



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Mr Marina M. Đorđević - Spasić

**IMUNODIJAGNOSTIČKE I MOLEKULARNE
METODE U PROCENI EFIKASNOSTI TERAPIJE
OBOLELIH OD TULAREMIJE**

- doktorska disertacija -

Niš, 2014.



UNIVERSITY OF NIS
FACULTY OF MEDICINE



Mr Marina M. Đorđević - Spasić

**IMMUNODIAGNOSTIC AND MOLECULAR METHODS
IN EVALUATION OF THE THERAPY EFFICIENCY
ON PATIENTS SUFFERING FROM TULAREMIA**

- doctoral dissertation -

Nis, 2014.

KOMISIJA ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Miodrag Vrbić, predsednik

Prof. dr Velimir Kostić, mentor i član

Prof. dr Marina Dinić, član

Prof. dr Žaklina Mijović, član

Prof. dr Branislav Lako, član

Doktorska disertacija odbranjena:

Datum: _____

*Rad posvećujem svojim roditeljima i svojoj porodici
za neizmernu ljubav, podršku i razumevanje.*

I Autor

Ime i prezime	Marina M. Đorđević - Spasić
Datum i mesto rođenja	09.03.1974. godine, Niš
Sadašnje zaposlenje	specijalista infektologije, Klinika za zarazne bolesti, Klinički centar Niš, klinički asistent, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

II Doktorska disertacija

Naslov	Imunodijagnostičke i molekularne metode u proceni efiksanosti terapije obolelih od tularemije
Naučna oblast	Medicina
Uža naučna oblast	Infektologija
Ustanova i mesto gde je disertacija rađena	Klinika za zarazne bolesti KC u Nišu Institut Friedrich-Loeffler, Jena, Nemačka, Laboratorija Neolab u Nišu, Institut za patologiju KC u Nišu
Mentor	Prof. dr Velimir T. Kostić

III Ocena i odbrana

Datum prijave teme doktorske disertacije	18.02.2010. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije	
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata:	1. Prof. dr Milijanka Krstić, predsednik 2. Prof. dr Velimir Kostić, mentor i član 3. Prof. dr Marina Dinić, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:	1. Prof. dr Miodrag Vrbić, predsednik 2. Prof. dr Velimir Kostić, mentor i član 3. Prof. dr Marina Dinić, član 4. Prof. dr Žaklina Mijović, član 5. Prof. dr Branislav Lako, član sa Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu
Datum odbrane	

Naučni doprinos disertacije:

Prvi put je primenjena kompletna i komparativna klinička, mikrobiološka, patohistološka i molekularna dijagnostika tularemije. Istovremeno je korišćeno više seroloških testova kao i imunohistohemijska i PCR metoda u potvrdi kliničke dijagnoze tularemije. Bolesnici su klinički i serološki praćeni u dužem vremenskom periodu (11 godina). Procenjene su najbolje karakteristike testa i izabran je najbolji test za potvrdnu dijagnostiku tularemije i serološko praćenje nivoa antitela. Takođe, rezultati testova prethodnog istraživanja, u magistarskoj tezi, su komparirani sa rezultatima testova sadašnjeg istraživanja. Potvrđena je dobra senzitivnost i specifičnost prethodno rađenog mikroaglutinacionog testa. Rezultati navedenih testova se ne mogu tumačiti izolovano i nezavisno od kliničkog nalaza. Praktičan značaj je u postavljanju retrogradne dijagnoze prethodno nedijagnostikovane, a klinički suspektne tularemije ili patohistološke dijagnoze granulomatoznog limfadenitisa

1. **Djordjevic-Spasic M**, Potkonjak A, Kostic V, Lako B, Spasic Z. Oropharyngeal tularemia in father and son after consumption of under-cooked rabbit meat. Scand J Infect Dis. 2011; 43(11-12): 977-81. (M23, IF=1,722, Sci, Scie)

2. **Djordjevic-Spasic M**, Potkonjak A, Nozic D, Pavlovic M, Canak G, Doder R, Stevancevic O, Lako B. The first case report of serologically confirmed cat scratch disease of a boy in Serbia. *Healthmed* 2011; 5(6): 2121-25. (M23, IF=0,435, Scie)
3. **Đorđević-Spašić M**, Kostić V, Krstić M, Lako B. Therapy approach and problems in treatment of tularemic patients in Serbia. Proceedings of the Sixth International Conference on Tularemia; 2009 Sept 13-16; Berlin, Germany. Poster presentation (M34)
4. **Djordjevic M**, Kostic V, Lako B, Ristanovic E. Epidemiological situation and clinical manifestations of human tularemia in the southeastern Serbia in 2003. Proceedings of the Fourth International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. Abstract book, p.P40. (M34)
5. **Djordjevic M**, Lako B, Ristanovic E. Diagnostic dilemma of tularemia. Case report. Proceedings of the Fourth International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. Abstract book, p.P54. (M34)
6. **Djordjevic M**, Krstic M. Ulceroglandular form of tularemia. Case report. Proceedings of the Fourth International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. Abstract book, p.P 36.(M34)
7. **Djordjevic M**, Rankovic Z. Therapy problems in a patient with tularemia and IgA nephropathy. Proceedings of 5th European Congress of Chemotherapy and Infection; 2003 Oct 17-20; Rhodes, Greece. Abstract book, p.87. (M34)
8. **Djordjevic M**, Garbino J, Uckay I, Garzoni C, Kostic V, Lako B, Tasic D. An abrupt onset of tularemia among children from Kosovo. Proceedings of the 15th ECCMID; 2005 Apr 2-4; Copenhagen, Denmark. *Clin Microb Inf* 2005; 11 Suppl 2. p 399. (M34)
9. **Djordjevic M**, Garbino J, Uckay I, Kostic V, Tasic D. Pathohistological examinations of lymph nodes tularemia caused by *Francisella tularensis* biovar *polarctica*. Proceedings of the 45th ICAAC Annual Meeting; 2005 Dec 16-19; Washington DC, USA. Abstract book. p 138.(M34)
10. Kostić V, Krstić M, **Đorđević M**, Veličković Z. Tularemia as an actual problem. Proceedings of the 3rd Congress of Infectologists of Bosnia and Herzegovina with International Participation; 2006 Nov 02-05; Banja Luka, Bosna i Hercegovina. Abstract book, p 5. (M34)
11. Velickovic Z, Kostic V, Spasic M, Kocic B, **Djordjevic M**. Clinical and laboratory characteristics of tularemia. Proceedings of the 3rd Macedonian Congress of Preventive Medicine-with International Participation; 2006 Oct 04-07; Ohrid, Republic of Macedonia. Abstract book, p.84.(M34).
12. **Đorđević M**, Krstić M, Lako B, Petrović M, Đukić B. Prikaz retke forme bruceloze. *Acta Medica Medianae* 2004; 43(2): 69-72. (M52).

IMUNODIJAGNOSTIČKE I MOLEKULARNE METODE U PROCENI EFIKASNOSTI TERAPIJE OBOLELIH OD TULAREMIJE

Rezime

Uvod: Tularemija je ozbiljna bakterijska zoonoza uzrokovana visoko infektivnim agensom *Francisella tularensis*. Mikrobiološka dijagnoza tularemije se uglavnom zasniva na serologiji. U poslednjoj deceniji učinjeni su veliki napori za razvojem senzitivnijih i specifičnijih imunoloških i molekularnih metoda za laboratorijsku dijagnozu tularemije. Pojava epidemije tularemije na jugoistoku Srbije 1998/1999. godine pokrenula je kako epidemiološka, tako i i klinička i mikrobiološka istraživanja u ovoj oblasti. To je bio podsticaj za primenu i unapređenje imunodijagnostičkih testova a istovremeno i pravi izazov za kliničare, u borbi protiv izazivača tularemije, bakterije *F. tularensis*.

Cilj:

1. Utvrđivanje korelacije između rezultata ispitivanja imunodijagnostičkim, histološkim imunohistohemijskim i molekularnim metodama, kao i određivanje značaja navedenih testova u dijagnostici i proveri uspeha terapije obolelih od tularemije
2. Praćenje i određivanje serološkog statusa obolelih od tularemije u periodu od 1 do 11 godina od početka obolevanja.
3. Procena efikasnosti primenjene antibiotske terapije kod obolelih od tularemije.

Metode: Ispitivanjem je obuhvaćena grupa od 113 bolesnika obolelih od tularemije u periodu od početka 1999. do kraja 2011. Kontrolnu grupu je činilo 111 ispitanika sa limfadenopatijama različite geneze, 20 seropozitivnih pacijenata obolelih od bruceloze, 30 seropozitivnih bolesnika obolelih od jersinooze, 20 dobrovoljnih davalaca krvi i 10 seronegativnih bolesnika na brucelu.

Prilikom dijagnostičke obrade bolesnika korišćen je sledeći materijal: serum i bioplat limfnog čvora. Ukupno je ispitano 270 uzoraka seruma, od toga 189 seruma suspektnih na tularemiju i 111 seruma iz kontrolne grupe, kao i 26 bioplat limfnih nodusa.

U istraživanju je korišćeno ukupno 8 dijagnostičkih metoda na pomenutom materijalu, od toga 6 seroloških, imunohistohemijska metoda indirektno imunoperoksidaze (IIP) i molekularna metoda (PCR). Serološke metode obuhvatile su imunoenzimske testove: Serion ELISA IgG i IgM, Serazym ELISA i ELISA in house; imunohromatografski test (ICT) i Western-blot. Na patohistološkom materijalu rađena je indirektna imunoperoksidaza (IIP) sa primenom primarnih monoklonskih antitela na *F. tularensis*, a od molekularnih metoda rađen je PCR.

Rezultati: Serumi praćenih bolesnika u intervalu od 1 do 11 godina od početka bolesti pokazali su pozitivan nalaz antitela IgG, IgM klase i ukupnih antitela na *F.tularensis* većinom ispitivanih testova. Analizom rezultata dobijenih korišćenim testovima utvrđeno da većina testova pokazuje visoku senzitivnost i specifičnost i međusobno daju slične rezultate. IgG Serion test je pokazao najveću osetljivost (97,4%) i specifičnost (93,1%). Imunohistohemijska metoda indirektno imunoperoksidaze (IIP) je pokazala najveću specifičnost (100%) ali slabu senzitivnost (65%). Komplikacije je imalo čak 43,4% bolesnika sa najvećom zastupljenošću apscedirajućeg limfadenitisa i recidiva bolesti. Čak dve trećine

komplikacija su se javile nakon kasnog započinjanja adekvatnog lečenja, 3 nedelje od početka bolesti. Najveći procenat izlečenja i najmanje komplikacija imala je primena gentamicina (83,3%), potom ciprofloksacina (75%) i sukcesivne terapije gentamicinom i doksicilinom (70,0%). Najveći terapijski neuspeh zabeležen je primenom amikacina sa longacefom koji se povezuje sa apscedirajućim limfadenitisom kod sve lečene dece.

Zaključak: Primenom imunodijagnostičkih testova potvrđena je stara infekcija *F.tularensis* i retrogradno postavljena dijagnoza kod prethodno nedijagnostikovane ili serološki nepotvrđene tularemije. Serološki nalaz se mora tumačiti jedino u sklopu kliničke dijagnoze tularemije. Nalaz antitela IgM i IgG klase ili ukupnih antitela na *F.tularensis* u serumima pacijenata bez kliničkih manifestacija bolesti, i posle više godina od početka infekcije, nije pokazatelj akutne već preležane bolesti. Test sa najboljom senzitivnošću i specifičnošću je IgG Virion ELISA te se predlaže se kao siguran i pouzdan test za dijagnostiku i praćenje obolelih od tularemije. Imunohistohemijska metoda IIP se može koristiti u potvrđnoj dijagnostici tularemije zbog najveće specifičnosti. PCR metoda nije metoda izbora za dijagnozu tularemije na biopsijskim uzorcima tkiva ukalupljenim u parafin. Terapijski uspeh se ogledao u izlečenju kod 96,5% bolesnika praćenih u periodu od 1 do 11 godina, osim perzistentne limfadenopatije kod 4 bolesnika (3,5%). Nije bilo uticaja terapije na rezultate seroloških analiza obolelih.

Ključne reči: *Francisella tularensis*, dijagnoza, ELISA, Western-blot, imunohistohemija, PCR, terapija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Infektologija

UDK broj: 616-01.7

IMMUNODIAGNOSTIC AND MOLECULAR METHODS IN EVALUATION OF THE THERAPY EFFICIENCY ON PATIENTS SUFFERING FROM TULAREMIA

Summary

Introduction: Tularaemia is a severe bacterial zoonosis caused by the highly infectious agent *Francisella tularensis*. Microbiological diagnosis of tularemia mainly relies on serology. Within the last decade great efforts have been made to develop more sensitive and specific immunological and molecular techniques for the laboratory diagnosis of tularemia. Occurrence of tularemia epidemic in the Southeast of Serbia in 1998/1999. initiated epidemiological as well as microbiological and clinical research in this area. That was the motive to start applying and improving immunodiagnostic tests, and a real challenge for the clinicians to fight the infectious agents, bacteria *F. tularensis*.

Objective:

1. Determination of the correlation between the test results done by immunodignostic, histological, immunohistochemic and molecular methods; assesment of significance of the noted tests in diagnosis and the efficiency assesment in therapy of tularemia patients.
2. Monitoring and evaluation of the serological antibody finding of tularemia patients within the period from 1 to 11 years since the beginning of the disease.
3. Assesment of efficiency of the applied antibiotic therapy on patients suffering from tularemia.

Methods: Testing was performed on a group of 113 patients suffering from tularemia in a period starting in 1999.until the end of 2011. Control group included 111 examinees, out of which 31 patient with differential diagnosis of lymphadenopathy of different origin, 20 seropositive brucella patients, 10 seronegative brucella patients, 30 seropositive yersinia patients and 20 voluntary blood donors.

During the diagnostic processing of patients, following materials were used: serum and biopstat of lymph node. Total of 270 serum samples were examined, out of which 189 serums suspicious of tularemia, 111 serums from the control groupe and 26 lymph node biopstats.

There were 8 diagnostic techniques used on the material mentioned, out of which 6 serological, imunohistochemical method of indirect immunoperoxidase (IIP) and molecular method (PCR). Serological methods included immunoensyme assays: Serion ELISA IgG i IgM, Serazym ELISA and ELISA in house; imunohromatografic test (ICT) and Western-blot. On patohistological material ,(IIP) was done with the use of primary monoclonal antibodies on *F. tularensis*, and the molecular method done, was PCR.

Results: Serums of the patients monitored in the interval of 1 to 11 years starting with the occurrence of the disease, indicated positive finding of IgG, IgM class antibodies, as well as total antibodies on *F. tularensis*, in most of the tests. Analysis of the results obtained in the used tests, confirmed that most of the tests indicate high sensitivity, specificity and mutually similar results. IgG Serion test showed the highest sensitivity (97,4%) and specificity(93,1%). IHH method of the indirect imunoperoxidase (IIP) proved the highest specificity (100%), but low sensitivity (65%). Complications were noticed in 43,4% patients mostly with supplicative lymphadenitis and recidivism of the disease. Two thirds of the complications occurred after late onset of appropriate treatment, 3 weeks after the beginning of illness. The highest

percentage of healing and the least complications were noted with the use of gentamycin (83,3%), then ciprofloxacin (75%) and finally, in the successive therapy with gentamycin and doxycycline (70,0%). The biggest failure in children patients was noted in the use of amikacin with cephtriaxon which is related to occurrence of suppurrative lymphadenitis in all treated children..

Conclusion: The use of immunodiagnostic tests confirmed the old *F.tularensis* infection and established retrograde diagnosis on previously undiagnosed or serologically unconfirmed tularemia. Serological finding must be interpreted only within clinical diagnosis of tularemia. Finding of IgM and IgG class antibodies or total antibodies on *F.tularensis* in serums of the patients without clinical manifestations of the disease, even many years after the beginning of the infection, does not indicate acute illness, but the cured illness, which once existed. Test which proved highest sensitivity and specificity is IgG Virion ELISA, therefore it is suggested as the most reliable method for diagnosis and monitoring of tularemia patients. Immunohistochemical method IIP can be used in confirmative diagnosis of tularemia due to its highest specificity. PCR method is not a method of choice izbora for diagnosis of tularemia on byopsy samples of the tissue mouldedin parafin. The success of therapy was proved in healing of all patients monitored within the period from 1 to 11 years (96.5% of the patients) except for persistent lymphadentopathy in 4 patients (3.5%). There was no influence of the therapy on serological analysis of the patients.

