve bileşenlerini [DNA4U® Bakteri Genomik DNA İzolasyon Kiti, CubeCycler® (Kişisel ısı döngü cihazı), PCR4U® Biyoterörizm Ajanlar Tespit Kiti, elektroforez tankı, güç kaynağı, agaroz jel elektroforez tamponu] içeren bir "Araç Kutusu (Toolbox)" geliştirilmiştir. Bu çalışmada, tularemi tanısında *tul4* genini hedefleyen kullanıma hazır *F.tularensis* PCR kitinin (Nanobiz, Ankara, Türkiye) etkinliğinin araştırılması ve sonuçların "in-house" konvansiyonel ve rtPCR testi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, dört *Francisella* spp. standart suşunun genomik DNA'sı, 15 *Francisella* spp. saha (insan, hayvan, su) izolatu, filogenetik olarak *F.tularensis* ile ilişkili 13 bakteri türüyle tularemi ön tanılı 60 olgudan alınan lenf nodu aspirat örnekleri çalışmaya alınmıştır. "In-house" PCR yöntemi ile karşılaştırıldığında Nanobiz PCR kitinin duyar-

İletişim (Correspondence): İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Selçuk Kılıç, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı, Adnan Saygun Cad. No: 55, F Blok 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 565 5435, E-posta (E-mail): mdskilic2003@yahoo.com

lılık, özgülük, pozitif ve negatif prediktif değerleri %100 olarak bulunmuş; en düşük saptama sınırı her bir reaksiyon tüpü için 100 genomik ekivalan olarak saptanmıştır. PCR için gerekli tüm kimyasallar, cihaz ve ekipmanları içeren kullanıma hazır PCR tanı sistemi laboratuvarlarda uygulanacak olan konvansiyonel PCR'ye göre hızlı ve doğru bir alternatiftir. Sonuç olarak, kullanıma hazır PCR kiti sınırlı kaynakların söz konusu olduğu uzak bölgeleri etkileyen tularemi salgınlarında *F.tularensis* tanısı için değerli bir tanı aracı olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Tularemi; *Francisella tularensis*; hızlı tanı; PCR; Türkiye.

ABSTRACT

Tularemia is a rare zoonotic infection, however, considerations of tularemia as a biological weapon and several recent major epidemics have caused renewed interest in this disease. Laboratory diagnosis of tularemia is done in the presence of appropriate epidemiological data, by the demonstration of specific antibodies in the serum samples obtained with 1-2 week intervals following the development of symptoms. It is an a posteriori analysis with limited use for prompt diagnosis of the patient during the early symptomatic phase and deliberate release of biological agents. Limitations in both culture and serology have led to substantial research in the development of new diagnostic techniques. Several PCR methods for tularemia have been developed, both for conventional and real-time polymerase chain reaction (rtPCR). However, PCR methods are hard to be deployed in remote endemic areas that lack sufficient infrastructure. Recently a "Toolbox" which includes all instruments, equipments and solutions [DNA4U® Bacteria Genomic DNA Isolation Kit, CubeCycler® (Personal Thermal Cycler), PCR4U® Bioterrorism Agents Detection Kit, electrophoresis tank, power supply, ready-agarose gel and electrophoresis buffer] necessary for conventional PCR, was developed for the identification of bioterrorism agents in the field. In this study we aimed to evaluate the efficacy of a ready-to-use commercial PCR kit (Nanobiz, Ankara, Turkey) targeting the *tu14* gene, for the diagnosis of tularemia and to compare the results with an in-house conventional PCR and a rtPCR test. We applied the assay to a collection of four *F.tularensis* standard strains, 15 field isolates (from humans, animals, water), 13 non-*Francisella* strains which are phylogenetically related to *F.tularensis* and a total of 60 lymph node aspirates obtained from suspected tularemia cases. Compared to the in-house PCR method used in our laboratory, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of Nanobiz PCR Toolbox assay were found to be 100%. The lowest detection limit of this method was determined as 100 genomic equivalent per PCR reaction mix. The new PCR kit is a rapid and accurate alternative to the conventional PCR methods since the toolbox includes all of the required chemicals, accessories and equipments. This ready-to-use PCR assay was appraised to be a valuable diagnostic tool for the detection of *F.tularensis* in the outbreak settings particularly in remote areas with limited resources.

