

## *Francisella tularensis* antikorları ile *Brucella* çapraz reaksiyonlarının araştırılması

### Investigation of cross-reactions with *Francisella tularensis* antibodies to *Brucella*

Selçuk KILIÇ<sup>1</sup>, Bekir ÇELEBİ<sup>1</sup>, Yasemin BAYRAM<sup>2</sup>, Burak ÇİTİL<sup>3</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** *Francisella tularensis* antikorları ile *Brucella*, *Legionella*, *Yersinia* ve *Mycoplasma* türleri arasında çapraz reaksiyonlar bildirilmiştir. *F.tularensis* liposakkarit yapısında bulunan *Brucella* O-polisakkaritindeki benzer antijenik yapılar serolojik testlerde çapraz reaksiyonlara neden olabilmektedir. Aglütinasyon testlerinde *F.tularensis* ve *Brucella abortus* arasındaki çapraz reaksiyonlar sonuçların yorumlanmasını güçleştirebilir.

**Yöntem:** *Brucella* ve *F.tularensis* arasındaki çapraz reaksiyonların sıklığı ve bu reaksiyonlardan sorumlu olan antikorlar mikroaglütinasyon, *Brucella* ELISA ve 2-merkaptöetanol mikroaglütinasyon testleri ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** 260 tularemi pozitif örneğin 49 (%18.8)'unda *B.abortus* antijeniyle çapraz reaksiyonlar saptanırken, bruselloz pozitif 252 örneğin 23 (%9.1)'ünde *F.tularensis* antijeni ile çapraz reaksiyon gözlenmiştir. Otuzaltı tularemi (%73.5) pozitif serumda *Brucella* çapraz reaksiyon titreleri 1:20-1:80 iken, 13 örnekte (%26.5) ise  $\geq 1:160$  titrelerde çapraz reaksiyon gözlenmiştir. 2-ME testi ile  $< 1:160$  titrelerde *Brucella* aglütinini saptanan örneklerinde titreler  $\leq 1:40$  titrelere düşmüştür. 23 *Brucella* pozitif örneğin 22 (%95.7) *Brucella* MA pozitif örnekte 1:20-1:80 titrelerde tularemi antijeni ile çapraz reaksiyon saptanmıştır. 2-ME testi ile 1:20-1:80 titrelerde *Brucella* aglütinini saptanan örneklerde titreler  $\leq 1:40$  titrelere inmiştir.

#### ABSTRACT

**Objective:** Cross-reactions with *Francisella tularensis* antibodies to *Brucella*, *Legionella*, *Yersinia*, and *Mycoplasma* species have been described. *F.tularensis* LPS is able to induce serological cross-reactions indistinguishable from brucellosis due to a similar immunodominant epitope in the *Brucella* O-polysaccharide. In agglutination tests, cross-reaction occurred only between *F.tularensis* and *Brucella abortus*, cross reactivity with *Brucella* can confuse interpretation of the results.

**Method:** The aim of this study was to assess cross reactions and whether IgM or IgG antibodies are responsible for *Brucella* and *F.tularensis* cross-reactions, by the use of microagglutination, *Brucella* ELISA and 2-mercaptoethanol microagglutination test.

**Results:** Cross-reaction agglutinin titers to *B.abortus* antigen were found in 49 of 260 (18.8%) tularemia positive serum specimens, and cross-reaction titers to *F.tularensis* antigen were found in 23 of 252 (9.1%) *Brucella* positive serum specimens. While thirty six (73.5%) tularemia positive serum titers had *Brucella* cross reactivity at the titers of 1:20-1:80, cross-reaction with  $\geq 1:160$  titers was found in 13 samples (26.5%). The cross-reaction titers to *B.abortus* antigen were reduced to equal or less 1:40 titers by 2-ME. Cross- reactivity at the titers of 1:20-1:80 was determined in 22 of 23 *Brucella* positive samples.

<sup>1</sup> Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, ANKARA

<sup>2</sup> 100. Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji BD, VAN

<sup>3</sup> Adıyaman Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ADIYAMAN



İletişim / Corresponding Author : Selçuk KILIÇ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları D.B., ANKARA

Tel : +90 312 565 54 35

E-posta / E-mail : selcuk.kilic@thsk.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 15.01.2012

Kabul Tarihi / Accepted : 02.07.2013

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2013.70893

Kılıç S, Çelebi B, Bayram Y, Çitil B. *Francisella tularensis* antikorları ile *Brucella* çapraz reaksiyonlarının araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70(2): 65-70.