Key words: *Francisella tularensis*, diagnosis, ELISA, Western-blot immunohistochemistry (IHH), PCR, therapy

Scientific field: Medicine

Area of expertise: Infectology

UDK number: 616-01.7

Spisak skraćenica

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (antitelo zavisna celularna citotoksičnost)
AEC	3-amino-9-etilcarbazol (hromogen)
ALT	Alanin-aminotransferaza
AST	Aspartat-aminotransferaza
BAB	Brzi aglutinacioni test
CDC	Centar za kontrolu i preve bolesti
CRP	C-reaktivni protein
CV	Koeficijent varijacije
DDg	Diferencijalna dijagnoza
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay (imunoenzimski test)
FITC	Fikoizotijocijanat
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
HSP	Heat shock proteins (proteini toplotnog šoka)
ICT	Imunohromatografski test
IFT	Imunofluorescentni test
IHC	Imunohistohemija
IIFT	Indirektni imunofluorescentni test
IIP	Indirektni test imunoperoksidaze
Ig	Imunoglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
In-house ELISA	Sopstveno pripremljena i standardizovana ELISA
HPR	Horseredish (<i>Armoracia rusticana</i> , lat, biljka)

Lp	Lažno negativen
Ln	Lažno pozitiven
LPS	Lipopolisaharid ćelijske membrane
LVS	Live vaccine strain (živa, atenuisana tularemićna vakcina)
MAT	Mikroaglutinacioni test
MHC	Glavni kompleks histokompatibilnosti
NO	Azot monoksid
PAS	Periodic acid-Schiff (stain) Perjodna kiselina- Schiff (bojenje)
PPD	Purified protein derivative (Mantoux tuberkulinski kožni test)
SE	Sedimentacija eritrocita
SD	Standardna devijacija
Sn	Stvarno negativen
Sp	Stvarno pozitiven
Spp	Species, vrsta
SZO	Svetska Zdravstvena Organizacija
TLR	Tool-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
WB	Western blot

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Definicija i terminologija	2
1.2. Istorijat	2
1.3. Uzročnik	3
1.3.1. Taksonomija	3
1.3.2. <i>Francisella tularensis</i>	4
1.4. Epidemiologija	5
1.4.1. Izvor zaraze	5
1.4.2. Putevi prenošenja uzročnika	6
1.4.3. Raširenost u svetu	8
1.5. Patogeneza	9
1.6. Imunski odgovor na <i>F. tularensis</i>	11
1.6.1. Celularni imunski odgovor	11
1.6.2. Humoralni imunski odgovor	13
1.7. Kliničke manifestacije	15
1.7.1. Klinički oblici	15
1.7.2. Komplikacije tularemije	18
1.7.3. Diferencijalna dijagnoza	18
1.8. Dijagnostika tularemije	19
1.8.1. Laboratorijska i mikrobiološka dijagnostika	19
1.8.2. Imunodijagnostika tularemije	20
1.8.3. Molekularne metode	23
1.8.4. Patohistološka dijagnostika i imunohistohemija	24
1.9. Terapija	25
1.10. <i>F. tularensis</i> kao biološki agens	28
1.11. Prevencija	29
1.11.1. Vakcine	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
2.1. Naučno-radna hipoteza	30
2.2. Ciljevi istraživanja	30
3. METODOLOGIJA RADA	31
3.1. Bolesnici i materijal	31
3.2. Metode	31
3.2.1. Serološki- imunodijagnostički testovi:	31
3.2.2. Imunohistohemijske metode:	33
3.2.4. Mesto istraživanja	34
3.2.5. Statistička obrada podataka	34
4. REZULTATI	36
4.1. Epidemiološke karakteristike tularemije	36
4.2. Kliničke karakteristike	39
4.3. Imunodijagnostika tularemije	46
4.3.1. Komparacija rezultata prethodnog testiranja seruma pacijenata MAT i ELISA testom u odnosu na rezultate dobijene ostalim imunodijagnostičkim testovima	46
4.3.2. Karakteristike ispitivanih imunodijagnostičkih testova	50
4.4. Terapija i ishod bolesti	65
5. DISKUSIJA	75
5. 1. Epidemiološke karakteristike tularemije	75

5. 2. Kliničke karakteristike	78
5. 3. Dijagnostička ispitivanja.....	82
5.3.1. Mikrobiološka dijagnostika	82
5.3.2. Imunohistohemijska ispitivanja	88
5.3.3. Molekularna dijagnostika.....	90
5. 4. Terapijski pristup	91
6. ZAKLJUČAK	97
7. LITERATURA	98
8.PRILOG	115
8.1. Kliničke manifestacije kod tularemije	115
8.2. Patohistološka dijagnostika.....	118
8.3. Imunohistohemijska dijagnostika	120

1. UVOD

Francisella tularensis je prepoznata kao humani patogen već sto godina i etiološki je uzročnik bakterijske zoonoze, tularemije. Izveštaji o bolesti koja jako podseća na tularemiju, prethodili su prvom autentičnom izveštaju iz 1911, koji je objavio McCoy.

Prvi opisi bolesti datiraju još iz 1653. iz Norveške, gde je opisana bolest leminga slična tularemiji. Kasnije se u Japanu 1818. opisuje Yato-byo („zečja bolest“), a u Rusiji 1877. godine „čumoliki adeniti“, „epidemični limfadeniti“ i „epidemični poliadeniti“. U Norveškoj su 1890. ponovo objavljeni slučajevi bolesti groznice leminga. Prvi opisani slučajevi bolesti u SAD-u potiču iz 1908. godine iz države Utah. Prvi potvrđen slučaj humane tularemije se desio u Ohaju 1914. godine.

Izolacija *F. tularensis* se prijavljuje u mnogim zemljama severne hemisfere, ali to je još uvek redak patogen u većini zemalja. Postoji velika verovatnoća da će kao rezultat promena u biocenozi, tularemija nestati iz pojedinih područja sveta ali se i pojavljivati u drugim. Na ovakvu mogućnost već je ukazao Parker 1934. godine, izjavom: „Ne poznajem ni jednu infektivnu bolest životinja koja se prenosi na čoveka, sa tako brojnih i različitih izvora zaraze“.

Neregularne pojave epidemija tularemije i visoka kontagioznost patogena rezultovale su ograničenim iskustvom i interesovanjem za *F. tularensis* u većini kliničkih laboratorija, kao i oskudnim znanjem njenih patogenih osobina. Do 2001, mali broj istraživača je aktivno radio na patogenu i nedostatak genetskih oruđa je ozbiljno ograničio istraživanja njegovih virulentnih mehanizama. Epidemije tularemije, tokom poslednje decenije u Turskoj, Španiji, na Skandinavskom i Balkanskom poluostrvu ponovo su probudile interesovanje javnosti za ovu bolest. To je dovelo do veoma značajnog povećanja broja istraživača *F. tularensis*, kao rezultat masivnog povećanja finansiranja istraživanja koje sprovodi Biološka odbrana, naročito u SAD-u od 2001. godine.

Mnogo godina, *F. tularensis* se smatra kao potencijalno biološko oružje i 1940-tih i 1950-tih, je bila jedan od agenasa kome je dat najveći prioritet u odbrambenim programima u SAD-u i bivšim zemljama Sovjetskog Saveza, a u kasnim 1960-tim nagomilane su zalihe u vojsci SAD-a. Prema CDC, to je jedan od 6 agenasa označenih kao kategorija A izabranih agenasa, tj. agenasa sa najverovatnijom biološkom pretnjom. U prilog tome govori i činjenica da je visoko kontagiozan za laboratorijske radnike.

Pojava epidemije tularemije na jugoistoku Srbije 1998/1999. godine pokrenula je kako epidemiološka, tako i mikrobiološka i klinička istraživanja u oblasti tularemije u našoj zemlji. To je bio podsticaj za primenu i unapređenje imunodijagnostičkih testova u našoj zemlji, a istovremeno i pravi izazov za kliničare, u borbi protiv izazivača tularemije, bakterije *Francisellae tularensis*.

1.1. Definicija i terminologija

Tularemija (*Tularaemia*, lat.) je akutna, febrilna, fakultativno transmisivna zooantroponoza, prirodnožarišnog tipa, koju karakteriše tipično oboljenje limfnih čvorova i veliki broj puteva prenošenja uzročnika. Širom sveta upotrebljavaju se različiti nazivi za ovu bolest: *zečja groznica*, *glodarska kuga*, *Francisova bolest*, *Oharina bolest*, *epidemični limfadenitis*, *epidemični poliadenitis* (1, 2).

1.2. Istorijat

Saznanja o tularemiji uglavnom predstavljaju plod dostignuća američkih autora, uključujući izolaciju uzročnika, nalaženje veze između uzročnika i oboljevanja kod ljudi kao i razjašnjenje njene histopatologije i epidemiologije.

„Bubo (lat. inflamiran i otečen limfni čvor; guka, kvrga, naraslina) je obično veličine graška, a njena žlezdana struktura je zamenjena čvrstim kazeoznim masama“. Ovaj prvi opis tularemije objavljen je u radu pod nazivom "A Plague-like Disease of Rodents" („Oboljenje glodara slično kugi“), 1911. godine od strane George McCoy-a, patologa iz Kalifornije. Po preporukama Edwarda Francisa, etiološki agens imenovan je kao *Bacterium tularense*, po pokrajini Tulare, u državi Kalifornija, gde je bolest imala endemski karakter i bila raširena među glodarima. Prvi slučajevi tularemije kod ljudi opisani su od strane Wherry i Lamb-a 1914. godine. Tokom sledeće decenije, opisuje se slična bolest pod različitim imenima u različitim regionima u SAD-u. Npr, Francis je 1919. objavio rad pod naslovom „Jelenska groznica-bolest čoveka do sada nepoznate etiologije“. Isti autor objavljuje iscrpni članak 1921. godine u kome ukazuje da se bolest prenosi sa glodara na čoveka putem insekata koji sišu krv. Štaviše, on predlaže novi naziv ovoj bolesti „tularemija“ koji je i prihvaćen u međunarodnoj nomenklaturi naziva bolesti. Francis je izolovao *Bacterium tularense* iz krvi nekoliko teških bolesnika. Nakon toga, razvio je dijagnostičke serološke metode i metode zasnovane na kulturama i opisao slučajeve tularemije kod ljudi stečene u laboratoriji, identifikujući tako organizam kao laboratorijski rizični agens. U čast na pionirski rad E. Francisa, bakterija je u današnje vreme poznata kao *Francisella tularensis* (3).

Tokom intenzivnog perioda istraživanja od strane Francisa, 1925-te godine, Hachiro Ohara je opisao bolest u Japanu, sa kliničkom slikom sličnom tularemiji. Njegova supruga pristala je da bude dobrovoljac u eksperimentu, dozvolivši mu da na dorzalnu površinu njene leve ruke utrlja inficirano tkivo zeca nakon čega je dobila temperaturu i limfadenopatiju, a nakon biopsije limfnog čvora, izolovan je uzročnik koji je kasnije identifikovan kao *F. tularensis* (4).

Tokom 1930-tih godina, započeta su istraživanja vakcine protiv tularemije. Otkriveno je da preparati sa umravljenom *F. tularensis* indukuju samo marginalnu zaštitu od infekcija virulentnim sojevima. Ipak, u Sovjetskom Savezu, su Gaiskii i Elbert uspešno atenuisali prirodni izolat *F. tularensis* i napravili bezbednu i efikasnu vakcinu koja se tokom 1946. godine koristila za masovnu vakcinaciju (4).

Tokom 1956. godine, vakcine sa živom bakterijom prenešene su iz Moskve, u Institut za medicinska istraživanja infektivnih bolesti, armije SAD u Merilendu. Nakon ispitivanja na laboratorijskim životinjama, izabrana je jedna od dve varijante bakterijskih kolonija,

napravljena vakcina i testirana u pogledu bezbednosti i efikasnosti na ljudima. Ovi sojevi su nazvani *Live Vaccine Strain* (LVS) i korišćeni su za vakcinaciju laboratorijskog osoblja pod povećanim rizikom od infekcije. Nakon uvođenja LVS, 1960. godine, incidencija respiratornog oblika tularemije je pala sa 5,7 na 0,27 slučaja/1000 među zaposlenim osobama pod rizikom. Indicencija ulceroglandularnog oblika bolesti ostala je nepromenjena, iako su simptomi i znaci bolesti bili manje izraženi (4). Nažalost, ova vakcina danas više nije dostupna, a njena budućnost je neizvesna (5).

1.3. Uzročnik

1.3.1. Taksonomija

Od 1970. godine ruski istraživači Olsufjev i sar. uvode termine *F. tularensis nearctica* za *F. tularensis tularensis* i *F. tularensis holarctica* za *F. tularensis palaeartica*. Godine 1995. menja se taksonomija roda *Francisella* tako da se danas svi poznati predstavnici ovog roda svrstavaju u dve vrste (1):

1. *F. tularensis* sa sledećim podvrstama: *F. tularensis subsp. tularensis* (*F. tularensis* tip A ili *F. neoartica*), *F. tularensis holarctica* (*F. tularensis* tip B ili *F. tularensis subsp. palaeartica*), *F. tularensis mediaasiatica* i *F. tularensis subsp. novicida* (ranije *F. novicida*).
2. *F. philomiragia* (ranije *Yersinia philomiragia*).

Osim toga, molekularne metode su identifikovale različite genotipove *F. tularensis* podvrste *tularensis* koje se razlikuju u njihovoj geografskoj lokaciji i virulenciji (6).

F. tularensis obuhvata dve dominantne podvrste: *F. tularensis subsp. tularensis* (Jellison tip A) i *F. tularensis subsp. holarctica* (Jellison tip B). Početne osnove za diferencijaciju ovih tipova bile su njihove biohemijske odlike, epizootologija i analize virulentnosti kod zečeva. Mnogo kasnije, ustanovljene su suptilnije razlike u redosledu njihovih nukleinskih kiselina (7).

1. *F. tularensis* tipa A je izolovana u severnoj Americi i predstavlja glavnu podvrstu na ovom kontinentu. Jako je virulentna i patogena za mnoge domaćine. Infektivna doza za ljude je ekstremno niska i iznosi 10 bakterija - ako se unesu subkutano, odnosno 25 bakterija - ako se unesu aerosolom. Pre otkrića antibiotika, mortalitet kod ljudi je iznosio od 5 -10%. Uglavnom se prenosi krpeljima od zečeva na ljude, ali i direktnim kontaktom sa zaraženom životinjom. Ipak, humana transmisija se praktično ne događa.
2. *F. tularensis* tipa B je *mnogo* rasprostranjenija na severnoj hemisferi i predstavlja jedinu podvrstu izolovanu u zemljama Evrope. Manje je virulentna, nije letalna za ljude, uzrokuje umereniju bolest kod ljudi i životinja. Udružena je sa glodarima i zečevima, a na čoveka se prenosi direktnim kontaktom sa zaraženim životinjama, ekspozicijom kontaminiranim vazduhom, unošenjem kontaminirane hrane i vode ili ujedom insekata iz roda zglavkara.

Prvi izolati *F. tularensis tularensis* pronađeni su u Evropi 1996. godine u blizini Bratislave u Slovačkoj. Ovaj nalaz može da bude vrlo značajan sa epidemiološkog i epizootološkog stanovišta, jer se do tada smatralo da je tip A *F. tularensis* rasprostranjen samo u S. Americi (8).

1.3.2. *Francisella tularensis*

F. tularensis je slabo bojiva, striktno aerobna, Gram negativna bakterija, kratko-štapicaštog ili okruglog oblika, asporogena i nepokretna. U pogledu nutritivnih zahteva *F. tularensis* spada u probirljive mikroorganizme. Za svoj rast zahteva prisusutvo cisteina ili cistina na pogodnim čvrstim podlogama, kao što je cistinski krvavi agar oplemenjen sa 1% hemoglobinom, gde unutar 2 - 4 dana od inkubacije stvara jasno izražene konveksne sivo-bele opalescentne kolonije. Loše se boji po Gramu a bolje po Gimzi. Deli se pupljenjem i binarnom deobom a optimalni rast postiže na 37 C⁰ (9).

F. tularensis produkuje kiselinu, ali ne i gas zbog ograničene količine ugljenohidrata i korišćenjem konvencionalnih dijagnostičkih kitova nije je moguće lako diferencirati od drugih Gram-negativnih bakterija. Karakteriše se jedinstvenim sastavom dugolančanih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, što se može identifikovati gas-likvidnom hromatografijom. Za brzu i jednostavnu identifikaciju kolonija koristi se test aglutinacije suspendovanih bakterija specifičnim antiserumom. Zahvaljujući razvitku molekularnih metoda, danas se za brzu i konačnu potvrdu bakterijskih izolata koriste analize zasnovane na PCR tehnici (4).

Virulentni sojevi sadrže kapsulu (0,02 - 0,04 µm). Gubitak kapsule skopčan je sa gubitkom virulencije, dok to ne utiče na vijabilitet. Sojevi *F. tularensis* bez kapsule su avirulentni i ne produkuju imunogeni efekat u senzitivnih laboratorijskih životinja.

Za virulentne sojeve *F. tularensis* specifičan je i tzv. C antigen ćelijskog omotača. On je glikolipidne prirode i nalazi se u *Francisella* i *Brucella spp.* LPS je faktor virulencije (10). Poznavanje antigenske građe *F. tularensis* je neophodno za detekciju infekcije, kao i identifikaciju infektivnog agensa ili nevijabilnih imunogenih supstanci.