Key words: Tularemia; *Francisella tularensis*; rapid diagnosis; PCR; Turkey.

GİRİŞ

Tularemi, *Francisella tularensis*'in etken olduğu kuzey yarım kürede dağılım gösteren zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır¹. Ülkemizde ilk kez 1936 yılında Lüleburgaz bölgesinde tanımlanan tularemi, yakın zamana kadar özellikle Marmara ve Batı Karadeniz Bölgesinde küçük salgınlar şeklinde görülürken, 2004 yılından sonra diğer bölgelerde de salgınlara neden olması nedeniyle 2005 yılında bildirim zorunlu hastalıklar listesine alınmıştır². Son yıllarda, ülkemizde tulareminin daha önceden bildirilmediği bölgelerde de salgınlara neden olması ve ülkemizin tüm coğrafi bölgelerinden bildirilen olgu sayısında

belirgin artış görülmesi, bu enfeksiyonun önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmesine neden olmuştur³⁻⁶. *F.tularensis*, dış ortam koşullarına dayanıklı olması, enfektif dozunun düşük olması (10-50 bakteri), kolay yayılabilmesi ve oluşturduğu klinik tabloların yüksek mortalitesi nedeniyle önemli biyolojik silah ajanları arasında yer almaktadır^{7,8}.

Tulareminin tanısı, bakteriyolojik, moleküler ve serolojik yöntemlerle konulmaktadır. Kesin tanı, klinik örneklerden etkenin izolasyonu ile yapılmakla birlikte, bakterinin özel kültür koşullarına gereksinim duyması ve biyogüvenlik düzeyi yüksek (BL-3) laboratuvarlarda çalışma zorunluluğu, kültür yönteminin kullanımını sınırlamaktadır^{9,10}. Tanıda sıklıkla tercih edilen serolojik testler ise, antikorların genellikle hastalığın ikinci haftasına kadar saptanamaması ve serokonversiyonun gösterilmesi için zamana ihtiyaç duyulması gibi nedenlerle hızlı tanıda yeterince yararlı olmamaktadır^{1,9-12}. Dolayısıyla moleküler yöntemler, günümüzde tulareminin hızlı tanısında ön plana geçmiştir¹¹⁻¹⁶. Nükleik asit amplifikasyon testlerinin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü, klinik ve çevresel örneklerde düşük sayıda bulunan mikroorganizmaların araştırılmasına olanak sağlamaktadır^{13,17-19}. Bu çalışmada, ülkemizde biyolojik harp maddelerinin sahada hızlı bir şekilde tanımlanabilmesi için tüm polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bileşenlerini içeren bir sistemin, tularemi tanısındaki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Tularemi Referans Laboratuvarında insan, hayvan ve su gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiş olan 15 *Francisella* spp. suşu, 2011-2012 yılları arasında tularemi ön tanısıyla gönderilen lenf nodu aspiratı (LNA) örneklerinden izole edilen 60 *F.tularensis* suşu ve dört standart *Francisella* spp. suşu dahil edildi (Tablo I). DNA amplifikasyonunun *F.tularensis*'e özgün olup olmadığını değerlendirmek amacıyla da, *Francisella* türlerine benzer hücre içi yaşam döngüsüne sahip olan veya filogenetik olarak *F.tularensis* ile ilişkili türlerden 13 bakteri suşu çalışmaya alındı (Tablo I).