**Sonuç:** Her iki enfeksiyonda saptanan MA aglütinasyon titrelerin, 2-ME testi ile  $\leq 1:40$  titrelere düşmesi çapraz reaksiyonların IgM antikorlarına bağlı olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Tularemi, *Brucella*, Çapraz reaksiyon, Aglütinasyon, 2-Merkaptoetanol

**Conclusion:** The cross-reaction titers determined with MA test in both infections were reduced to 40 or less by 2-ME, suggesting that the titers are due to immunoglobulin M antibody.

**Key Words:** Tularemia, *Brucella*, Cross reaction, Agglutination, 2-Mercaptoethanol

## GİRİŞ

Tularemi, *Francisella tularensis* etken olduğu dünya çapında bir dağılım gösteren ve farklı klinik belirtilerle seyreden zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır (1). Son yıllarda ülkemizde tularemi olgularının artışı ve daha önce tanımlandığı Marmara Bölgesi'nin dışında birçok bölgede küçük epidemilere neden olması, bu enfeksiyonun giderek önem kazanmasına neden olmuştur (2).

Bruselloz; ülkemiz koyun ve sığır yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen ve insan sağlığı açısından da ciddi tehdit oluşturan zoonotik bir enfeksiyondur (3). Tularemi ve Bruselloz ülkemizde endemik olarak görülmektedir (1). *Brucella* spp. ile *Francisella tularensis* arasında ortak antijenik yapılar nedeniyle serolojik testlerde çapraz reaksiyonların varlığı tularemi hastalığının ilk tanımlandığı yıllarda dikkat çekmiştir (4, 5). *F.tularensis*'in lipopolisakkarit (LPS) yapısı, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Shigella flexneri* türleri ile benzer tek tip O-antijeni içermektedir (6). S-tipi koloni oluşturan *Brucella* türlerinin (*B.abortus*, *B.melitensis* ve *B.suis*) lipopolisakkaritlere bağlı O polisakkarit zincirindeki 4-amino, 4-6 dideoksimannoz (N-acil-D-perozamin) bölgesi bazı Gram negatif bakteriler ile ortak antijenik özellik göstermektedir. Bu antijenik bölgenin *F.tularensis*, *Escherichia coli* O157, *Escherichia hermanni*, *Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae* O-1, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Stenotrophomonas maltophilia*'nın yüzey antijenleriyle benzerliği çapraz reaksiyonlardan sorumludur (6-8). Her iki enfeksiyonun farklı klinik tablolar ile seyretmesi nedeniyle çapraz reaksiyonlar laboratuvar tanısında önemli bir sorun olarak kabul edilmemektedir (9, 10). Ancak her iki enfeksiyonun ülkemizde kırsal bölgelerde görülmesi ve başlangıçta

grip benzeri sendrom (ateş, halsizlik, terleme, kas ve eklem ağrısı vb) şeklinde görülmeleri nedeniyle ayırıcı tanıda ve tularemi için aglütinasyon testindeki sınır değerlerin varlığında çapraz reaksiyonların araştırılması gereklidir (10-15).

*F.tularensis* ile *Brucella* türleri arasındaki çapraz reaksiyonların 1920'li yıllardan itibaren bilinmesine karşın literatürde bu konuyla ilgili tek çalışma bulunmaktadır (9). Behan ve Klein (1982), 128 tularemi pozitif örneğin 42'sinde ve 34 bruselloz pozitif örneğin sekizinde çapraz reaksiyonlar saptamışlar ve redükten test ile çapraz reaksiyon titrelerin  $\leq 1:10$  titrelere inmesi nedeniyle çapraz reaksiyonların IgM'e bağlı olduğu öne sürmüşlerdir (9). Bu çalışmada; *Brucella* ve *F.tularensis* arasındaki çapraz reaksiyonların sıklığının saptanması ve çapraz reaksiyonlarda hangi antikor tipinin rol oynadığının saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı'na *F.tularensis* ve *Brucella* antikorlarının araştırılması amacıyla gönderilmiş 512 serum örneği incelenmiştir. *F.tularensis* LPS'ine karşı gelişen aglütininler (IgM, IgG ve IgA) *F.tularensis* mikroaglütinasyon (MA) testi ile araştırılmıştır (16). *Brucella* antikorlarının saptanması amacıyla *Brucella* MA testi ile *Brucella* ELISA IgM ve IgG (Euroimmun AG, Almanya) yöntemleri kullanılmıştır (17).