Spoljašnja membrana *F. tularensis* sadrži 12-20% proteina, 15-30% ugljenih hidrata i više od 40% lipida. Ova membrana je snažan imunogen. Njena struktura je povezana sa nivoom virulencije i imunogenosti (11). Kompleks LPS sa proteinima (15, 17, 19 kDa) koji je izolovan iz spoljne membrane predstavlja glavni protektivni antigen. Ovaj protein prepoznaju ne samo T ćelije (potentni je stimulator ovih ćelija), već i serumska antitela *F. tularensis* stimulisanih jedinki (12). Antigenske frakcije spoljašnje membrane *F. tularensis* ispoljavaju snažne imunomodulatorne efekte na aktivaciju T limfocita. Možda u ovoj heterogenosti i specifičnosti antigena treba tražiti objašnjenje za dugotrajnu perzistenciju specifičnog imunog odgovora na *F. tularensis* (13, 14).

Virulencija *F. tularensis* je povezana sa nekoliko fenotipskih karakteristika uključujući formiranje kapsule, LPS, pili i produkciju kiselih fosfataza i siderofora (15, 16). Osim toga, naknadne genomske studije su identifikovale specifičnu genetsku povezanost sa virulencijom, uključujući grupu gena poznatu kao *Francisella*-patogeno ostrvo (FPI) (16). Mnogi od ovih FPI gena su uključeni u virulenciju životinja i intracelularno preživljavanje i indukovani su intracelularnim rastom organizma. FPI geni su pod uticajem regulacije transkripcije, uključujući faktore okoline, kao što su izlaganje gvožđu i vodonik-peroksidu.

Na bazi istraživanja genoma, utvrđeno je da *F. tularensis* ne produkuje klasične virulentne faktore, kao što su endotoksini. Umesto toga, virulencija *F. tularensis* potiče iz njene sposobnosti da proliferiše u velikom broju unutar različitih tkiva i organa domaćina,

prekidajući njihovu normalnu funkciju i indukujući značajan imuni odgovor domaćina koji sam po sebi izgleda doprinosi bolesti (17).

LPS *F. tularensis* je jedinstven u tome što se ne vezuje za molekule kao što su LPS-vezujući proteini i TLR-4 da bi pokrenula proinflamatorni odgovor (18), niti se vezuje za TLR-2 (19). Lipid A *F. novicida* i *F. tularensis* sadrži neke neobične modifikacije i pretpostavlja se da *Francisella* možda poseduje novi sistem LPS remodelirajućih enzima. Struktura O antigena je određena za *F. tularensis* subspecies *tularensis* i *holarctica* i *F. novicida* (20). O antigen obe podvrste *F. tularensis* je bio identičan ali za *F. novicida* je bio strukturalno različit. Strukturalne razlike izgleda da rezultuju u imunološkim razlikama pošto LPS ne indukuje ukrštenu zaštitu među vrstama. (21). Mutanti *F. tularensis* i *F. novicida* ne mogu da sintetišu O antigen, te su oslabljeni (21), ali O antigen izgleda da ima različitu ulogu u obe vrste. O antigen *F. tularensis* izgleda da je važan za intracelularno preživljavanje, dok je O antigen *F. novicida* izgleda kritičan za serumsku rezistenciju i manje važan za intracelularno preživljavanje (21).

1.4. Epidemiologija

Tokom prve decenije nakon otkrića prikupljene su obimne informacije o ovoj bolesti. Uprkos sveopštem saznanju, nije bilo jedinstvenog opisa životnog ciklusa *F. tularensis*. Postalo je jasno da je razumevanje epidemiologije tularemije znatnije teže nego nekih drugih bolesti koje podsećaju na tularemiju, npr. kuge. Postoje brojni razlozi za to. Prvi je, da je pojavljivanje *F. tularensis* je mnogo lokalizovanije, tj. neka endemska područja obuhvataju ne više od par stotina kvadratnih kilometara, dok susedna područja mogu pokazivati mnogo manju incidenciju bolesti. Drugi je, da se mnoge epidemiološke studije zasnivaju na pretpostavci da postoji korelacija između pojave patogena i nastanka bolesti.

Ipak, izgleda da *F. tularensis* može perzistirati u okruženju bez istovremenog pojavljivanja bolesti u istom geografskom području. Postoje dokazi da *F. tularensis* opstaje u endemskim područjima, ali da su za odvijanje aktivnog ciklusa infekcije neophodni takvi preduslovi kao što su npr. izvesni klimatski uslovi. Stoga, za razumevanje životnog ciklusa potrebno je istovremeno analizirati bakteriju u okruženju, zatim u vektorima, kao i pratiti slučajeve tularemije kod životinja i ljudi (3).

1.4.1. Izvor zaraze

Tularemija se javlja u preko 250 životinjskih vrsta. Smatra se da se *Francisella tularensis* održava u okolini uglavnom u različitim zemljanim i vodenim sisarima kao što su veверице, pitomi i divlji zečevi, voluharice, bizamski pacov, vodeni pacovi u drugi glodari (22, 23, 24). Izvori zaraze za čoveka primarno su razne vrste životinja rodova *Lagomorpha* - kunići (u Severnoj Americi) i *Rodentia* - glodari (na Evroazijskom kontinentu) a vektori su najčešće krpelji roda *Ixodes* i *Dermacentor* (25). U Evropi tularemija je najčešća kod zečeva (*Lepus spp.*), mada zečevi verovatno ne čine rezervoar bolesti. *F. tularensis ssp. palaeartica* ima uglavnom vodeni ciklus, a izvori su akvatični sisari npr. bizamski pacov i dabar u S. Americi a voluharica u bivšem SSSR-u. Glavni izvor *F. tularensis ssp. tularensis* su kunići i krpelji. U regionima gde je tularemija endemijska,

antitela na *F. tularensis* se često detektuju u serumima uhvaćenih divljih životinja (26, 27). Ispitivanja raznih sisara na prisustvo antitela na *F. tularensis* su pokazala da je najveća prevalencija (57%) pronađena kod dabara. Ovo ukazuje da je dabar izrazito izložen bakteriji u svom prirodnom staništu i da, pored toga, ova vrsta u visokom procentu preživljava infekciju tularemije u odnosu na druge vrste sisara. Poznato je da je moguće hronično izlučivanje *F. tularensis* mokraćom kod delimično imunih poljskih miševa. Iako su epidemije tularemije tipa B udružene sa povećanom pojavom bolesti među glodarima i lagomorfima, ove životinje nisu sposobne da budu domaćini bakterije između izbijanja epidemije. Uopšteno govoreći, glodari i lagomorfi ne preživljavaju infekciju, a ako i prežive, eksperimentalni dokazi ukazuju da su ove životinje bile sposobne da eradikiraju bakteriju (4).

Kako se prirodni rezervoar *F. tularensis* može nalaziti bilo gde u okruženju, *F. tularensis* može preživeti mesecima u vodi i mulju (22). Očigledno, vodotokovi mogu biti kontaminirani inficiranim životinjama i tako postati izvori infekcije. Ovo, ipak, ne objašnjava iznenadno izbijanje bolesti u intervalima od nekoliko godina između kojih se nalaze intervali potpunog odsustva bolesti. Moguće je da neki ne-sisar može poslužiti kao domaćin u kome se odigrava intraćelijska replikacija bakterije, slično onoj opisanoj kod vrste *Legionella pneumophillia*. Dokazano je da bakterija preživljava u vodenim sistemima, verovatno u simbiozi sa amebama (24, 28, 29). Pokušaji da se pronađe prirodni rezervoar tularemije bili su ometeni izrazito konzervativnom prirodom *F. tularensis*, kao i kasnijim teškoćama u otkrivanju individualnih fenotipskih i genotipskih odlika među različitim izolatima unutar podvrsta (4).

Osim mikroorganizma i izvora, za transmisiju tularemije neophodan je i vektor, a to su najčešće iksodidni krpelji, koji se zaraze sišući krv bolesne životinje za vreme bakteremije. U centralnoj Evropi, krpelji *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus* su značajni vektori. U oblastima Češke republike i Austrije, gde se javljaju prirodna žarišta tularemije, između 2,1 i 2,8% analiziranih krpelja *D. reticulatus*, sadržalo je *F. tularensis* (30, 31). U Severnoj Americi se zapaža daleko veći procenat vektorskog prenošenja bolesti (7 - 63%). Smatra se da je za to odgovorna antropofilija severnoameričkih vrsta krpelja rodova *Dermacentor* (*D. reticularis*, *D. andersoni*, *D. variabilis*), *Haemaphysalis* i *Amblyomma spp.* (32).

1.4.2. Putevi prenošenja uzročnika

Humana infekcija se javlja nakon kontakta sa inficiranim životinjama ili vektorima, ingestijom kontaminirane hrane ili vode, inhalacijom infektivnih aerosola (uključujući prašinu, seno i vodu), kao i prskanjem inficiranog materijala u oči ili trljanjem očiju kontaminiranim prstima. Tularemija se, kao ni druge zoonoze, ne prenosi sa čoveka na čoveka (1, 2, 33)

Vekorski put (naročito krpelji, ali i muve) je najčešći put transmisije u SAD-u (34) i Japanu (35), dok u evropskim zemljama (Švedska, Finska i zemlje bivšeg SSSR-a) dominiraju komarci (3, 36-40). *F. tularensis* se prenosi transovarijalno u krpeljima i na taj način opstaje u prirodi bez potrebe za inficiranim životinjskim rezervoarom. Ostali insektni vektori su konjske muve, buve i vaši.

U direktnom kontaktu sa zaraženom životinjom (dranje kože zaraženih životinja, manipulisanje sa mesom, ujedom ili ogrebotinom zaražene životinje), najčešće obolevaju lovci, kožari i mesari. Ovaj oblik ulceroglandularne tularemije je poznat u SAD-u, Japanu,

skandinavskim zemljama i Španiji (34, 35, 38, 41, 42). Mesojedi kao što su domaće mačke i u jednom slučaju ptice mogu preneti tularemiju nošenjem organizma kandžama ili ustima (1, 43).

Aerogena transmisija je zabeležena kao uzrok nekoliko epidemija koje su zahvatile nekoliko stotina ljudi na farmama u Švedskoj i Finskoj (44). Takođe nekoliko epidemija respiratorne tularemije zahvatilo je Martin vinograd (Martha's Vineyard) u Masačusetsu u SAD-u, poslednjih decenija 20. veka, kada su obolele osobe koje su kosile travnjake i sekle žbunje (45).

Kontaminirano meso ili voda ostaju važni prirodni izvori za transmisiju te su prirodne katastrofe i ratovi povezane sa epidemijama tularemije uzrokovane narušenim faktorima životne sredine (46, 47). Zaraženi glodari svojim izlučevinama mogu da zagade vodu izvora, potoka i reka, što je dokazano u epidemijama tularemije na Kosovu, u Bugarskoj, Turskoj i Norveškoj (46-53). Preživljavanje *F. tularensis* u vodi može biti prolongirano, čak i kad je voda slana ili zamrznuta (1, 54). Možda važna za njeno preživljavanje u vodi je sposobnost organizma da se multiplicira unutar *Acanthamoebae castellanii*, indukuje incistaciju i preživi unutar amebne ciste (55).

Osim putem vode, uzročnik tularemije može da se prenese i putem hrane, a najčešće nedovoljno pečenim ili kuvanim mesom koje potiče od zaraženih životinja (56)

Obolevanja ljudi od tularemije, kao po pravilu su vezana sa povećanjem populacione gustine među glodarima i epizootije među njima. Npr, u Švedskoj, jasna je korelacija između pikova u populaciji voluharica i divljih zečeva i pojave tularemije kod ljudi (37). Pojava tularemije kod ljudi u bivšem Sovjetskom Savezu povezana je sa epizootijom bolesti kod zemljanih voluharica (25). Iako su epidemije tularemije tipa B udružene sa povećanim prirastom glodara i lagomorfa (kunića), ove životinje nisu sposobne da budu domaćini bakterije između izbivanja epidemije. Poznato je da je moguće hronično izlučivanje *F. tularensis* mokraćom kod delimično imunih voluharica (4).

Sezonska pojava slučajeva obolevanja od tularemije vezuje se, pre svega, za sezonsku aktivnost glodara i artropoda, za određene sezonske radove i zanimanja.

U mnogim zemljama opisuje se bimodalna distribucija bolesti. Kao vektorska bolest javlja se od maja do septembra, a od novembra do februara nastaje u kontaktu sa zečevima (35, 37, 57). U SAD-u, jedan pik obolevanja se javlja od novembra do februara i povezan je sa lovom, a drugi pik u leto i u vezi je sa izlaganjem ubodima krpelja (4). U severnim zemljama naročito u Švedskoj, izbivanje ulceroglandularne tularemije je povezano sa ubodima komaraca u kasno leto i ranu jesen, i javlja se bar jednom ili dva puta u deceniji (38, 59).

Ne mogu se izostaviti ni karakteristike tularemije kao prirodno žarišne zoonoze. Prirodna žarišta tularemije na prostorima bivše SFRJ istraživao je Heneberg i ustanovio da su ona rasprostranjena na celoj njenoj teritoriji (59). Prema podacima Borčića svako žarište karakterišu prostorne i vremenske pulzacije, što je uslovljeno porastom brojnosti glodara (svake 3-4 godine manja, svakih 9-11 godina veća), što zavisi od klimatskih i genetskih faktora a poklapa se sa epidemijama tularemije u žarištu (60). Ciklični karakter tularemije opisuje i Kartsev, po kome glavni ciklus traje 17 godina sa sekundarnim porastima i padovima u morbiditetu, na svake 3-4 godine (61). Bolest se pojavljuje kao epidemija u ljudi i životinja, zavisno od tipova rezervoara koji utiču na pojavljivanje u različito doba godine (25).

1.4.3. Raširenost u svetu

Tularemija se javlja endemično u umerenom pojasu severne hemisfere, u Severnoj Americi, Evropi i Aziji, u opsegu od 30 do 71° geografske širine (4). U Južnoj Americi i Africi se vrlo retko beleži (1-5).

U SAD-u, bolest je otkrivena u svim državnim entitetima izuzev Havaja, što potvrđuje visoka stopa morbiditeta od 98, 7%, u poređenju sa ostalim zemljama. Na globalnom nivou u SAD-u prisutan je opadajući trend broja obolelih od tularemije. Godine 1939. je verifikovan najveći broj obolelih -2291 osoba, koji je 40-tih godina 20. veka opao na 1100 obolelih godišnje (62). Do 1950. godine, ukupna incidencija je pala od >5, na 0, 5 slučajeva/1000000 stanovnika. Od 1967. u SAD-u incidencija je bila manja od 200 slučajeva godišnje. U poslednjim decenijama 20. veka opisuje se jedno malo endemsko područje (Martha's Vineyard) u državi Masačusets gde se 2000. godine, desila epidemija tularemije pneumonije sa 15 obolelih, koja je odnela i jednu žrtvu (63). U periodu od 1990 do 2000, u SAD-u, prema podacima CDC-a ukupno je objavljeno 1368 slučajeva tularemije iz 44 države, prosečno 124 godišnje (64). Sezonska distribucija tularemije u SAD je bimodalna, sa pikom od novembra do februara meseca, što je povezano sa lovom i drugim pikom u leto, što je udruženo sa ekspozicijom krpeljima.

U Japanu, tularemija se javlja u severoistočnim delovima velikog ostrva (57). U periodu od 1924 do 1996. registrovano je 1374 slučajeva tularemije. sa maksimumom obolelih 50-tih godina, što se dovodi u vezu sa povećanim konzumiranjem zečetine i tendencijom rapidnog pada broja obolelih na svega 10 slučajeva godišnje (35).

Na Evroazijskom kontinentu tularemija je široko rasprostranjena. Visoka prevalencija je nađena u bivšem Sovjetskom Savezu i skandinavskim zemljama, dok se na britanskim ostrvima izgleda ne javlja. Rusija je postala 3. zemlja (posle SAD-a i Japana), gde je tularemija zapažena 1926. i prijavljena 1928. godine. Tokom II svetskog rata, Rusija je, zajedno sa ostalim istočno-evropskim zemljama, bila zahvaćena epidemijama tularemije hidričnog porekla koje su obuhvatile 10000 do 100000 slučajeva godišnje. Poslednjih godina, u Rusiji se beleži ne više od 400 slučajeva tularemije godišnje, koja ima karakteristike i sporadičnog i epidemijskog javljanja (4).

U skorijoj istoriji opisani su slučajevi izbijanja tularemije u pogoršanim životnim uslovima, preko hrane i vode kontaminirane glodarima kako je to bilo na Kosovu 1999 - 2000. godine, gde je otkriveno 327 obolelih od tularemije (46).