Klinik örneklerden ve standart/koleksiyon suşlarından bakteri DNA'sı, ekstraksiyon kiti (DNA® 4U-Bakteri genomik DNA İzolasyon Kiti, Nanobiz, Ankara) kullanılarak elde edildi. PCR reaksiyon tüplerinde liyofilize olarak bulunan PCR karışımına (PCR4U® Bioterror Agents- *F.tularensis* tespit kiti) 25 µl DNAz ve RNAz içermeyen steril su eklendikten sonra, birkaç kez mikrosantrifüj işlemiyle peletin tamamen erimesi sağlandı. PCR karışımına sulandırıldıktan sonra üzerine 3-5 µl (50-100 ng DNA) DNA örneği eklendi. Amplifikasyon, "kişisel" ısı döngü cihazında (CubeCycler, Nanobiz, Ankara), 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonu takiben, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzamayı içeren 30 PCR döngüsü ve 72°C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde uygulandı. PCR sonuçlarının görüntülenmesi amacıyla, amplifikasyon ürünleri 10 µl olacak şekilde, firma tarafından hazır olarak sağlanan %1.5 agaroz jele yüklendi ve elektroforez işlemine tabi tutuldu. Sonuçlar standart moleküler ağırlık ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Standart Bakteri Suşları ve PCR Sonuçları

Suş		PCR sonucu
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	NCTC 10857 (Live Vaccine Strain)	Pozitif
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>	Schu S4	Pozitif
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i>	U112	Pozitif
<i>Francisella philomiragia</i>	13404	Negatif
<i>Borrelia burgdorferi</i>	B31 (ATCC 35210)	Negatif
<i>Brucella abortus</i> biovar 1	544	Negatif
<i>Brucella melitensis</i> biovar 1	16M	Negatif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Negatif
<i>Haemophilus influenzae</i> Type B	ATCC 10211	Negatif
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 43111	Negatif
<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 9797	Negatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Negatif
<i>Yersinia pestis</i>	NCTC 2868	Negatif
<i>Yersinia enterocolitica</i> Tip 09	RSKK 921	Negatif
<i>Vibrio cholerae</i>	NCTC 8021	Negatif
<i>Burkholderia mallei</i>	RSKK 11 (NCTC 10260)	Negatif
<i>Bartonella henselae</i>	RSKK	Negatif

RSKK: Refik Saydam Kültür Koleksiyon Laboratuvarı.

Kullanıma hazır PCR kitinin (Nanobiz®) etkinliği, konvansiyonel *tu14* ve üç farklı genomik bölgeyi (ISFtu2, 23kDa ve *tu14*) saptayan gerçek zamanlı PCR (rtPCR) ile karşılaştırıldı. PCR kitinin analitik duyarlılığını [Saptama sınırı; Limit of Detection (LOD)] belirlemek için 10^6 genomik ekivalan (GE) içeren pozitif kontrol örneğinden 10^1 - 10^6 arasında GE olacak şekilde hazırlanan örnekler üç PCR yöntemiyle çalışıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, çeşitli kaynaklardan izole edilen 15 *Francisella* spp. suşu ile üç standart *F.tularensis* DNA'sında özgül 420 baz çifti (bç) büyüklüğünde bant oluşumu saptanmış ve *F.tularensis* varlığı PCR ile de doğrulanmıştır. PCR kitinin özgülüğünü saptamak için test edilen filogenetik olarak *F.tularensis* ile yakın ilişkili 13 bakterinin DNA örneklerinde herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiştir (Şekil 1).

Tularemi şüpheli olgulara ait 60 LNA örneğinden 45'i, laboratuvarımızda kullanılan *tu14*'e özgül konvansiyonel PCR ve üç farklı genomik lokusu (ISFtu2, 23kDa, *tu14*) hedefleyen rtPCR ile pozitif olarak bulunmuştur. Kalan 15 örnek, kültür ve PCR ile negatif olarak değerlendirilmiş; ancak bu olguların tularemi mikroaglutinasyon testi pozitif olarak saptanmıştır. Nanobiz PCR kiti ve "in-house" PCR yöntemleriyle pozitif bulunan LNA örneklerinin tümünde 420 bç büyüklüğünde bant belirlenmiştir. Kültür ve PCR negatif,