Her iki etkene karşı gelişen antikorları saptamak amacıyla MA testi için U-tabanlı mikropleytlerde serum örneklerinin iki katlı seri dilüsyonları

(1:5-1:5120) hazırlanmıştır. Serum içermeyen son godeler ise antijen kontrol için kullanılmıştır. Godelerdeki serum dilüsyonlarının üzerine eşit miktarda boyalı antijenler eklenerek 1:10 ve 1:20480 serum dilüsyonları elde edilmiştir. Mikropleyitin üzeri kapakla kapatılarak 37°C'de nemli ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aglütinasyon reaksiyonu çıplak gözle ve okuma aynasında değerlendirilmiştir. Antijen antikor kompleksinin godelerde “dantela veya şemsiye” tarzında çökmesi ve süpernatantın tümüyle berrak olması pozitif olarak değerlendirilirken, godenin merkezinde toplanmış boyalı dilüentin çevrelediği düzgün kenarlı düğme tarzında çökelti varlığı negatif olarak kabul edilmiştir.

*F.tularensis* ve *Brucella* spp. karşı gelişen IgG antikorların saptanması amacıyla 2-Merkaptoetanol (2-ME) testi mikropleyt yöntemiyle uygulanmıştır. 2-ME testinde örnek dilüenti olarak 0.1 M 2-ME içeren serum fizyolojik kullanılması dışında aynı MA test protokolü uygulanmıştır. İlk aşamada serum örnekleri 1:20 dilüsyonda çapraz reaksiyonların varlığı açısından taranmış ve pozitif bulunan örneklerde üst titreler araştırılmıştır. Çapraz reaksiyonda rol oynayan antikor tipini belirlemek için MA testinde  $\geq 1:160$  titrelerde pozitif bulunan örneklerde 2-ME testi çalışılmıştır.

## BULGULAR

*F.tularensis* MA ile  $\geq 1:160$  titrelerde pozitif bulunmuş 260 örneğin 49 (%18.8)'unda *Brucella* antijeni ile  $\geq 1:20$  titrelerde çapraz reaksiyon gözlenmiştir. *Brucella* MAT (MAT $\geq 1:160$  titre) ve ELISA IgM/IgG pozitif olan 252 örneğin 23 (%9.1)'ü *F.tularensis* antijeni ile  $\geq 1:20$  titrelerde çapraz reaksiyon vermiştir. Otuzaltı tularemi (%73.5) pozitif serumda *Brucella* çapraz reaksiyon titreleri 1:20-1:80 iken, 22 (%95.7) *Brucella* MA pozitif örnekte 1:20-1:80 titrelerde tularemi antijeni ile çapraz reaksiyon saptanmıştır.  $< 1:160$  titrelerde *Brucella* aglütinini saptanan örneklerde titreler 2-ME testi ile  $\leq 1:40$  titrelere inmiştir (Tablo 1). Her iki MA testinde  $\geq 1:160$  titrelerde pozitif bulunan örneklerin MA ve redükten test sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Kırkdokuz tularemi pozitif serum örneğinin 13 (%26.5)'ünde *Brucella* ile  $\geq 1:160$  titrelerde çapraz reaksiyon gözlenmiştir. Tularemi pozitif bir örnekte (Tul-136) *Brucella* aglütininin titresi *F.tularensis* MA titresinden (1:2560) daha yüksek bulunmuş ve *Brucella* 2-ME testi ile aglütininin titresi 1:5120'den 1:80'e düşmüştür. Tularemi pozitif iki örnekte (Tul-60 ve Tul-106) ise aynı titrede (1:5120 titre) tularemi ve *Brucella* aglütinileri saptanmış olup, *Brucella* aglütininin titreleri 2-ME testinde 1:10 ve 1:20 düzeylerine inmiştir. *Brucella* ile çapraz reaksiyon veren tularemi pozitif 10 örneğin 2-ME titreleri değerleri; iki örnekte 1:80, bir örnekte 1:40, bir örnekte 1:20, iki örnekte 1:10 ve dört örnekte ise  $< 1:10$  olarak saptanmıştır. Yirmiüç *Brucella* pozitif örneğin birinde *F.tularensis* ile 1:160 titrede çapraz reaksiyon gözlenmiş ve 2-ME ile tularemi antikor titresi 1:20 düzeyine inmiştir (Tablo 2).