U nordijskim zemljama, posebno u Švedskoj, izbijanje ulceroglandularne tularemije obično je udruženo sa ujedima artropoda i javlja se bar jednom ili dva puta za deceniju. U Švedskoj, bolest se endemično javlja samo u severnim delovima zemlje. Godišnji broj objavljenih slučajeva bolesti kod ljudi u periodu 1973-1985. kretao se od manje od 5 slučajeva do preko 500 (58). Godine 2000. ponovo je izbila epidemija tularemije u Švedskoj u kojoj je prijavljeno 270 obolelih (38).

U centralnoj i južnoj Evropi incidencija je generalno niža u poređenju sa severnim zemljama. Tako se na teritoriji Moravije, Slovačke i Austrije, tularemija javlja endemično sa godišnjom incidencijom koja varira od < 1 do >5 slučajeva na 100000 stanovnika (30). U Slovačkoj je prijavljeno 126 slučajeva bolesti u periodu 1985-1994, da bi od 1994. do 1996.

došlo do aktiviranja prirodnih žarišta tularemije i višestrukog porasta morbiditeta (213 registrovanih slučajeva) (65).

U Nemačkoj, samo jedan do nekoliko slučajeva tularemije se javlja svake godine (66). Nekoliko slučajeva opisano je i u Italiji (67, 68).

U Španiji prva humana tularemija je objavljena 1996, kada je registrovano 585 slučajeva, što se dovodi u vezu sa lovom na zečeve (69).

U Francuskoj je u petogodišnjem periodu od 2005 do 2010 registrovan 101 oboleo (70).

U Turskoj je evidentirano 205 obolelih od tularemije u periodu od 1988 do 1998. što je povezano sa konzumiranjem vode sa prirodnog izvora (52, 71).

U Bugarskoj je, prema zvaničnim podacima Ministarstva zdravlja Bugarske u periodu od 1997. do 2004. kao i u prvom kvartalu 2005. godine, prijavljeno 285 slučajeva tularemije, Žarište epidemije je zahvatilo područje veličine približno oko 4000 km², na lokalitetu zapadnog dela granice sa Srbijom (48, 72). U istom vremenskom periodu se javlja tularemija u jugoistočnoj Srbiji.

1.5. Patogeneza

Patogeneza infekcije *F. tularensis* i njeni virulentni faktori predmet su intenzivnih istraživanja, delimično zbog potencijalne zloupotrebe organizma kao agensa bioterorizma. *F. tularensis* je visoko virulentan organizam; samo 10-50 intradermalno ubrizganih ili inhaliranih organizama je dovoljno da dovede do kliničke bolesti. Uopšteno, *F. tularensis* subspecies *tularensis* (tip A) uzrokuje mnogo ozbiljniju kliničku infekciju od podvrste *holarctica* (tip B). Podvrste *tularensis* genotipa A1b su mnogo češće povezane sa invazivnim infekcijama i imaju viši mortalitet nego tipovi A1a, A2 ili B (6).

Posle umnožavanja na mestu inokulacije, *F. tularensis* se širi prvo do regionalnih limfnih čvorova i onda se može proširiti sistemski limfohematogenim putem do jetre i slezine gde se replicira (73). Na mestu inokulacije, javlja se akutna inflamatorna reakcija neutrofilima, makrofagima i limfocitima koja dovodi do tkivne nekroze (74). Mogu se formirati granulomi i povremeno kazeozni granulomi imitirajući tuberkulozu. Uprkos ovoj reakciji domaćina, *F. tularensis* može ostati izvesno vreme živa u tkivima.

F. tularensis je fakultativni intracelularni patogen koji se replicira primarno u makrofagima domaćina, ali može takođe inficirati mnoge druge ćelijske tipove uključujući neutrofile, dendritične ćelije, hepatocite i epitelijalne ćelije pluća (75, 76, 77). Dostupni podaci ukazuju da intracelularni ciklus *F. tularensis* je sličan u makrofagima, neutrofilima, epitelijalnim ćelijama i *Drosophila melanogaster* S2 ćelijama, ukazujući da je ciklus sličan u svim ćelijskim tipovima (78, 79, 80). Preuzimanje bakterije od strane neutrofila i dendritičnih ćelija je zavisno od opsonizacije (81), dok je ulazak u makrofage omogućen i kroz opsonin zavisne i opsonin nezavisne mehanizme (82). *F. tularensis* ulazi u ćelije domaćina vezujući se za površne receptore. Preuzimanje *F. tularensis* od strane makrofaga je jedinstven proces koji se naziva ("looping fagocitoza"), zahvaljujući asimetričnim i prostranim pseudopodnim izraštajima (82). Ulazak u makrofage je zavistan od komplementa i receptora komplementa; alternativni putevi uključuju manoza-receptore i klasu A receptora. Čim uđe u ćeliju, bakterija prekida sazrevanje fagozoma u kasni endozomalni stadijum. Za 15 do 30 min,

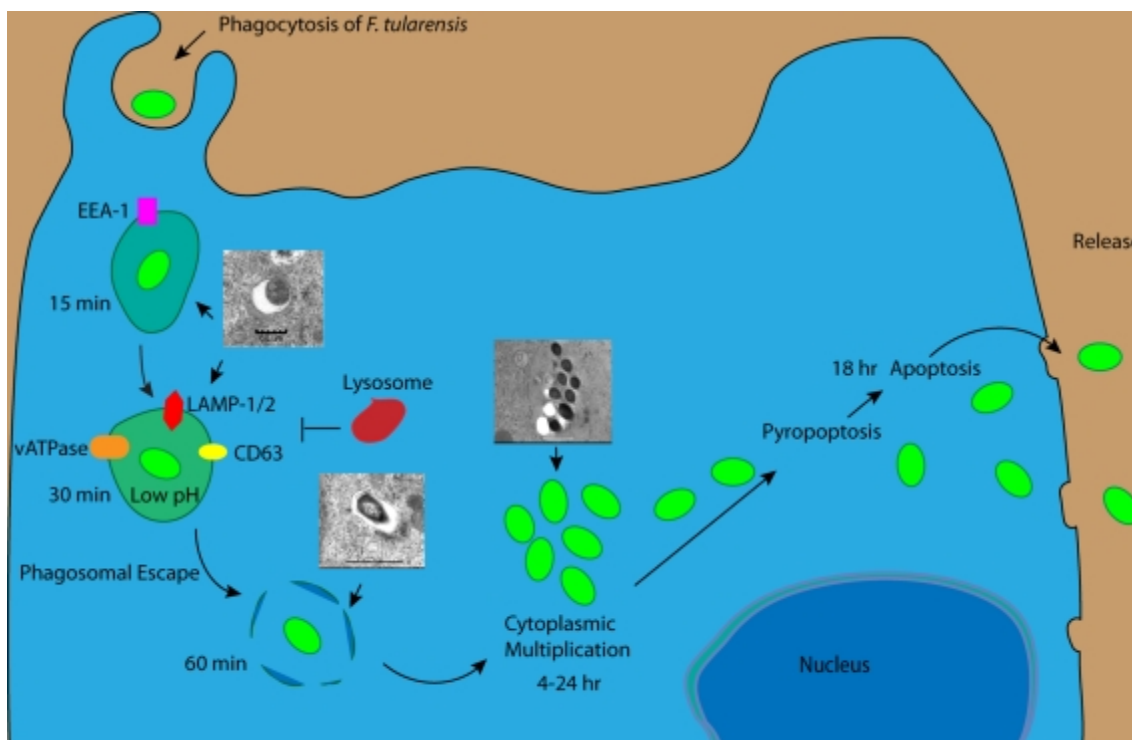
fagozom je privremeno acidifikovan i ova acidifikacija je suštinska za posledično "bežanje" (sklanjanje) u citosol makrofaga (83). Fagozom je izgleda strukturalno netipičan, stiće gusti fibrilarni omotač (79). Eventualno, fagozomalna membrana se raspada i bakterija odlazi u citoplazmu, 30-60 min nakon fagocitoze i multiplicira se u visokom nivou u citoplazmi (84). Čim uđe u citosol, bakterija je prepoznata od strane ćelija domaćina inflamazoma, što rezultuje u oslobađanju IL1 i IL18 (85). Slično, dolazi do aktivacije caspasa-3, kroz oba spoljašnja i unutrašnja puta između 6. i 12. dana posle infekcije. Mada su kaspaze aktivirane rano tokom infekcije (77, 85), *F. tularensis* je u stanju da odloži smrt ćelija za svoje preživljavanje i replikaciju, aktivirajući NF- κ B i Ras koji oboje stimulišu ćelijsku stimulaciju (86). Tokom kasnih stadijuma infekcije mišjih makrofaga, izgleda da bakterija ponovo ulazi endocitozom u makrofage indukujući proces autofagije i ostaje u velikim vakuolama sa duplim membranama, koje sadrže grozdove bakterijskih ćelija (84). Ova opservacija ostaje da se potvrdi, jer ovaj ponovni ulazak *F. tularensis* u endozom-lizozom autofagijom, ne dešava se u humanim makrofagama, i zato nije relevantan humanoj infekciji (87). Oslobađanje bakterija indukuje apoptozu (88) i piroptozu (85). Piroptoza je novi mehanizam opisane proinflamatorne smrti ćelije (89), koji rezultuje oslobađanjem bakterija iz inficirane ćelije. Pri kraju infektivnog ciklusa, indukcija apoptoze dozvoljava bakteriji prekidanje citoplazmatske membrane i izlazak ćelije u započinjanje novog životnog ciklusa (Slika 1) (90).

Sličan proces se dešava u neutrofilima. Nakon fagocitoze, humani neutrofili su nesposobni da ubiju *F. tularensis*; organizam inhibira NADPH oksidazu, oksidativni stres je suprimiran i organizam odlazi u citoplazmu (80). Međutim, konačni stadijumi intracelularnog ciklusa nisu potpuno razjašnjeni (91).

Pokazano je da kisela fosfataza AcpA je da ima ulogu u intracelularnom preživljavanju *Franciselle*, inhibišući oksidativni stres koji stvaraju makrofazi (92). Delecija AcpA rezultuje u svrtanju mutanata koji su mnogo podložniji ubijanju od strane humanih makrofaga u odnosu na divlji tip. (93). Osim toga, mutanti pokazuju smanjenu sposobnost da pobegnu iz fagozoma (93). Nekoliko teorija mogu objasniti ovo zapažanje (93). Jedna mogućnost je prekidanje membrane fosfolipaznom aktivnošću AcpA (92). Multiple kisele fosfataze su otkrivene u genomskoj sekvenci *Francisele* ali doprinos svake od njih u inhibiciji oksidativnog stresa još nije utvrđena. Takođe je pokazano da *Francisella* ulazi u neutrofile bez okidanja oksidativnog stresa, nepoznatim mehanizmom koji inhibiše spajanje NADPH oksidaza (80) i tada izbegava fagozom i preživljava u citoplazmi neutrofila. Tako *Francisella* pripada veoma maloj grupi patogena koji su sposobni da izbegnu ubijanje od strane neutrofila, ali značaj ovog tumačenja patogeneze još treba biti utvrđen (91).

U mišjem modelu infekcije *F. tularensis*, većina organizama oporavljenih iz krvi, nađeni su ne u leukocitima već slobodni u plazmi (94). Mada je pokazano da *F. tularensis* ispoljava ekstracelularnu fazu tokom in vivo infekcije miša, nema podataka koji govore o ekstracelularnom rastu tokom humane ili animalne infekcije. Ovo je bilo nezavisno od veličine inokuluma, virulencije i puta transmisije. Organizmi rastu dobro u celoj krvi ali ne i u plazmi ukazujući na potrebu za ćelijama domaćina. Ova zapažanja ukazuju da *F. tularensis* u krvi može biti preuzeta od strane leukocita gde se replicira i tada ih napušta odlazeći u plazmu gde započinje ciklus reinfekcije. Takođe je pokazano da *F. tularensis* može inficirati eritrocite i perzistirati unutar njih. U prilog tome govori da su intraeritrocitni organizmi

zaštićeni od ubijanja gentamicinom i možda doprinose pojavi relapsa nakon neadekvatnog tretmana (95).



Slika 1. Intracelularno kretanje bakterije *F. tularensis* unutar makrofaga preuzeto iz Asare i Kwaik, 2011.

F. tularensis ulazi u makrofage koristeći različite receptore i ostaje privremeno u ranom fagozomu (EEA). Unutar 30 min od infekcije ranog fagozoma, uz pomoć vATP-aze, *F. tularensis* acidifikuje fagozom i napušta ga, odlazeći u citosol. U citosolu *F. tularensis* aktivira kaspazu-1 i kaspazu-3, ali odlaže piropoptozu i apoptozu i održava ćelijsku vijabilnost sve do kasnih stadijuma infekcije kada bakterija napušta ostatak ćelije (Slika 1) (90).

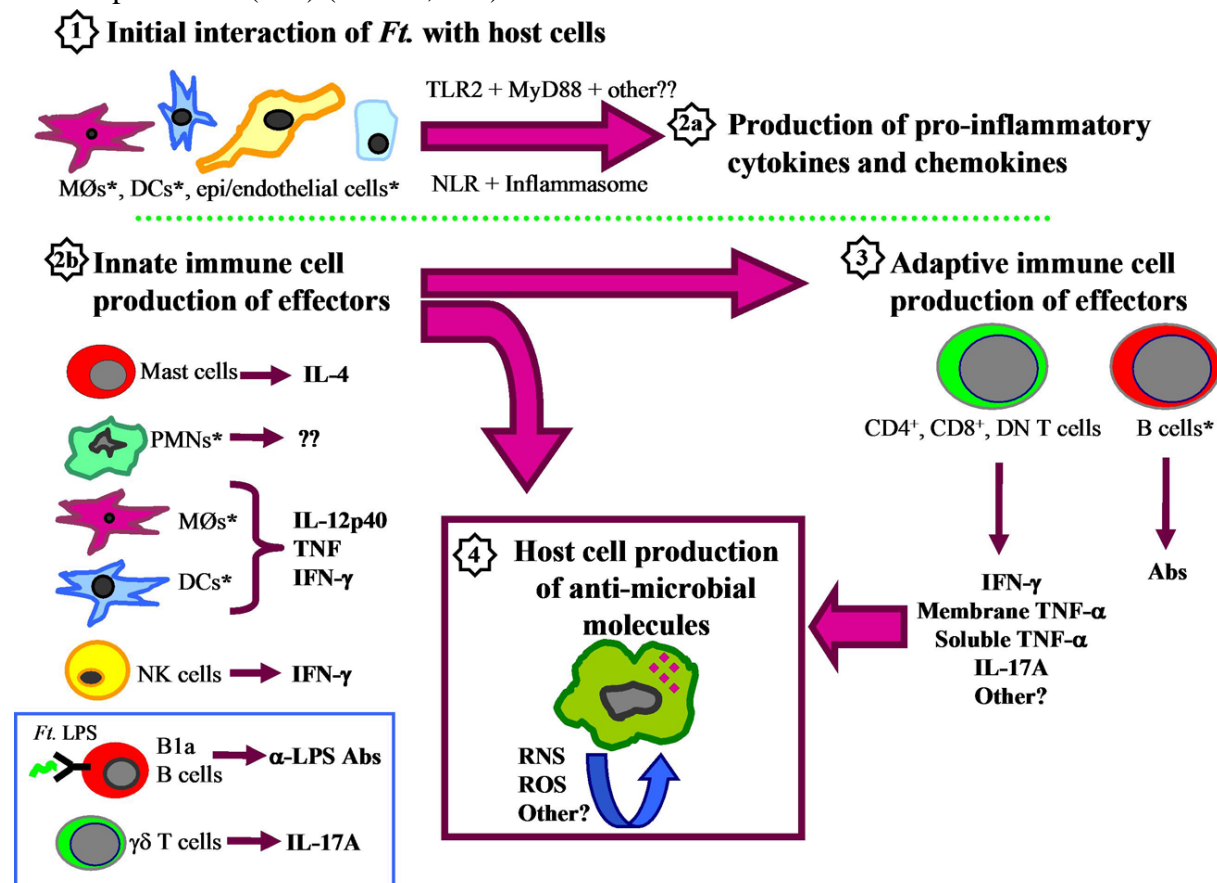
1.6. Imunski odgovor na *F. tularensis*

Imunski odgovor na *F. tularensis* razvija se posle prirodne infekcije ili vakcinacije živim atenuiranim sojem ove bakterije (LVS) (96-98). Pošto je *F. tularensis* fakultativni intracelularni parazit (profesionalnih fagocita kao i nefagocitnih ćelija), ćelijski imunski odgovor je od većeg značaja od humornog u odbrani od ove bakterije i predstavlja glavni protektivni mehanizam (99, 100).