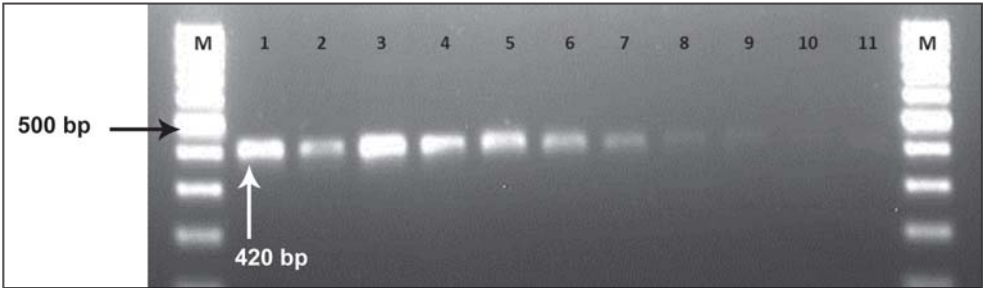
Şekil 1. Kullanıma hazır *F.tularensis* PCR kiti ile elde edilen sonuçlar [Hat 1: *F.tularensis* NCTC 10857; Hat 2: Negatif kontrol; Hat 3: *Brucella melitensis* ATCC 23456; Hat 4: *Yersinia enterocolitica*; Hat 5: *Vibrio cholerae*; Hat 6-9 ve 11: Klinik örnekler (Lenf aspiratı); Hat 10 ve 12: Şüpheli klinik izolatlar].

serolojik testleri pozitif olan 15 olgunun LNA örneklerinde Nanobiz kiti ile de negatif sonuç alınmıştır. Bu sonuçlara göre "in-house" PCR ile karşılaştırıldığında, Nanobiz PCR kitinin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuş; tularemi şüpheli olgulara ait LNA örneklerinin sonuçlarına göre, pozitif ve negatif prediktif değeri de %100 olarak değerlendirilmiştir.

PCR kitinin analitik duyarlılığını belirlemek amacıyla, seri dilüsyonları yapılan pozitif kontrol örneği ile Nanobiz® *F.tularensis* PCR kitinin saptama sınırı 100 GE/reaksiyon olarak bulunmuştur (Şekil 2). Konvansiyonel *tul4* PCR yönteminde saptama değeri 100 GE iken, "in-house" rtPCR ile 25 GE olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Tularemide erken dönemdeki semptomlar özgül olmadığı için, tedavide gecikmeye bağlı gelişecek komplikasyonların önlenmesi amacıyla hızlı ve güvenilir laboratuvar tanı araçlarına gereksinim vardır^{1,10,11}. Son yıllarda *F.tularensis*'in saptanması amacıyla PCR kullanımına yönelik birçok çalışma yayınlanmıştır¹²⁻¹⁶. Tularemi tanısında konvansiyonel ve gerçek zamanlı PCR teknikleri kullanılmakla birlikte, rtPCR, konvansiyonel PCR yöntemine göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir^{11,17,20,21}. Ancak bu üstünlük,



Şekil 2. Kullanıma hazır *F.tularensis* PCR kitinin saptama sınırı sonuçları [M: DNA belirteci; Hat 1: Pozitif kontrol *F.tularensis* NCTC 10857 (420 bç); Hat 2: *F.tularensis* 10⁶ GE; Hat 3: *F.tularensis* 10⁵ GE; Hat 4: *F.tularensis* 10⁴ GE; Hat 5: *F.tularensis* 10³ GE; Hat 6: *F.tularensis* 5 x 10² GE; Hat 7: *F.tularensis* 250 GE; Hat 8: *F.tularensis* 100 GE; Hat 9: *F.tularensis* 50 GE; Hat 10: *F.tularensis* 10 GE, Hat 11: Negatif kontrol].

seçilen hedef bölgelere ve kullanılan örnek türüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir^{11,13}. PCR ile *F.tularensis*'e ait dış membran proteinlerini kodlayan *tul4* ve *fopA*, insersiyon elementi (ISFtu2) ve makrofaj enfeksiyonunda eksprese edilen bir proteini kodlayan 23 kDa gen gibi başlıca hedef bölgeler çoğaltılmaktadır^{10-13,20-22}. *F.tularensis*'in tüm alt türlerinde ortak olarak bulunan 17 kDa'luk lipoproteini kodlayan *tul4* geni, tulareminin moleküler tanısında en fazla tercih edilen hedef bölgedir^{10,11,13,22-24}. Nanobiz® PCR kitinde de 17 kDa'luk lipoproteini kodlayan *tul4* geni hedef olarak seçilmiştir.