## TARTIŞMA

İnsanlarda tulareminin klinik tablosu lokalize hastalıktan fulminan, yaşamı tehdit eden pnömoni veya septisemiye kadar değişmektedir (11). Tularemi enfeksiyonunda hastalığın başlangıcındaki grip benzeri özgün olmayan veya diğer solunum yolu enfeksiyonlarına benzer yakınmaların varlığı klinik tanısını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle laboratuvar ile tanının desteklenmesi gereklidir. Tanının erken konulması daha ağır seyirli klinik formlardaki yüksek mortalite nedeniyle önemlidir (12).

*F.tularensis* ile temas sonucunda hümmoral ve hüresel immün yanıt gelişir. Hümmoral immün yanıt etkenle temasın iyi bir göstergesi olmasına rağmen, korunmada hüresel immünite önemlidir. *F.tularensis* LPS'e karşı gelişen antikorlar (IgM, IgG ve IgA) semptomların başlangıcından sonraki 6-10 gün içerisinde belirlemektedir. Olguların %89-95'inde temastan iki hafta sonra antikor yanıtı oluşurken, bazı vakalarda ise antikorlar üçüncü ve dördüncü haftalarda saptanabilir düzeylere ulaşmaktadır (5, 13, 18, 19). Bu nedenle, hastalığın erken dönemindeki tek bir pozitif aglütinasyon sonucunun tanısal değeri sınırlıdır ve akut enfeksiyon tanısında 7-14 gün arayla

Tablo 1. Tularemi ve bruselloz pozitif serum örneklerinde 1:160 titrenin altındaki saptanan çapraz reaksiyonlar

Enfeksiyon	Örnek Sayısı	Standard MAT titresi*		Çapraz reaksiyon titresi						2-ME titresi															
		<i>F.tularensis</i> <i>Brucella</i>		<i>F.tularensis</i> <i>Brucella</i>		<i>F.tularensis</i>						<i>Brucella</i>													
		20	40	80	<10	80	40	20	10	20	40	80	160	320	640	20	40	80	160	320	640				
Tularemi	2	10240		1	1										2	1	1								
	2	5120		1	3										2	1	1								
	3	2560		2	1							1	1	1	1	1	1	1							
	5	1280		4	1					1	1	1	1	1	1	1	1	4							
	7	640		5	1	1		2	4	1															
	8	320		6	1	1		2	5	1															
	7	160		5	2			4	3																
	1	10240		1						1															1
Bruselloz	1	5120		1					1																1
	2	2560		1	1			2																	1
	3	1280		1	1			1	1																1
	7	640		4	1	2		5	1	1															1
	4	320		3	1			2	1	1															1
	4	160		3	1			2	2																1

\* *Francisella tularensis* ve *Brucella* MA titreleri, resiprokal titre.

alınan çift serum örneğinde dört kat ve üzerinde titre artışının (serokonversiyon) gösterilmesi gerekir (11-15). Ancak antikor yanıtının ilk haftalarda gelişmemesi veya çok düşük düzeylerde olması, laboratuvar doğrulanması için ikinci serum örneğinin alınmasına ve dolayısıyla tanıda gecikmeye neden olmaktadır. Klinik tablolar arasındaki farklılıklara rağmen, hastalığın erken dönemindeki düşük antikor titrelerinin çapraz reaksiyonlara mı yoksa doğal enfeksiyona bağlı olduğunun araştırılması gereklidir (9, 11, 12).