1.6.1. Celularni imunski odgovor

Rani, urođeni imunski odgovor zadržava infekciju pre razvoja stečenog imuniteta, ali je nedovoljan da nadvlada infekciju. Unutar citosola makrofaga, organizam aktivira zaštitni multimolekularni kompleks domaćina, inflamazom, vodeći do oslobađanja proinflamatornih citokina (interleukin-1 beta i interleukin 18) koji okidaju kaspazu-1 zavisnu ćelijsku smrt (101). Ovaj proces zahteva tip I interferon prenos signala. Drugi mehanizmi koji su uključeni

u urođeni imuni odgovor obuhvataju neutrofile, makrofage, dendritične ćelije, prirodne ćelije ubice, limfocite, interleukin-12, *tumor nekrosis* faktor-alfa (TNF- α), gama-inteferon i *Tool-like* receptor 2 (TLR-2) (76). Prirodni humoralni odgovor na ugljenohidratne antigene javlja se nakon razvoja celularnog imuniteta i nedovoljan je za zaštitu od infekcije (102). Nasuprot tome, oporavak od infekcije je zavistan od razvoja ćelijski posredovanog imuniteta. Ćelijski posredovan imunitet je usmeren protiv proteinskih antigena i zavistan od CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija (76, 103). Kao posledica toga, makrofagi su aktivirani da ubiju intracelularno *F. tularensis* kroz proces koji uključuje TNF-alfa, gama-interferon i produkciju reaktivnih azotnih produkata (103) (Slika 2, 104).



Slika 2. Komponente mišjeg nespecifičnog i specifičnog imunskog odgovora na *F. tularensis* (preuzeto iz Cowly i Elkins 2011)

Na slici 2. je prikazano: (1) Inicijalna interakcija *F. tularensis* sa ćelijama domaćina kao što su makrofazi, dendritične ćelije, epitelijalne ćelije i endotelijalne ćelije stimuliše produkciju pro-inflamatornih citokina i hemokina (2a). Istovremeno, važne, nespecifične imune ćelije okupljaju se na mesto infekcije produkujući efektorne citokine kao što su IL12p40, TNF-alfa, IFN-gama i IL-17A (2b) koji utiču na razvoj T ćelija i indukuju produkciju antimikrobnih molekula od strane ćelija domaćina (4). Osim klasičnih citokina tipa TH1, drugi medijatori, uključujući produkciju IL-4 od strane mast ćelija, mogu direktno inhibisati intramakrofagalni rast *F. tularensis* i anti-LPS antitela od strane B-1a B ćelija koji ograničavaju infekciju. PMN su važni za odbranu od infekcije *Francisellom*, ali ne mogu da je eradikiraju in vitro, tako da njihov doprinos u infekciji za sada ostaje nepoznat. Posle nekoliko dana, dolazi do aktivacije i ekspanzije *Francisella*-specifičnih T i B ćelija (3). Alfa-

beta T ćelije su esencijalne za čišćenje primarne infekcije i produkciju efektornih citokina IL17A, IFN-gama kao i membranom-ograničenih i solubilnih formi TNF-alfa. Ovi faktori verovatno pojačavaju aktivaciju inficiranih ćelija domaćina kroz produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih medijatora, kao i drugih neidentifikovanih antimikroba (104).

Celularni imunski odgovor na *F. tularensis* se može dokazati *in vivo* nakon dve nedelje od početka bolesti (105, 106, 107). Karakteriše se dugotrajnom perzistencijom, tako da se može detektovati godinama i decenijama posle bolesti, čak 25 godina posle prirodne infekcije (108-111). Razlozi dugotrajne imunosti traže se u reekspoziciji, tj. ponovnom izlaganju infektivnom agensu, unakrsnoj reaktivnosti ili latenciji, tj. hroničnoj infekciji (111, 112). Najverovatnije do perzistencije celularne imunosti na *F. tularensis* dolazi usled dugotrajne depozicije bakterijskih antigenskih determinanti u retikulo-endotelnom sistemu i njihove prezentacije na površini folikulo-dendritičnih ćelija, te stalne stimulacije memorijskih T limfocita. Za mnoge intracelularne patogene, celularni imuni odgovor zahteva najviše pažnje; organizmi su sakriveni unutar ćelija i relativno nedostupni antitelima a nivoi serumskih antitela često ne korelišu sa zaštitom. Tako su T ćelijski mehanizmi uključujući produkciju citokina i citotoksičnost, logični kandidati za efikasnu eradikaciju patogena.

Komponente organizma koje indukuju inflamatorni odgovor su nepoznate, mada prema rezultatima jedne studije, izgleda da LPS nije odgovoran. (109). Druga studija ukazuje da je doprinos LPS-a na inflamatorni odgovor veoma zavistan od domaćina, na osnovu razlika u zapaženom odgovoru između mišjih i humanih imunih ćelija nakon izlaganja LPS-u (113). Pokazano je da je urođeni imuni odgovor na *F. tularensis* posredovan interakcijom bakterijskih komponenti sa TLR2 (114). Utvrđeno je da dva lipoproteina, TUL4 i FTT1103, interaguju sa TLR2, koji može biti odgovoran za indukciju proinflamatornih citokina tokom infekcije (115). Protein domaćina, matriks metaloprotein 9, takođe je uključen u razvoj bolesti nakon infekcije *F. tularensis* (116). On se oslobađa od strane neutrofila i aktiviranih makrofaga, i igra važnu ulogu u pokretanju leukocita. Miš sa defektnom produkcijom matriksnog metaloproteina 9, u stanju je da se izbori sa infekcijom, čak i sa visoko virulentnim sojevima *F. tularensis*, dok je sa normalnom ekspresijom ovog metaloproteina podložniji infekciji sa većim bakterijskim opterećenjem, ekstenzivnijom histopatologijom, stepenom oboljenja i smrtnosti (116).

1.6.2. Humoralni imunski odgovor

Humoralni imunski odgovor na *F. tularensis* karakteriše rana sinteza i dugotrajna perzistencija antitela IgG, IgA i IgM klase. Specifični imunoglobulini se pojavljuju unutar jedne nedelje od infekcije (117-120), maksimalne koncentracije dostižu posle 4-7 nedelja i uprkos opadajućoj tendenciji, antitela na *F. tularensis* u serumu se mogu detektovati i 5-10 godina posle infekcije. Smatra se da je LPS *F. tularensis* glavni induktor humoralne imunosti (109).

In vivo eksperimenti na miševima pokazali su da se u imunskom odgovoru na *F. tularensis* najranije sintetišu IgG antitela (1- 12 dana od pojave simptoma), a potom i antitela IgM (2-14 dana) i IgA klase (2-18 dana), što predstavlja izuzetak u imunskoj reakciji na bakterijske infekcije. Nivo IgG antitela takođe opada sporije nego IgM i IgA, tako da posle 3-6 meseci nivo IgG (u prvom redu IgG2 a sa malim količinama IgG1, IgG2b

i IgG3) ostaje i dalje visok, dok su nivoi IgM i IgA antitela značajno smanjeni. Takođe, antitela IgG klase najduže perzistiraju, čak 25 godina posle infekcije (111).

Imunski odgovor na *F. tularensis* karakteriše i dugotrajna perzistencija antitela IgM klase, što inače nije uobičajena pojava. Moguće objašnjenje ove pojave leži u činjenici da *F. tularensis*, budući da je intracelularna bakterija, opstaje dugo vremena u domaćinu, stalno i iznova indukujući sintezu antitela (118).

Za razliku od antitela IgM klase, IgG i IgA antitela su slabi aglutinini ili neaglutinirajuća antitela. Ova antitela nisu u stanju da daju vidljivu aglutinaciju, što je karakteristika akutne infekcije, kada je MAT test u visokom procentu negativan. Takođe, antitela ovih klasea mogu biti i kros reaktivna, blokirajuća, što takođe utiče da se ne ispolji vidljiva aglutinacija. U ovoj fazi infekcije preporuka je da se koriste specifičniji testovi (IIF, ELISA).

Antitela IgM i IgG klase učestvuju u aktivaciji komplementa, opsonizaciji bakterija, olakšavanju fagocitoze i zaustavljanju diseminacije bakterija. Međutim, smatra se da antitularemična antitela imaju važnu ulogu i u T limfocitima posredovanoj citotoksičnosti inficiranih ćelija (ADCC). Ako se ovome doda veliki značaj celularne imunosti nije ni čudo što je ovakvim imunim odgovorom obezbeđena skoro apsolutna zaštita, tako da reinfekcije skoro i nema. U literaturi je opisano samo 12 reinfekcija (kod 9 osoba) (121).

Uloga humoralnog imuniteta i neutrofila u odbrani domaćina od *F. tularensis* je nejasna (62). što dokazuje serološki imuni odgovor kod ljudi na mrtvu tularemičnu vakcinu, koji nije protektivan za laboratorijske radnike, iako imaju blaže simptome kao rezultat prethodne vakcinacije (121). Starije studije na mišjem modelu su demonstrirale da pasivni transfer imunog seruma (anti-LVS ili anti-*Francisella* LPS antitela) štiti naivnog miša (prvi put izloženog infekciji) od infekcije LVS i manje virulentnim tipom B francisele (102,117-120, 122,123, 124,125). Ova zaštita međutim nije dokazana kada su miševi izloženi virulentnim divljim sojevima (123). Slično, pokušaji da se stimuliše protektivni imunitet kod miša kroz vakcinaciju sa *Francisella* LPS-om ili njenim proteinskim konjugovanim derivatima, imali su uspeha samo nakon vakcinacije LVS-om ili slabije virulentnim tipom B *F. tularensis* (122, 126). Sposobnost da se primenom IL-12 pojača humoralni imunitet i zaštititi od ekspozicije virulentnom soju *F. tularensis* ostaje da se prouči (104).

Iako se neka od stvorenih antitela ponašaju kao opsonini i olakšavaju fagocitozu pomoću neutrofila, neutrofilu nisu efikasni u eliminaciji fagocitovane bakterije. Skorašnje studije na životinjama sa deplecijom neutrofila, pokazuju, da su neutrofilu značajni u rezistenciji na infekciju oslabljenim sojem, ali u odnosu na virulentni divlji soj, saznanja su nepoznata (127). Ovi podaci ukazuju da humoralni imunitet igra ograničenu ulogu u odbrani domaćina protiv prirodno stečene infekcije (62, 99), a da uloga B ćelija u primarnom i sekundarnom imunom odgovoru na *F. tularensis* ostaje nejasna (105). Miševi deficijentni u zrelih B ćelijama i antitelima imaju marginalnu ulogu u kontroli primarne subletalne infekcije, ali su 100 puta manje zaštićeni od sekundarnog letalnog izlaganja od normalnih miševa (128).

Najnoviji podaci ukazuju na jasan doprinos B ćelijski-posredovanih funkcija u zaštiti protiv sekundarnih infekcija *Francisella* sojevima manje virulencije, dovodeći do novog

shvatanja da kombinacija i B i T ćelijskog odgovora doprinosi protektivnom imunitetu protiv *F. tularensis*.

Izgleda da je antitelo-posredovan imuni odgovor nastao nakon imunizacije sa živom ili mrtvom LVS ili antigenim preparatima *F. tularensis* najbolji delimično protektivni imunitet protiv virulentnih sojeva *F. Tularensis*, ali da je T ćelijski odgovor neophodan za postizanje optimalne zaštite. Interesantno je, da je serum intranazalno imunizovanog miša virulentnim SchuS4 i naknadno zaštićenog terapijom levofloksacinom, bio sposoban da zaštiti u 90% naivnog miša od intranazalnog izlaganja letalnom SchuS4 (129).

Skorašnje studije otkrivaju interesantan mehanizam, pomoću koga virulentna *Francisella* može nadvladati protektivne efekte anti-*Francisella* antitela. Visoko virulentni tip A SchuS4, ali ne i LVS, može direktno vezati plazmin, serin proteazu koja degradira opsonirajuća antitela i tako inhibiše antitelima-posredovano preuzimanje SchuS4 od strane makrofaga (130). Značajno je to, što antitelo-opsonirajući SchuS4 izaziva povećanu produkciju TNF-alfa u IL-6 iz makrofaga, što je smanjeno dodavanjem plazmina. Tako, sposobnost SchuS4 da vezuje plazmin verovatno doprinosi njegovom kapacitetu da nadvlada odgovor antitela domaćina.

Poslednjih nekoliko godina zapažena je nova uloga „urođenih imunih B ćelija“ u imunitetu na *F. tularensis*. Nazvane B-1 limfocitima, ove ćelije su primarno locirane u pleuralnoj šupljini, intestinalnoj mukozii i slezini miša i brzo proizvode antitela protiv T-nezavisnih antigena. Kod mišjeg modela infekcije *F. tularensis* ove ćelije ispoljavaju veoma brz odgovor antitela za 2-3 dana od LVS ili Ft-LPS vakcinacije. B-1aB ćelijski odgovor rezultuje zaštitom od srednje letalnog LVS aplikovanog intraperitonealno i nije zavistan od prisustva T ćelija (128, 131). Kod vakcinisanog miša LPS-om *F. tularensis*, B1a ćelije proliferišu u slezini i diferenciraju se u plazma ćelije koje proizvode LPS specifična *F. tularensis* antitela koja se detektuju u serumu 3 - 4 dana posle imunizacije. Uloga B ćelija u protektivnom imunitetu mnogo je značajnija u sekundarnoj u odnosu na primarnu infekciju. Ovi rezultati dalje ukazuju da je deo, ali ne sav doprinos B ćelija u protektivnom imunom odgovoru antitelo posredovan. Uloga drugih funkcija B ćelija, kao što su produkcija citokina i hemokina ostaje da bude detaljno proučena. Interesantno je da nedavni dokazi ukazuju da *F. tularensis* može rasti unutar B ćelija, konačno indukujući apoptozu inficiranih ćelija (132). Tako potencijal *F.tularensis* da menja B ćelijske funkcije ostaje interesantna tema za buduća istraživanja (104).

Pregledom prethodnih radova o životinjskom i humanom humoralnom imunitetu u tularemiji zaključeno je da humoralni odgovor ima minimalnog uticaja na sveukupnu kontrolu infekcije *F. tularensis* (99, 133). Dalja studija na ulozi antitela u zaštiti protiv tularemije infekcije je važna i za razvoj vakcine i za moguće terapijske proizvode (134).

1.7. Kliničke manifestacije

1.7.1. Klinički oblici

Period inkubacije obično iznosi 3-5 dana, ali može varirati u opsegu od 1-21 dan. Bolest obično počinje iznenadno, sa visokom temperaturom, drhtavicom, slabošću, glavoboljom i nauzejom. Često se javlja i suv kašalj, takođe u odsustvu pneumonije, kao i

gušobolja koja nije samo znak orofaringealne forme tularemije. Kako u tipu A, tako i u tipu B, postoje brojne individualne varijacije u težini bolesti. Trajanje febrilnosti može varirati od nekoliko dana do nekoliko nedelja. U infekciji tipa A, dolazi do brzog propadanja opšteg stanja i može se razviti rabdomioliza i septički šok (135, 136). Nakon uvođenja antibiotika u terapiju, ukupna stopa mortaliteta kod tularemije tipa A je opala sa 5% do 10% na 1% do 2%. Tip B tularemije je praktično neletalna kod ljudi, čak i ako se ne sprovodi adekvatna terapija (4).

Klinički oblici tularemije zavise od od puta ulaska uzročnika u organizam. Opisuje se šest glavnih kliničkih formi tularemije: ulceroglandularna, glandularna, okuloglandularna, faringealna (orofaringealna), respiratorna i tifoidna.

Ulceroglandularna tularemija je najčešće izazvana transmisijom putem vektora i to: u SAD-u i zemljama centralne Evrope preko krpelja (32), a u severnoj Evropi preko komaraca (38). Nakon kontakta sa glodarima, javlja se aksilarna limfadenopatija u 65% slučajeva, a nakon uboda krpelja, javlja se ingvinalna limfadenopatija u 64% eksponiranih (58, 137). Lovci se mogu zaraziti tokom dranja zečeva ili čak samim dodirivanjem životinje, bez ikakve prethodne prepoznate ogrebotine ili povrede tokom manipulacije sa zaraženom životinjom. Ulceroglandularna forma je najčešći oblik bolesti u skandinavskim zemljama, SAD-u, Japanu, Španiji i obuhvata 90% svih slučajeva (4).

U vreme nastajanja opštih simptoma dolazi do izbijanja lokalnih kožnih promena - papula (137). Unutar nekoliko dana ove papule mogu ulcerisati ili postati pustule. Uskoro zarastaju ostavljajući manje ili više vidljive ožiljke. Posle nekoliko dana od početka bolesti, obično bolesnik sam primećuje uvećanje limfnih čvorova. Žlezde mogu dostići znatne dimenzije, osetljive su i mogu biti okružene crvenilom ili otokom okolnog tkiva i kože. Ovo uvećanje limfne žlezde obično dovodi bolesnika lekaru, pri čemu se primarna ulceracija retko zapaža i obično se otkriva tek nakon brižljive fizikalne inspekcije. Nakon sprovođenja adekvatne terapije unutar nedelju dana od početka bolesti, žlezde ubrzo počinju da se smanjuju. Ako se adekvatna antibiotska terapija ne sprovede unutar dve (138) ili tri nedelje (52) od početka bolesti, postoji rizik za nastajanje abscesa >20%. Kod većine napred pomenutih slučajeva, nastaje rezolucija spontanom rupturiranjem ili incizijom, što zahteva dalje lečenje rane koje može potrajati nedeljama (4).