Yapılan çalışmalarda *tul4*'e özgül PCR yönteminin saptama sınırı, kan örneklerinde 50 CFU/ml, fare ve kene doku örneklerinde < 100 CFU/ml, serum örneklerinde ise 10³-10⁴ olarak bildirilmiştir^{18,23,24}. Ancak çalışmalarda kullanılan PCR yöntemleri (konvansiyonel veya rtPCR) ve analitik duyarlılığın belirlenmesinde kullanılan birimlerin (CFU/ml, kopya/PCR reaksiyon tüpü, kopya sayısı/ml, DNA konsantrasyonu/ml, genomik ekivalan) farklı oluşu, sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan PCR kitinin saptama sınırı, reaksiyon başına 100 kopya *tul4* geni olarak saptanmıştır. Bu değer, *F.tularensis tul4* genini hedefleyen önceki konvansiyonel PCR çalışmalarındaki^{23,24} duyarlılık sınırlarına yakın olup, rtPCR yöntemine göre iki kat daha yüksek bulunmuştur. Bu kısmi farklılık, PCR için gerekli tüm reaktiflerin, PCR reaksiyon tüplerinde liyofilize olarak sunulmasının, tüp çeperlerinde absorpsiyona bağlı kısmi kayıplara neden olması şeklinde yorumlanmıştır.

F.tularensis suşları ile standart bakteri DNA'larında Nanobiz® PCR kitinin duyarlılığı, *tul4*'e özgül "in-house" PCR ve rtPCR ile karşılaştırıldığında %100 olarak bulunmuştur. Nanobiz® PCR kiti ile *Francisella* bakterisi ile yakın ilişkili 13 bakteri türünde pozitif sonuç gözlenmemiş (Tablo I) ve özgülüğün de yüksek (%100) olduğu belirlenmiştir. Bir kitin güvenilirliğinin değerlendirilmesinde, duyarlılık ve özgülüğün yanı sıra uygulanabilirlik, kullanım kolaylığı, harcanan zaman ve maliyet gibi kriterler de göz önüne alınmalıdır⁶. *F.tularensis*'in tanımlanması konvansiyonel PCR ile 7-8 saatte, rtPCR ile 1.5-3 saatte gerçekleşmektedir. Gerçek zamanlı PCR yönteminin konvansiyonel yöntemle göre daha basit ve daha kısa iş akışına sahip olması nedeniyle hızlı sonuç vermesine karşın, konvansiyonel PCR'ye göre test ve kurulum maliyetleri daha yüksektir. Diğer yandan çevresel örneklerden DNA izolasyonu için otomatik ekstraksiyon sistemleri uygun olmayıp, örneğin ön işlemlerden geçirilmesi veya ayrı kit kullanılması gereklidir. Bu durum laboratuvar tanısında zaman ve maliyet artırıcı bir faktördür.

Tulareminin moleküler tanısında PCR tekniğinin laboratuvarlar arasında standardize edilememiş olması en önemli sorundur^{11-13,20}. "In-house" yöntemler genellikle iyi performans göstermesine karşın, kullanılan reaktiflere, ısı döngü cihazı ve koşullarına, DNA izolasyon yöntemlerine ve işlemi yapan personelin yeterliliğindeki farklılıklara bağlı olarak laboratuvarlar arasındaki uygulamalarda sorunlar yaşanmaktadır^{11,13}. Ticari kitler bu sorunların önlenmesi ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesi için iyi bir alternatif olarak görülmektedir. Ancak, cihaz-ekipman bağımlılığı ve reaktiflerin maliyetinin yüksek olması PCR uygulamasının önemli bir dezavantajdır^{9,12,13}.