Ülkemizde endemik olarak görülen tularemi ve bruselloz enfeksiyonların aglütinasyon testlerindeki sınır değerlerin varlığında çapraz reaksiyonların araştırılması gereklidir. Bu çalışmada referans merkezde bildirim sisteminde var olan vaka tanımına göre laboratuvar kriterleri ile doğrulanmış kesin tularemi ve bruselloz olgularına ait örnekler çalışmaya alınmıştır. Tularemi kesin tanısı; uygun epidemiyolojik verilerin varlığında, klasik hastalık formlarından birini gösteren olgularda tularemi mikroaglütinasyon testi ile tek serum örneğinde *F. tularensis*'e karşı artmış serum antikor titresi ( $\geq 1/160$  titre) ve/veya çift serum örneğinde antikor titrelerinin  $\geq 4$  kat artması veya klinik örnekten etkenin izolasyonu ile konulmuştur.

Bruselloz pozitif örnekler; uygun epidemiyolojik ve klinik belirti/bulguların varlığında, klinik örneklerden *Brucella spp*'in izole edilmiş ve/veya daha önce tedavi almamış olguda tek serum örneğinde STA ile antikor titresinin  $>1/160$  olması veya en az iki hafta ara ile alınan çift serum örneğinde *Brucella* STA titresinin  $\geq 4$  kat artışın saptandığı olgulara ait örnekler arasından seçilmiştir (20).

Tularemi ön tanı olgularda MAT ile elde edilen düşük pozitif veya sınır değerlerdeki titrelerde çapraz reaksiyonlar araştırılmalıdır. Ancak bir olguda her iki etkene karşı eşit ve/veya daha yüksek titrelerde aglütininin varlığında olgunun öyküsü, klinik belirti ve bulgulara göre değerlendirilmelidir. Bruselloz ve tularemi enfeksiyonunda tedavi sonrasında spesifik aglütinasyonların uzun bir süre tanısız titrenin üzerinde kalması nedeniyle tek bir örnekte düşük titrelerdeki aglütinasyonların çapraz reaksiyona mı yoksa gerçek pozitifliği mi ait olduğunun değerlendirilmesinde sorunlar yaşanabilir. *F.tularensis* IgM ve IgG antikorları sıklıkla tüm hücre antijenin kullanıldığı aglütinasyon testleri ile saptanmaktadır. MA testi ile temel olarak IgM sınıfı, daha az oranda ise IgG ve IgA antikorları saptanmaktadır.

**Tablo 2.** Tularemi ve bruselloz pozitif serum örneklerinde 1:160 titrenin üzerinde saptanan çapraz reaksiyonlar.

Örnek	Örnek No	Standard MAT titresi*		Çapraz Reaksiyon titresi		2-ME titresi	
		<i>F.tularensis</i>	<i>Brucella</i>	<i>F.tularensis</i>	<i>Brucella</i>	<i>F.tularensis</i>	<i>Brucella</i>
Tularemi	Tul-13	160			160	80	80
	Tul-17	320			320	40	<10
	Tul-32	640			640	160	<10
	Tul-56	1280			160	320	10
	Tul-60	5120			5120	640	20
	Tul-64	2560			160	160	10
	Tul-84	2560			320	640	80
	Tul-104	2560			160	640	<10
	Tul-106	5120			5120	1280	10
	Tul-114	1280			160	160	<10
	Tul-115	2560			160	320	40
	Tul-119	2560			640	640	20
	Tul-136	2560			5120	20	80
Bruselloz	Bru-90		320	160		20	40

\* *Francisella tularensis* ve *Brucella* MA titreleri, resiprokal titre.

*F.tularensis*'e karşı gelişen spesifik antikorlar 8-10 yıl gibi uzun süre düşük titrelerde pozitif olarak saptanabilir (12, 13, 18, 19). Her iki etkene karşı aglütininlerin saptandığı durumlarda hangisinin çapraz reaksiyon hangisinin gerçek pozitiflik olduğunun gösterilmesi amacıyla konvelesan dönem örneğinde antikor titre artışının araştırılması gereklidir. Akut ve konvelesan örneklerdeki titre artışının saptanması hangi enfeksiyonun aktif olduğunu gösterilmesinde önemli katkı sağlayacaktır.