Glandularna tularemija je patogenetski identična ulceroglandularnoj, prenosi se istim mehanizmima, premda je lokalna infekcija slabo izražena da bi bila primećena i nema primarnog afekta. Manifestuje se osetljivom, regionalnom limfadenopatijom uključujući jedan ili više limfnih čvorova. Supurativni limfni čvorovi mogu da postanu fluktuantni, što je indikacija za hiruršku ili iglenu drenažu. Tačna dijagnoza se može predvideti naročito ako nema povišene temperature u trenutku pregleda. Ovaj oblik je bio najčešći među decom (44% od 190 slučajeva tularemije u Misuriju od 2000. do 2007) i drugi najčešći oblik (28% svih oblika tularemije) a kod odraslih je bio treći najčešći oblik (16% svih oblika) (34).

Okuloglandularna tularemija je takođe slična ulceroglandularnoj formi. Bolest se manifestuje kada bakterija dospe do konjunktive rasprskavanjem infektivnog materijala u oko, trljanjem očiju kontaminiranim prstima ili aerogenom ekspozicijom. Na ovaj oblik otpada par procenata obolelih. Očni simptomi uključuju bol, fotofobiju i povećano suzenje. Mogu biti prisutni mali konjunktivalni ulceri ili papule, kao i periorbitalni eritem. Regionalna limfadenopatija može biti izražena, najčešće preaurikularna, cervikalna i submandibularna.

Parinaudov okuloglandularni sindrom predstavlja okuloglandularnu formu tularemije sa unilateralnom lezijom u vidu jakog konjuktivitisa i istostranog uvećanja preaurikularnih limfnih žlezdi, koje obično postanu toliko velike da menjaju izgled i oblik lica (4, 139, 140).

Orofaringealna (tonzilofaringealna) tularemija nastaje unošenjem kontaminirane hrane ili vode ili udisanjem kapljica; međutim, često rizičan faktor nije prisutan 68, 5 % (58, 137, 141). Primarni ulkus je lokalizovan u usnoj duplji i predstavlja primarni afekt, dok su limfni čvorovi vrata uvećani. Dok je u zemljama Zapada, orofaringealna forma tularemije zastupljena sa svega nekoliko procenata (3%) (141), u Bugarskoj, Turskoj i našoj zemlji je dominantna forma (do 90%) (50, 52, 142, 143). Ovaj oblik tularemije bez drugih manifestacija može ostati dugo nedijagnostikovano i njegova dijagnoza je otkrivena više slučajno nego li se primarno sumnjalo (58, 144).

Orofaringealna tularemija se prezentuje u vidu stomatitisa i faringitisa. Fizikalnim pregledom otkriva se crvenilo i gnojne promene u usnoj duplji i sluzokoži ždretna, praćeno uvećanim limfnim žlezdama vrata (56, 141). Ako se ne posumnja na tularemiju, doći će se do pogrešne dijagnoze i davanja neadekvatne terapije. Tako se, u Turskoj, tokom epidemije orofaringealnog oblika tularemije tipa B, kasnilo sa postavljanjem dijagnoze, što je rezultovalo komplikacijama u vidu supurativnog limfadenitisa koji se sretao u oko 40% obolelih (52).

Respiratorna forma tularemije nastaje inhaliranjem *F. tularensis* u obliku aerosola. U prvobitnoj klasifikaciji kliničkih oblika tularemije ova forma nije bila navedena. Umesto toga, navedena je forma bez jasnih lokalnih znakova ulaska infekcije i klasifikovana kao tifoidna ili kriptogena tularemija. Kasnije, u ovu klasifikaciju je uključena i respiratorna forma tularemije. U poređenju sa ulceroglandularnom formom, epidemije respiratorne tularemije se ne javljaju često, ali obično zahvataju veliki broj obolelih.

Ova forma se može prezentovati simptomima pneumonije, uključujući suv kašalj, dispneju, kao i bol u grudima. Ipak, podjednako su česti oblici sa generalizovanom slabošću i izostankom respiratornih simptoma. Kod respiratorne tularemije postoji jasno razgraničenje u pogledu težine bolesti izazvane tipom A, odnosno tipom B bolesti i ovi tipovi će biti pojedinačno i opisani. Pneumonija kod tularemije može biti primarna i sekundarna. Primarna pneumonija ukazuje na zahvatanje pluća koje nastaje kao rezultat inhalacije uzročnika, dok se za sekundarnu pneumoniju veruje da je uzrokovana hematogenim širenjem uzročnika tokom evolucije bolesti. Plućne promene mogu biti prisutne ili odsutne u svim oblicima tularemije, uključujući i respiratorni oblik.

Primarna pneumonija u tularemiji tipa A uključuje većinu fulminantnih slučajeva bolesti (137, 145). Početak bolesti je obično nagao sa drhtavicom, jezom, dispnejom, kašljem, bolovima u grudima i profuznim znojenjem. Kašalj može ili ne mora biti produktivan, a pacijent se oseća ekstremno slabim. Pre uvođenja antibiotske terapije smrtnost kod ovog oblika bolesti je iznosila 30%- 60%. Zbog težine simptoma i poremećaja svesti, bolest može podsećati na tifusnu groznicu. Kod polovine obolelih od tularemije tipa A, opisana je i disocijacija pulsa.

Kod sekundarne pneumonije u ulceroglandularnoj ili glandularnoj tularemiji tipa A, simptomi pneumonije se mogu pojaviti od 1-2 dana do nekoliko meseci nakon početka bolesti. Postoje brojne individualne varijacije u težini bolesti i kod težih slučajeva, obično dominiraju plućni simptomi (4). Radiografske promene u pneumoničnom obliku tularemije

tipa A jako variraju i mogu se zameniti sa tipičnom bakterijskom pneumonijom, tuberkulozom, limfomom ili karcinomom pluća.

U tularemiji tipa B, zahvatanje pluća se viđa retko i to kao sekundarna manifestacija u toku bolesti. U nordijskim zemljama opisane su veće epidemije respiratorne tularemije B tipa. U jednoj studiji je pokazano da se pneumonija u respiratornom obliku tularemije tipa B javlja kod <50% bolesnika sa znacima i simptomima koji su uopšteno mnogo blaži nego oni kod bolesti tipa A (44). U slučaju epidemije mahom ulceroglandularnog oblika tularemije u Švedskoj, opisan je svega jedan slučaj pneumonije među 400 registrovanih slučajeva (146). Čak i u zemljama južne Evrope, gde se bolest teže prepoznaje, a sa terapijom se kasnije počinje, svega 1-4% bolesnika sa ulceroglandularnom ili orofaringealnom tularemijom ima pneumoniju (52, 147).

Tifoidna tularemija je termin koji bi se trebao koristiti za oblike bolesti kod kojih se put ulaska infekcije ne može definisati. Praćena je visokom temperaturom, glavoboljom i endotoksemijom, a izostaju vidljive kožne lezije i limfadenopatije. U odsustvu podatka o kontaktu sa vektorima dijagnoza se jako teško uspostavlja. Česti su šokovi, a stopa mortaliteta je 30-60% (148).

Enteralna (gastrointestinalna) tularemija nastaje unošenjem kontaminisane hrane ili vode. Dobro je poznata u zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza, dok se praktično ne pominje u zapadnoj literaturi.

Sekundarne kožne manifestacije se javljaju u tularemiji i često se pogrešno dijagnostikuju ili predvide (38, 149). Opisuju se makulopapularni, vezikulopapularni, urtikarijalni raš, kao i brojne imunološki posredovane kožne promene, uključujući nodozni eritem, multififormni eritem i Sweet-ov sindrom (52, 137, 149, 150, 151). U epidemiji tularemije kod dece, u Finskoj, čak 52% je imalo sekundarnu kožnu erupciju (151).

1.7.2. Komplikacije tularemije

Najčešća komplikacija tularemije je supuracija limfnog čvora. Supurativni limfni čvor se oporavlja drenažom čak i kada je dobijeni gnoj sterilan.

Pored pneumonije, u tularemiji se mogu pojaviti i druge komplikacije. U područjima endemskim za tip A bolesti, opisane su komplikacije opasne po život, tipa: septikemija (136, 152), meningitis (153), endokarditis (154), perikarditis (148, 155), hepatitis i apses jetre (137, 156, 157), bubrežna insuficijencija (158), peritonitis i osteomijelitis (148). Septikemija (159) i meningitis (160) su opisani i u tularemiji tipa B, ali sa mnogo povoljnijim ishodom nego u bolesti tipa A. Meningitis se razvio posle 3 do 30 dana od početka bolesti kod ulceroglandularne i tifoidne forme i manifestovao se mononuklearnom ćelijskom pleocitozom sa niskom glikorahijom i visokom proteinorahijom u cereprospinalnoj tečnosti (161). Perikarditis, kao jedina manifestacija tularemije, je opisana kod jednog bolesnika sa serološkom potvrdom tularemije (155). Opisuju se čak i šant infekcije kod tularemije (162).

1.7.3. Diferencijalna dijagnoza

Različite forme tularemije mogu imati nespecifičnu pojavu i/ili podsećati na širok spektar drugih, mnogo češćih bolesti.

Ulceroglandularna tularemija se mora diferencirati od:

- Antraksa, infekcije Pasteurellom, primarnog sifilisa, mišje groznice, rikecioze, stafilokokne ili streptokokne infekcije kože, infekcije izazvane sa *Mycobacterium marinum*.

Glandularna tularemija od:

- Bubonske kuge, *Cat-scratch disease*, infekcije mikobakterijama, sporotrihoze, *stafilokoknog ili streptokoknog adenitisa*, šankroida, *Lymphogranuloma venereum*, primarnog genitalnog herpesa, sifilisa.

Okuloglandularna tularemija od:

- *Cat-scratch disease*, *Herpes simplex* ili *Herpes zoster* infekcije, Adenovirusne infekcije, *Coccidiomycosis*, piogenih bakterijskih infekcija, sporotrihoze, sifilisa, tuberkuloze.

Orofaringealna tularemija od:

- Streptokoknog faringitisa, crevnog antraksa, difterije, infektivne mononukleoze, adenovirusne infekcije.

Pulmonalna tularemija od:

- Vanbolnički stečene bakterijske pneumonije (*Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Moraxella*), *Chlamydia psittaci* ili *Chlamydia pneumoniae*, inhalacionog antraksa, pulmonalnog oblika kuge, Q groznice, tuberkuloze, gljivične bolesti pluća (*histoplasmosis*, *coccidiomycosis*), virusne pneumonije (*influenza*, *hantavirus*, *RSV*, *CMV*).

Tifoidnu tularemiju treba razlikovati od:

- Bruceloze, diseminovane mikobakterijske ili gljivične infekcije, endokarditisa, leptospiroze, malarije, Q groznice, tifoidne groznice, meningokokcemije, septičnog oblika kuge, septikemije uzrokovane drugim gram negativnim bakterijama (salmoneloze) stafilokoknog ili streptokoknog toksičnog šok sindroma, *Rocky Mountain spotted fever*, erlihioze, toksoplazmoze (163).

1.8. Dijagnostika tularemije

1.8.1. Laboratorijska i mikrobiološka dijagnostika

Rutinskim analizama krvi, obično se ne otkrivaju poremećaji koji bi bili specifični za tularemiju. Broj leukocita i brzina sedimentacije eritrocita mogu biti normalni ili povišeni. Povremeno se nalaze trombocitopenija, hiponatremija, povišene serumske transaminaze i kreatin-fosfokinaza, mioglobinurija i sterilna piurija (1,137)

Vrednosti C reaktivnog proteina (CRP) su generalno niže nego što bi se očekivalo za jednu invazivnu bakterijsku bolest. Prosečni pik nivoa CRP od 53 mg/l⁻¹ postignut je tokom prve nedelje a normalizovao se nakon 3-4 nedelje. Vrednosti sedimentacije eritrocita odgovarale su onima kakve se viđaju u raznim invazivnim bakterijskim oboljenjima. Prosečne vrednosti sedimentacije eritrocita tokom prve nedelje, kretale su se od 30 do 50 mm u prvom satu, i ostajale su visoke tokom celog prvog meseca bolesti (164).

Organizam se slabo boji po Gramu ili u tkivnim bioptatima, i ne raste u standardnim podlogama. Međutim, može porasti na obogaćenim podlogama iz krvi, pleuralne tečnosti, limfnih čvorova, rana, sputuma i želudačnih aspirata (1,2). Neke vrste mogu zahtevati do nedelju dana rasta da bi razvile vidljive kolonije, naročito kod pacijenata kojima je plasirana

bakteriostatska antibiotska terapija. Pozitivni direktni fluorescentni test na izolatima kultura potvrđuje identifikaciju (163).

Zbog rizika tokom laboratorijskog rada, kulture na tularemiju se ne zasejavaju rutinski, posebno ne u severnoj Americi gde je *F. tularensis* tip A, endemska vrsta. U skladu sa aktuelnim preporukama Radne grupe za civilnu biozaštitu-SAD, rutinsko uzimanje uzoraka kultura koje potencijalno mogu sadržavati *F. tularensis*, mora se izvoditi na nivou biološke bezbednosti 2 (BSL 2), pri čemu rad s kolonijama i manipulacije koje mogu dovesti do stvaranja aerosola zahtevaju uslove tipa BSL 3 (165).

U endemskim oblastima za tularemiju tipa B, kulture se zasejavaju mnogo češće, s tim što je potrebno javiti laboratoriji kakav se uzorak šalje.

U jednoj skorašnjoj studiji ulceroglandularne tularemije, izolovana je *F. tularensis* iz ulcera kod 62% bolesnika (166). Da bi se postigla veća senzitivnost, kod nekih pacijenata sa ulceroglandularnom tularemijom potrebno je invazivno uzorkovanje, budući da je ulkus suv ili netaknut, te ga je nemoguće ili teško diferencirati od neinficirane ubodne papule komarca. Za uzorke dobijene iz rane preporučuje se korišćenje Amies agara sa životinjskim ugljem (166).

Kod tularemijske pneumonije, sputum može biti izvor za zasejavanje kultura, što predstavlja iskustvo zasnovano na nekim starim sporadičnim slučajevima, tako da se zasejavanje sputuma ne radi rutinski. Iako se kulture iz krvi takođe ne sprovode rutinski, *F. tularensis* se ponekada može izolovati iz krvi bolesnika sa febrilnošću nepoznatog porekla (136, 153). Kada se posumnja na rast *F. tularensis* u kulturama, potrebno je obavestiti referentnu laboratoriju o tome zbog daljeg bezbednog rukovanja i dalje identifikacije uzročnika (4).

1.8.2. Imunodijagnostika tularemije

Mikrobiološka dijagnoza tularemije se danas, uglavnom bazira na serologiji, zbog visoko infektivne prirode *F. tularensis*, specijalnih zahteva za kultivaciju i nedostatka standardizovanih, dobro procenjenih PCR protokola. Serološki testovi su takođe neophodni za epidemiološke studije ljudi i životinja i praćenje titrova specifičnih antitela posle vakcinacije.

Testovi za detekciju specifičnih antitela na *F. tularensis* obuhvataju aglutinacione testove (aglutinaciju u epruvetama, mikroaglutinaciju, hemaglutinaciju, ređe brzi test), imunoenzimski (ELISA), indirektni imunofluorescentni test (IIF). Ovo povećanje titra antitela se obično dešava između 2- 4 nedelje nakon početka bolesti. Smatra se da je glavni target za humoralni imuni odgovor, LPS, koji je glavni faktor virulencije (109).

Decenijama je aglutinacioni test od cele ćelije (Widalova reakcija) najšire korišćen test. Modifikacije kao što su uvođenje mikroaglutinacionog testa rezultovale su superiornijim rezultatima (167).

Mikroaglutinacioni test (MAT) je visoko senzitivna (do 100 puta osetljiviji od aglutinacije u epruvetama) i specifičan, a relativno jednostavan, brz i jeftin i reproducibilan. Zasniva se na reakciji aglutinacije, tj. međusobnog slepljivanja bakterijskih čestica do koga dolazi usled vezivanja antitela za antigenske epitope na različitim bakterijskim ćelijama. Jedan aglutinacioni titar ≥ 160 ili mikroaglutinacioni titar ≥ 128 potvrđuje klinički postavljenu sumnju na tularemiju, ali može biti i rezultat prethodne

infekcije (1-5), te se smatra se verovatno pozitivnim. Četvorostruki ili veći porast titra aglutinišućih antitela između akutnog i konvalescentnog seruma je obično potreban za definitivnu dijagnostičku potvrdu bolesti, obzirom da titrovi antitela mogu ostati povišeni godinama i jedan povišen titar ne može biti dovoljan (168). Značajan titar antitela pojavljuje se krajem druge nedelje bolesti, dostiže pik 4. do 5. nedelje i uprkos opadajućoj tendenciji specifična antitela se mogu detektovati i posle 10 godina (111, 169). Mikroaglutinacioni test (MAT) je kod oko 86 % pacijenata pozitivan već u toku druge nedelje. Zato se koristi za ranu i specifičnu dijagnozu tularemije (167, 170). Unakrsne reakcije se jedino mogu videti u serumu bolesnika sa brucelozom i jersiniozom (171). Lažno negativni rezultati se mogu očekivati ako se serumi testiraju u ranoj fazi infekcije; u prve tri nedelje bolesti, MAT je negativan u 30% slučajeva (2).