Tulareminin kırsal bölge hastalığı olması nedeniyle, laboratuvar altyapısına sahip olmayan yerlerde şüpheli olguların erken tanısı, tedaviye erken başlanması ve komplikasyonların önlenmesi açısından çok önemlidir^{14-16,20,22}. Ayrıca, salgınlarda çevresel örneklerin incelenmesi, enfeksiyon kaynaklarının saptanması ve epidemilerin kontrol altına alınmasında oldukça etkilidir^{1,12,23}. Ek olarak, biyolojik saldırı durumunda hızlı tanı kapasitesinin sağlanabilmesi için sahada kullanılacak, uygulanması kolay, tüm ekipman ve bileşenleri içeren sistemlere ihtiyaç vardır^{17-19,21,23}. Nanobiz® Toolbox sistemi yukarıda belirtilen koşullarda çalışacak şekilde dizayn edilmiş olup, PCR için gerekli tüm bileşenleri içermektedir. Çalışmamızda, bu yöntemin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri %100 olarak bulunmuş; uygulaması kolay kullanıma hazır bir sistem olarak, tulareminin endemik olarak görüldüğü kırsal bölgelerdeki fiziki alt yapısı uygun olmayan mikrobiyoloji laboratuvarlarında ve biyoterör olaylarında sahada kullanıma potansiyeli olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. WHO Guidelines on Tularaemia. WHO/CDS/EPR/2007.7. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/deliberate/WHO_CDS_EPR_2007_7/en/
2. Kılıç S. *Francisella tularensis* ve Türkiye'de tularemi epidemiyolojisine genel bir bakış. FLORA 2010; 15(2): 37-58.
3. Kılıç S. Epidemiological characteristics of tularemia in Turkey. International Symposium on *Francisella tularensis* and Tularemia, 19-23 June 2013, Ürgüp, Nevşehir, Turkey. Symposium Book, p: 15.
4. Ulu Kılıç A, Kılıç S, Şencan İ ve ark. İç Anadolu Bölgesinde *Francisella tularensis* alttür *holarctica*'ya bağlı su kaynaklı bir tularemi salgını. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 234-48.
5. Yeşilyurt M, Kilic S, Celebi B, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains recovered in Central Anatolia region, Turkey. J Antimicrob Chemother 2011; 66(11): 2588-92.
6. Dikici N, Ural O, Sümer S ve ark. Konya bölgesinde tularemi. Mikrobiyol Bul 2012; 46(2): 225-35.
7. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann N Y Acad Sci 2007; 1105: 1-29.
8. Kılıç S. Biyolojik silah olarak bakteriler: kategori A ajanlar. Turk Hij Den Biyol Derg 2006; 63(1-3): 21-46.
9. Wong JD, Shapiro DS. *Francisella*, pp: 647-51. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology. 1999, 7th ed. ASM Press, Washington DC.
10. Tärnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. Ann N Y Acad Sci 2007; 1105: 378-404.
11. Hepburn MJ, Simpson AJ. Tularemia: current diagnosis and treatment options. Expert Rev Anti Infect Ther 2008; 6(2): 231-40.
12. Johansson A, Forsman M, Sjöstedt A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. APMS 2004; 112(11-12): 898-907.
13. Spletstoesser WD, Tomaso H, Al Dahouk S, Neubauer H, Schuff-Werner P. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2005; 52(6): 249-61.
14. Eliasson H, Sjöstedt A, Back E. Clinical use of a diagnostic PCR for *Francisella tularensis* in patients with suspected ulceroglandular tularaemia. Scand J Infect Dis 2005; 37(11-12): 833-7.
15. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, et al. Detection of *F.tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. J Clin Microbiol 1997; 35(5): 1045-8.

16. Johansson A, Berglund L, Eriksson U, et al. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 22-6.
17. Lamps LW, Havens JM, Sjostedt A, Page DL, Scott MA. Histologic and molecular diagnosis of tularemia: a potential bioterrorism agent endemic to North America. *Mod Pathol* 2004; 17(5): 489-95.
18. Tomioka K, Peredelchuk M, Zhu X, et al. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J Mol Diagn* 2005; 7(4): 486-94.
19. Matero P, Hemmilä H, Tomaso H, et al. Rapid field detection assays for *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(1): 34-43.
20. Versage JL, Severin DD, Chu MC, Petersen JM. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5492-9.
21. Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59(1): 46-51.
22. Sjostedt 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.
23. Grunow R, Splettstoesser W, McDonald S, et al. Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(1): 86-90.
24. Higgins JA, Hubalek Z, Halouzka J, et al. Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62(2): 310-8.