Diğer yandan *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* O:30 gibi diğer bakterilere bağlı

gelişebilecek çapraz reaksiyonların araştırılmaması bu çalışmanın bir kısıtlılığıdır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, tularemi enfeksiyonu esnasında *Brucella* türleri ile çapraz reaksiyonların daha fazla geliştiğini göstermiştir. Redüktan test sonuçları *F.tularensis* ve *Brucella* arasındaki çapraz reaksiyon titrelerinin özellikle IgM'e bağlı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak; çapraz reaksiyonların çoğunlukla 1:10-1:80 titrelerde olması nedeniyle özellikle tularemi ön tanılı olgularda <1:160 titrelerdeki MA test sonuçlarının varlığında mutlaka *Brucella* yönünden çapraz reaksiyonların araştırılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Kılıç S. A General Overview of *Francisella tularensis* and the Epidemiology of *Tularaemia* in Turkey. *Flora*, 2010; 15(2): 37-58.
2. Kılıç S, Yeşilyurt M. Tularemi: Güncel Tedavi Seçeneklerine Genel Bir Bakış. *Klimik Dergisi*, 2011; 24(1): 2-10.
3. Yüce A, Çavuş SA. Türkiye'de Bruselloz: Genel Bakış. *Klimik Dergisi*, 2011; 19(3): 87-97.
4. Francis E, Evans AC. Agglutination, cross agglutination, and agglutin absorption in tularemia. *Public Health Rep*, 1926; 41: 1273-95.
5. Ransmeier JC, Ewing CL. The agglutination reaction in tularemia. *J Infect Dis*, 1941;69: 193-205.
6. Sjoested A. Genus I. *Francisella*. In: George MG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2, 2005: 200-9.
7. Corbel MJ. Recent advances in brucellosis. *J Med Microbiol*, 1997; 46(2): 101-3.
8. Stanfield CA, Taylor PW, Morgan HR. Some important antigenic relationships in the serological diagnosis of brucellosis. *Am J Clin Pathol*, 1952; 22: 211-7.
9. Behan KA, Klein GC. Reduction of *Brucella* species and *Francisella tularensis* cross-reacting agglutinins by dithiothreitol. *J Clin Microbiol*, 1982; 16(4): 756-7.
10. Saslaw S, Carlisle HN. Studies with tularemia vaccines in volunteers. IV. *Brucella agglutinins* in vaccinated and non-vaccinated volunteers challenged with *Pasteurella tularensis*. *Am J Med Sci*, 1961; 242: 166-72.
11. Hornick RB. Tularemia. In: Evans AS, Brachman PS, eds. *Bacterial Infections of Humans- Epidemiology and Control*. New York. Plenum Medical Book Company, 1998: 823-37.
12. WHO guidelines on *Tularaemia*. Geneva: WHO Press, 2007.
13. Koskela P, Salminen A. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. *J Clin Microbiol*, 1985; 22(6): 973-9.
14. Lindquist D, Chu MC, Probert WS. *Francisella* and *Brucella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Washington. American Society for Microbiology Press, 2007: 815-34.
15. Tarnvik A, Berglund L. *Tularaemia*. *Eur Respir J*. 2003; 21: 361-73.
16. Ulu Kılıç A, Kılıç S, Şencan I et al. İç Anadolu Bölgesinde *Francisella tularensis* alt tür *halorctica*'ya bağlı su kaynaklı bir Tularemi salgını. *Mikrobiyol Bul*, 2011; 45 (2): 234-47.
17. Marrodan T, Nenova-Poliakova R, Rubio M, Ariza J, Clavijo E, Smits HL, Diaz R. Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *J Med Microbiol*, 2001; 50: 663-6.
18. Ericsson M, Sandstrom G, Sjoestedt A, Tarnvik A. Persistence of cell-mediated immunity and decline of humoral immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. *J Infect Dis*, 1994; 170: 110-4.
19. Kirimanjeswara GS, Olmos S, Bakshi CS, Metzger DW. Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunol Rev*, 2008; 225: 244-55.
20. Bulaşıcı hastalıkların ihbarı ve bildirim sistemi. Standart tanı, süreyans ve laboratuvar rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı, 2004, Ankara.