Aktuelno, aglutinacioni testovi se naširoko upotrebljavaju (172, 173) i jedini su komercijalno dostupni i priznati dijagnostički testovi u mnogim zemljama.

Tokom poslednjih decenija, aglutinacione tehnike su zamenjene imunoenzimskim-ELISA testom (174).

Imunoenzimski-(ELISA) test se danas često koristi za ranu i specifičnu dijagnostiku tularemije. Dokazano je da je ELISA senzitivnija od aglutinacionih testova (174, 175). Njena prednost je u tome što može odvojeno odrediti različite klase antitela IgM, IgG and IgA. Test je visoko osetljiv i specifičan, a njime se mogu detektovati pojedinačne klase specifičnih antitela, što predstavlja preimućstvo, ali u tularemiji može imati limitiranu vrednost. Antitela klase IgM, IgG i IgA se paralelno pojavljuju tokom bolesti i opadaju podjednako sporo (120, 175). Stoga, prisustvo antitela na *F. tularensis*, klase IgM, ne predstavlja pouzdani indikator aktuelne infekcije (4). Mogućnost praćenja odnosa titra IgM i IgG antitela čini ELISA test metodom izbora za dijagnostiku tularemije u endemskim područjima, obzirom na visoku učestalost tularemije i dugotrajnu perzistenciju specifičnih antitela u serumu.

Nekoliko različitih preparata antigena je korišćeno za postizanje imunog odgovora nakon prirodne infekcije ili vakcinacije, kao što su bakterijski sonikat (120, 164, 174), pročišćeni lipopolisaharid (LPS) (174, 177), pročišćeni spoljašnji membranski antigeni (178), drugi ekstrakti ili cele bakterijske ćelije vrsta *F. tularensis* holarctica LVS and *F. tularensis* tularensis SCHU4 (179). Ovi antigeni su korišćeni u aglutinacionim testovima, ELISA-ma i za Western blot (179, 180). Iako različiti autori tvrde da neki od ovih preparata, npr. etar ekstrakti (179) mogu biti superiorniji u odnosu na spoljašnje membranske antigene ili LPS, praktično su svi testovi sposobni da otkriju specifična antitela 5-10 dana od početka simptoma (120, 180) ili postvakcinalno.

U cilju povećanja osetljivosti, urađene su i razne modifikacije ELISA testa. Tako se korišćenjem indirektnog, tzv. sendvič ELISE, uz korišćenje monoklonskih antitela na LPS *F. tularensis*, može postići detekcioni limit od 3pg *F. tularensis* u uzorku (181).

U dijagnostici tularemije se može koristiti i tzv. komplement-fiksirajuća, CF-ELISA. Za pripremu i izvođenje ovog testa neophodni su: antigen, ispitivani serum, komplement i konjugat (enzimski obeležen anti-humani C3c). Međutim, osetljivost i specifičnost CF-ELISA ne razlikuju se značajno od klasičnog ELISA testa (120).

ELISA (usmerena na LPS) kombinovana sa Western-blotom (usmeren na antigen ekstrahovan iz celih mrtvih ćelija) pokazala je veoma dobru senzitivnost i specifičnost za dijagnozu infekcije (182).

Test indirektne imunofluorescencije (IIF) je visoko specifičan i koristi se za detekciju i lokalizaciju specifičnih antitela, ali i antigena kako u serumu obolelih, tako i u drugim kliničkim uzorcima. U osnovi ovog testa je fenomen fluorescencije, tj. pojava da neke supstance, nakon apsorpcije svetlosti jedne talasne dužine, emituju svetlost druge, tj. više talasne dužine. Specifičniji je od mikroaglutinacionog testa, ali ako se koriste poliklonska antitela, moguća je ukrštena reaktivnost sa predstavnicima *Legionella spp.* Ako se monoklonska antitela napravljena na LPS obeleže fluoresceinom i koriste za direktnu detekciju prisustva bakterija u kliničkim uzorcima, senzitivnost i specifičnost imunofluorescentnih testova se povećava (183).

Druge tehnike

Među alternativnim tehnikama za brzu detekciju *F. tularensis* je **brzi imunohromatografski test (ICT)** koji ima limit detekcije od 10^6 - 10^7 bakterija/ml u humanom serumu (184). Ovaj test se može koristiti za dijagnozu tularemije u hitnim stanjima zbog jednostavnog i brzog izvođenja. Nedostatak je relativno niska senzitivnost, pa negativni rezultati ne mogu da isključe tularemiju. Zbog toga svaki sumnjivi slučaj treba testirati senzitivnijim laboratorijskim metodama kao što su visoko senzitivna cELISA i PCR (184). ICT je brz, visoko senzitivan i specifičan test za detekciju antitela na LPS *F. tularensis* iz seruma ljudi (obolelih i vakcinisanih) kao i životinja (svinja, zečeva, miševa). Ovaj brzi test pre svega detektuje IgG antitela koja se javljaju rano tokom humane tularemije.

Na humanim serumima ICT je imao senzitivnost 98,3% i specifičnost 96,5%. Na životinjskim serumima, ukupna senzitivnost je bila 100% a specifičnost 100%. ICT može biti koristan za praćenje uspešne vakcinacije sa subjunit vakcinama ili živim vakcinalnim sojevima koji sadrže lipopolisaharid (npr. LVS) kao i za detekciju seropozitivnih jedinki ili životinja u situacijama epidemije ili u kontekstu epidemiološkog programa praćenja u endemičnim područjima. Prema Splettstoesseru ne-komercijalna in-house imunohromatografija (ICT) je dokazano da je pouzdani test za presumptivnu dijagnozu tularemije ali dalja evaluacija sa humanim serumom je važna za tu potvrdu (185).

Koristeći različite ELISA procedure i brze imunohromatografske testove, bilo je moguće detektovati antigen ne samo u serumu, urinu i organima kao što su slezina, jetra, pluća inficiranih životinja, već i u okolnim uzorcima kao što su voda i mulj (53, 184). Detekcija bakterijskog antigena u urinu inficiranih miševa imunološkim testovima, nije naišla na neku širu primenu (186).

Imunoblot (Western blot) analize na suspektu bakteriju koriste specifična poliklonska ili monoklonska antitela za *F. tularensis* i mogu se koristiti za potvrdu identifikacije organizma. (182, 183, 184).

Metod imunoblota se za sada prevashodno koristi u istraživačke svrhe, za ispitivanje značaja pojedinih antigenskih frakcija u imunskom odgovoru, a mogao bi da se koristi i kao potvrdni test u dijagnostici tularemije (187).

U novije vreme dobijena su i monoklonska antitela koja prepoznaju površne antigene specifične za *F. tularensis*, divlji tip (Schu4) i LVS, i reaguju i sa jednim i drugim u ELISA i aglutinacionom testu. Takođe mogu reagovati sa LVS mikroorganizmima u tkivima

inficiranog miša, što se može detektovati indirektnim imunofluorescentnim testom. Western blot analiza je pokazala da monoklonska antitela reaguju i sa LPS antigenima *F. tularensis*. Ova monoklonska antitela trebalo bi da dalje usavrše metode za detekciju i identifikaciju *F. tularensis* (188, 189). Fluorofor-konjugovana poliklonska ili monoklonska antitela u kombinaciji sa fluorescentnim mikroskopom mogu biti korišćena u presumptivnoj identifikaciji *F. tularensis* u primarnim uzorcima. (190).

1.8.3. Molekularne metode

U svetu se danas daje prednost savremenim metodama molekularne biologije, poput PCR i RNK hibridizacije (191, 192).

Polimeraza chain reakcija (PCR) je primenjena uspešno u brznoj dijagnozi tularemije iz humanih uzoraka (168). Osim što omogućuje postavljanje dijagnoze u ranoj fazi bolesti, pre pojave antitela, a takođe omogućava detekciju *F. tularensis* u različitom biološkom materijalu, PCR je koristan i za praćenje efikasnosti antibiotske terapije (193), kao i u epidemiološkim istraživanjima jer omogućava jednovremenu analizu više uzoraka. Up to date PCR testovi su najkorisniji za dijagnozu tularemije kod pacijenata nakon nekoliko nedelja bolesti i onih kojima je prethodno data antibiotska terapija. Real-time PCR je razvijen da bi razlikovao infekcije izazvane *F. tularensis tularensis* tip A1 i A2 (194).

Nedostaci PCR su lažno-pozitivni i lažno-negativni rezultati, visoka cena testa i nemogućnost izvođenja testa antimikrobne osetljivosti na identifikovanom organizmu. Lažno-pozitivni rezultati se mogu javiti zbog laboratorijske kontaminacije. Ovo naglašava značaj efikasne obuke i kontrolu kvaliteta procedura u PCR dijagnostičkim laboratorijama. Specifičnost PCR za kliničke uzorke trebalo bi da bude visoka, sa retkim lažno pozitivnim rezultatima kod pacijenata kod kojih se ne sumnja da imaju klinički tularemiju (195, 196). Lažno negativni rezultati se mogu javiti u prisustvu inhibitora u kliničkom uzorku, kao što je hem u celom uzorku krvi (22) Konačan ishod PCR-a je da tehnika nije standardizovana između laboratorija (197).

Do sada je konvencionalni PCR uspešno primenjen na uzorcima rana pacijenata obolelih od tularemije, jer je mnogo osetljiviji od kulture. Planovi za njegovu primenu na ostalim humanim uzorcima su obećavajući, pogotovu kada se tularemija razvija bez formiranja antitela (166).

PCR je od dijagnostičkog značaja u suspektnoj ulceroglandularnoj tularemiji dajući brzu i tačnu dijagnozu, pri čemu su njegova specifičnost 96%, senzitivnost 78,3% a pozitivna prediktivna vrednost 99%. Naročito, uzorci iz inkrustriranih lezija starosti do 4 nedelje, kod pacijenata sa tularemijom, bili su PCR pozitivni u visokom stepenu kada su uzeti propisno (196).

Detekcija DNK, tj. dela koji kodira zaštićen lipoprotein *F. tularensis* od 17 - kD, omogućava postavljanje specifične dijagnoze (192, 198). U jedine dve veće studije, obe sa po 40 ispitanika sa ulceroglandularnim oblikom tularemije, korišćenjem uzoraka rane, detektovana je DNK *F. tularensis* kod 73%, odnosno 75% obolelih (166, 195). U prvoj studiji, koristeći multipleksni PCR koji cilja na 16sRNA i tul4 gen za analizu briseva rana, DNK *F. tularensis* je dokazan kod 29 od 40 (73%) serološki potvrđenih slučajeva tularemije (195). U poslednjoj studiji, studiji, PCR (tul4) je direktno kompariran sa kulturom tokom izbijanja ulceroglandularne tularemije u Švedskoj. Mada je PCR dokazano da je mnogo

senzitivniji nego kultura (75% prema 62% kod 40 pacijenata), 25% infekcija uzrokovanih *F. tularensis* bi bilo propušteno da se koristio samo molekularni metod u potvrdi kliničke dijagnoze. Kod 4 od 8 bolesnika sa klinički postavljenom sumnjom na tularemiju i negativnim kulturama i serologijom, detektovana je DNK bakterije. Kao i u slučaju kultura, sekret iz rana nije uvek dostupan, što predstavlja ograničavajući faktor za metodu PCR. Izgleda da se razgradnja DNK tokom transportovanja uzorka ne događa (166).

Prve studije u području Balkana sa genskom indentifikacijom uzročnika, rađene su u Bugarskoj u periodu od 1997 do 2005. gde je utvrđeno postojanje novog genotipa *F. tularensis* kao uzročnika bolesti kod ljudi. Poreklo 10 sojeva iz opisane epidemije ostaje kontroverzno, ali se oni jasno razlikuju od izolata iz drugih delova sveta (30). Po prvi put je uspešno aplikovana PCR tehnika na konjunktivalnom brisu u ispitivanju okuloglandularne tularemije u Bugarskoj (199).

Međutim, iako se ELISA i PCR koriste za detekciju bakterije u kliničkim uzorcima, ove metode nisu adekvatno ocenjene za dijagnozu tularemične pneumonije (22).

Osim korišćenja PCR protokola u kliničkim uzorcima, oni su uspešno primenjeni u detekciji *F. tularensis* u krpeljima ili uzorcima iz okruženja kao što su leševi leminga ili voda iz bunara. (53, 197).

Detekcioni limit TUL4-specifičnog PCR iznosi 10^2 bakterija/ml perifernog seruma i 10^3 do 10^4 bakterija/ml seruma. Mada je pokazano da je PCR (tul4), superioran u odnosu na imunološke analize koje se tiču direktne detekcije *F. tularensis* u serumima ili tkivima iz prirodno inficiranih zečeva (184), PCR studije u humanoj tularemiji su ograničene.

Ispitivani su i brzi testovi kao što su proteomske i imunološke metode za detekciju potencijalnih multipnih, istovremenih bioteorističkih patogena (168, 200). Međutim, u sadašnjosti, brza molekularna dijagnoza tularemije ostaje istraživačka metoda koja nije dostupna mnogim laboratorijama. U slučaju suspektnog bioterorističkog događaja sa *F. tularensis*, trebalo bi obavestiti odgovarajuće vlasti za pomoć u slanju uzoraka specijalizovanoj Nacionalnoj laboratoriji za javno zdravlje, kako bi se direktno dokazao organizam ili primenili drugi brzi dijagnostički testovi (201).

Komentar eksperata:

Optimalni dijagnostički pristup u tularemiji kombinuje tri metodologije: kulturu, PCR i serološko testiranje. Svaki od testova ima posebnu i jedinstvenu upotrebnu vrednost: kultura omogućava antimikrobni test osetljivosti, PCR je koristan jer se *F. tularensis* teško kultiviše, naročito kod pacijenata koji su primali antibiotsku terapiju, i serološki test je koristan u situacijama prolongirane infekcije kada su i kultura i PCR negativni. Izgleda da je PCR obećavajuća tehnika za dijagnozu tularemije, naročito ulceroglandularne forme. Međutim, veće kliničke studije su neophodne da bi se odredile karakteristike PCR-a, naročito kod raznovrsnih kliničkih uzoraka kao što su krv, aspirati limfnih nodusa ili sputum (134). Dok direktna antigen detekcija ELISA-om ili imunofluorescentnim testom može omogućiti ranu presumptivnu dijagnozu tularemije, PCR tehnike još uvek čekaju dalju evaluaciju.

1.8.4. Patohistološka dijagnostika i imunohistohemija

Dijagnostički uzorci obolelih od tularemije obuhvataju uvećane, nekrotične limfne čvorove i briseve ili biopsijske uzorke sa potencijalnih ulaznih vrata (konjunktiva, guša). Ovi

uzorci mogu biti zasejani, kultivisani ili analizirani histopatološki. U svim formama tularemije, primarni drenirajući limfni čvorovi pokazuju limfadenitis u vidu geografskih polja nekroze okružena palisadnim, neutrofilnim i granulomatoznim inflamatornim infiltratom (202). Diferencijalno dijagnostički, dolaze u obzir tuberkuloza, *BSG-lymphadenitis*, bolest mačjeg ogreba (CSD), *lymphogranuloma venerum*, *yersinia lymphadenitis*, toksoplazmoza, bruceloza, koji većinom imaju centralni absces i nekrozu u granulomu za razliku od neinfektivnih granulomatoznih limfadenitisa kao kao što je sarkoidoza, Hočkinov i ne-Hočkinov limfom, koji retko imaju absces i nekrozu u centru granuloma (203). U slučaju tuberkuloze organizmi u nekrotičnoj regiji se histološki detektuju Ziehl-Nielsen bojenjem. U čak 12 do 36% slučajaja granulomi nemaju specifičnu etiologiju, pa bi sa novim molekularnim metodama ovaj procenat mogao značajno da se smanji (204).

Mikroorganizmi se teško dokazuju specijalnim bojenjima, međutim imunohistohemija i direktni fluorescentni test su uspešno primenjeni na formalin-fiksiranom tkivu za dokazivanje bakterije. Imunohistohemijsko bojenje humanih histoloških uzoraka i njegov značaj u odsustvu kulture ili drugih uzoraka pogodnih za PCR otkrio je Guarner (205).

Imunohistohemija, imunoelektronska mikroskopija i imunofluorescentna specifična antitela su takođe pouzdane tehnike sa detekciju patogena u ispljuvku, eksudatu, kao i u formalin-fiksiranom, parafinskom tkivu (206).

Imunohistohemijska identifikacija *F. tularensis* u formalin-fiksiranom tkivu je potvrđena u eksperimentalnoj studiji Zejdnera kao pouzdana metoda za postavljanje brze etiološke dijagnoze tularemije. Ova metoda se predlaže za brzu etiološku dijagnozu i na humanom materijalu, u uslovima kada sveža tkiva nisu dostupna za izolaciju i identifikaciju uzročnika (206).

Imunohistohemijske studije, fluorescentna antigen testiranja i imunoelektronska mikroskopija se koriste za dijagnozu *F. tularensis*, ali nijedna od ovih metoda nije u širokoj upotrebi i dostupna u svakodnevnoj praksi.

1.9. Terapija

Antimikrobna terapija bi trebalo da se primeni kod svih pacijenata kod kojih je dijagnoza tularemije suspektna ili potvrđena, mada se u nekim slučajevima može desiti i spontana rezolucija u odsustvu specifične terapije (137). Rana efikasna terapija je povezana sa manjim morbiditetom. Mortalitet od tularemije je smanjen od čak 60% kod ozbiljno bolesnih pacijenata sa pneumoničnom ili tifoidnom formom (pre uvođenja streptomocina) do manje od 5% ukupno (u eri antibiotika) (165, 207).

Antimikrobi sa dobro ustanovljenom kliničkom efikasnošću uključuju aminoglikozide streptomycin i gentamicin, tetracikline, hloramfenikol i fluorohinolone. Beta-laktami, makrolidi, linkozamidi i trimoksazol nisu pogodni za lečenje tularemije. Beta-laktami su povezani sa kliničkim neuspehom, uprkos povoljnoj osetljivosti in vitro (208). Mada je saopštena uspešna primena eritromicina, on se ne smatra pouzdanom terapijom i rezistentni sojevi su prevalentni u delovima Evrope i Rusiji (168, 207).

Od uvođenja streptomocina, aminoglikozidi su postali lekovi prve linije u terapiji teških slučajeva tularemije (209, 210). Aminoglikozidi imaju baktericidno dejstvo i stopa relapsa je

niska. Ovi agensi pokazuju željene minimalne inhibitorne koncentracije (MICs) kada se testiraju koristeći standardizovane in vitro metode protiv *F. tularensis* (211). Međutim nije bilo prospektivnih kontrolisanih kliničkih trajala koji bi komparirali efikasnost različitih režima lekova ili definisali optimalnu dužinu terapije kod tularemije. Glavni nedostatak ove terapije je njihova toksičnost i nužnost za parenteralnim davanjem.

Prema preporukama Radne grupe za civilnu biozaštitu lek izbora za terapiju tularemije je streptomycin ili gentamicin, a alternativni lek doksiciklin, ciprofloksacin ili hloramfenikol i za odrasle i za decu (Tabela 1) (165).

Tabela 1. Terapija tularemije prema preporukama Radne grupe za civilnu biozaštitu

Kategorije pacijenta Odrasli (lek izbora)	Streptomycin 1g im, 2xdnevno, 10dana ili Gentamicin 5mg/kg iv, 1 x dnevno, 10 dana
Odrasli(alternativa)	Doksiciklin 100mg iv, 2 x dnevno, 14-21dana Hloramfenikol 115mg/kg iv, 4 x dnevno, 14-21dana Ciprofloksacin 400 mg iv, 2 x dnevno, 10 dana
Deca (lek izbora)	Streptomycin 15 mg/kg im, 2 x dnevno, 10 dana (max 2g dnevno) Gentamicin 2, 5 mg/kg im ili iv 3 x dnevno, 10 dana
Deca (alternativa)	Doksiciklin 2, 2 mg/kg iv, 2 x dnevno, 14-21 dana, Ciprofloksacin 15 mg/kg iv, 2 x dnevno, 10 dana (max 1g dnevno) Hloramfenikol 15 mg/kg iv, 4 x dnevno, 14-21 dana (max. 4 g dnevno)

Uopšteno, pristup terapije se zasniva na zapažanjima prateći frekvencu izlečenja i relapsa koristeći različite antimikrobne agense (212). Streptomycin ostaje lek izbora za sve forme tularemije osim meningitisa zbog njegove visoke stope izlečenja i minimalnih relapsa. Gentamicin je prihvatljiva alternativa, može se davati intravenski i češće je dostupan (24). Takođe, doziranje gentamicina jednom dnevno je primenjeno uspešno i može biti opcija za vanbolničko lečenje (213). Generalno, trajanje terapije aminoglikozidima je 7 do 10 dana, ali bi trebalo biti prilagođeno kliničkim simptomima i znacima uključujući rezoluciju temperature i može se proširiti na 14 dana u ozbiljnim slučajevima za pacijente čiji je odgovor na terapiju odložen. Neki preporučuju kombinaciju jednog aminoglikozida i fluorohinolona, za terapiju ozbiljne bolesti sem meningitisa, mada ovo nije dokazano da je superiornije od samog aminoglikozida (214).

Oralni agensi se mogu koristiti za terapiju pacijenata sa blagom ili srednje teškom bolešću. Lekovi izbora su ciprofloksacin ili doksiciklin. U blažim pedijatrijskim slučajevima tularemije, teško je izabrati odgovarajući efikasni antibiotik za peroralno davanje. Zbog neželjenih efekata tertraciklina, decu mlađu od 8 godina bolje je hospitalizovati da bi parenteralno primali aminoglikozide.

Tetraciklini imaju bakteriostatsko dejstvo i udruženi su sa relativnom visokom stopom relapsa od 12% (stopa izlečenja 88%) (212). Doksciklin predstavlja najpropisivaniji lek za većinu slučajeva B tularemije. Kako bi se umanjio rizik od relapsa, a lečenje bakteriostatskim lekovima treba produžiti kako bi se pokrivale dve ili čak tri nedelje od početka bolesti. Pre tog perioda, imunski odgovor posredovan ćelijama još nije razvijen u dovoljnoj meri, te se infekcija ne može uspešno lokalizovati imunitetom domaćina (105, 106)

Hinoloni predstavljaju noviju opciju za lečenje tularemije. Ovi antibiotici imaju prednost u odnosu na ostale zato što deluju intracelularno (unutar makrofaga i polimorfonukleara), baktericidno i mogu se primenjivati oralno. Dosadašnja iskustva su pokazala da se fluorohinoloni mogu uspešno primenjivati u lečenju svih kliničkih formi tularemije (215, 216). U *in vitro* testovima, hinoloni su se pokazali efikasnim u lečenju infekcije izazvane *F. tularensis*. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) se kreću u opsegu 0,01 - 0,1 mg/L⁻¹, što je dvostruko manje doze koje se postižu u tkivima pri uobičajenom doziranju. Zapravo, odnos između MIC i koncentracije leka postignute u tkivima su mnogo povoljnije kod hinolona nego drugih lekova (215, 216, 217,218). Fluorohinoloni su korišćeni uspešno za lečenje infekcija *F. tularensis* podvrsta holarctica, uključujući imunokompromitovane pacijente, mada je visoka stopa relapsa nađena u jednoj maloj španskoj studiji (138, 219, 220). Objavljenih kliničkih iskustava sa upotrebom fluorohinolona za infekcije *F. tularensis* subspecies *tularensis*, je manje ali je podvrsta *tularensis* osetljiva na ove agense *in vitro* (211). Među 14 slučajeva tularemije Misuriju, stopa izlečenja ciprofloksacinom bila je 86% (34). Neki preporučuju fluorohinolone pre tetraciklina za oralnu terapiju tularemije zbog niže verovatnoće relapsa (138, 214).

Ciprofloksacin 7.5 mg/kg do 10 mg/kg dva puta dnevno je pokazano da je efikasan u terapiji ulceroglandularne tularemije kod 12-oro dece uzrasta 1 do 10 godina (215) i njegova uspešna primena je prikazana u ranijim slučajevima (151).

Izveštaji o ciprofloksacinu kao terapiji prve linije kod oko 80 bolesnika sa različitim formama tularemije tipa B, pokazale su visoku efikasnost ovog leka (215, 219, 221, 222). Štaviše, levofloksacin je sa uspehom davan dvojici imunodeficitarnih bolesnika sa teškim oblikom B tularemije. U nekim slučajevima objavljen je slab učinak ciprofloksacina (220). Kao objašnjenje navodio se dug interval od početka bolesti do uključenja terapije, što se danas navodi kao faktor udružen sa slabim ishodom bolesti, nezavisno od toga koji je lek korišćen u terapiji (uključujući i streptomycin). Međutim, levofloksacin se pokazao kao uspešan u lečenju ozbiljne forme tularemije tipa B kod dva kompromitovana bolesnika (223).

Danas postoji porast u korišćenju hinolona u raznim pedijatrijskim bolestima. U ogleđima na životinjskim modelima pokazalo se da je rizik za nastajanje artropatije kod dece mali, takoreći zanemarljiv (224, 225). Sveukupno gledajući, izgleda da hinoloni predstavljaju obećavajuću opciju u tretmanu tularemije, nezavisno od starosti bolesnika i podvrste *F. tularensis* (4).

Tularemični meningitis bi trebalo tretirati jednim aminoglikozidom kombinovano sa hloramfenikolom ili doksiciklinom, pošto nivoi aminoglikozida u cerebrospinalnoj tečnosti mogu varirati. Streptomycin sa hloramfenikolom je kombinacija koja je za sada najuspešnijaja (226). Streptomycin sa doksiciklinom ili gentamicin sa doksiciklinom su takođe uspešne kombinacije za meningitis (226). Uopšteno, trajanje terapije za tularemični meningitis je 14-21 dan, prilagođeno kliničkim simptomima i znacima, uključujući rezoluciju temperature.

Hloramfenikol ne bi trebalo koristiti u terapiji drugih formi tularemije zbog dostupnih bezbednijih alternativa sa većom efikasnošću.

Relapsi se mogu javiti nakon svake terapije ali su najčešći kada se tetraciklimi (bakteriostatski antibiotici) koriste kraće od 14 dana. Ako se relaps desi nakon doksiciklina, on se može dati ponovo ali na duži period (21 dan); kao alternativa može se primeniti aminoglikozid. Ovaj pristup ne mora biti efikasan za bioterorističke sojeve, obzirom da ovi organizmi mogu biti modifikovani za rezistenciju na uobičajeno korišćene agense.

Hirurška terapija tularemije je potrebna za drenažu supurativnih limfnih nodusa i-ili drenažu empijema (201).

U slučaju adekvatnog i pravovremenog tretmana tularemija se leči relativno jednostavno i brzo, a posle izlečenja ostaje dugotrajna imunost. Ipak, ponekad, usled kašnjenja u postavljanju dijagnoze, težine i komplikacija bolesti, tularemija i pored tretmana može imati fatalan ishod (<1%). Međutim, ukoliko antibiotski tretman izostane, stopa mortaliteta može doseći 8%, a u slučaju težih formi bolesti (pulmonalna i tifoidna) dostiže čak do 30%.

1.10. *F. tularensis* kao biološki agens

Prema kategorizaciji bioloških agenasa od strane Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC), tularemija spada u kategoriju A bioloških agenasa zajedno sa antraksom, velikim boginjama, kugom, virusnim hemoragičnim groznicama, toksinom botulinom i pandemijskom influencom.

Radna grupa za biološku zaštitu građana od bioterorističkih agenasa u Americi, smatra *F. tularensis* opasnim potencijalnim biološko-borbenim sredstvom jer je ekstremno infektivna, lako se diseminuje i lako dovodi do bolesti ili smrti.

Za eventualan bioteroristički napad bi mogao biti upotrebljen soj francisele u vidu aerosola, koji je otporan na konvencionalnu antibioterapiju, a putevi infekcije ciljne populacije bi bili: pluća, rane na koži ili ingestija.

Godine 1969. Svetska Zdravstvena Organizacija je razvila model za predviđanje ishoda bioterorističkih napada. Izračunato je da bi aerosolizacijom 50 kg bakterije *F. tularensis* u metropoli sa populacijom od 5 miliona ljudi, rezultovalo onesposobljavanjem 250.000 individua i nekih 19.000 smrtnih slučajeva. Očekivalo bi se da bolest perzistira nekoliko nedelja a relapsi bolesti bi se javljali sledećih nedelja ili meseci.

Ovaj model je takođe iskorišćen od strane CDC-a za procenu troškova bioterorističkog napada *F. tularensis* i zaključeno je da bi ekstremna infektivnost patogena dovela do veoma visokih troškova; 5,4 biliona na 100,000 zahvaćenih individua. Visoka cena i visok morbiditet opravdavaju uključivanje *F. tularensis* na listu agenasa sa najvišim prioritonom (3).

Među svim biološkim agensima samo je 6 vakcina ili antiseruma koje su za sada licencirane u SAD (protiv antraksa, velikih boginja, botulizma, kuge, žute groznice i tuberkuloze) (227).

1.11. Prevencija

Laboratorijski radnici i druge odrasle osobe, koji imaju suspektno ili dokazano visoko rizično izlaganje tularemiji trebalo bi da piju ciprofloksacin 50mg ili doksiciklin 100 mg dva puta dnevno 14 dana. Decu bi trebalo opservirati u smislu temperature i drugih simptoma i znakova bolesti bez profilaktičke primene antibiotika.

Svim osobama identifikovanim u inkubacionom periodu, nakon ekspozicije *F. tularensis* kao biološkom oružju trebalo bi dati oralno ciprofloksacin ili doksiciklin 14 dana, Doza ciprofloksacina za decu je 10 do 15mg/kg dva puta dnevno (ne više od 1.5g dnevno). Doza doksiciklina za decu je 2-4 mg/kg u jednoj ili dve doze dnevno (maksimum 100mg dva puta dnevno). Doksiciklin kod dece mlađe od 8 godina bi trebalo dati samo u slučaju kada je korist od terapije veća od rizika.

Do sada nije dostupna tularemična vakcina. Ranije korišćena vakcina pripremljena od LVS *F. tularensis holarctica* nije više dostupna zbog nepoznatih mehanizama slabljenja, stabilnosti i produkcije. Aktivno se radi na istraživanju nove subjedinične vakcine, nove žive vakcine sa definisanom atenuacijom i savršenije LVS vakcine (201).

1.11.1. Vakcine

Vakcinacijom živim oslabljenim sojem *F. tularensis* (LVS) moguće je stvoriti imunospocificnu zaštitu. LVS vakcina obezbeđuje zadovoljavajući imunitet na respiratorni oblik tularemije i ublažava tok ulceroglandularnog oblika bolesti (121). Osobe vakcinisane LVS vakcinom, poseduju T-ćelijski odgovor na *F. tularensis*, koji može trajati bar deset godina (112). Zbog teškoća u standardizovanju živih vakcina, LVS vakcina nije više dozvoljena u zapadnim zemljama, tako da trenutno nema dostupnih efikasnih vakcina (165).

Šanse za razvijanje jedne subcelularne, dobro definisane vakcine protiv tularemije, još nisu izvesne. Zbog veličine uključenih bakterijskih proteina koje reaguju sa T ćelijama kao i odnosa T-ćelijskih epitopa sa glavnim histokompatibilnim kompleksom haplotipa potrebno je napraviti kompleksan koktel bakterijskih polipeptida koji će izazvati reakciju adekvatnih T-limfocita. Ovo samo po sebi nije dovoljno, što ilustruje činjenica da je vakcina sa umrtvljenim neprepađenim preparatom *F. tularensis* podbacila, čak i u prisusutvu snažnog adjuvansa (228). Potrebno je shvatiti preduslove za indukcije efikasnog T-ćelijskog odgovora *in vivo*, uključujući i mere za postizanje adekvatne proizvodnje citokina (229, 230).

Vakcinacija ljudi živim oslabljenim sojem *F. tularensis* (LVS) dovodi do indukcije humoralne i celularne imunosti (sinteza IgM, IgG i IgA antitela, kao i aktivacija T limfocita) i efikasne zaštite domaćina (97, 108, 231, 232). Osobe vakcinisane LVS vakcinom, poseduju T-ćelijski odgovor na *F. tularensis* koji može trajati bar deset godina. LVS vakcina obezbeđuje zadovoljavajući imunitet u sprečavanju respiratorne forme tularemije i ublažava tok ulceroglandularnog oblika bolesti (4). Zbog teškoća u standardizovanju živih vakcina, LVS vakcina nije više dozvoljena u zapadnim zemljama tako da trenutno nema dostupnih efikasnih vakcina (165)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Naučno-radna hipoteza

Polazeći od stava da se kod kliničke sumnje na tularemiju definitivna dijagnoza potvrđuje laboratorijskim metodama kao što su: serološke, metode za dokazivanje antigena i genoma *F.tularensis*, postavljene su sledeće radne hipoteze:

1. Istovremenom komparativnom primenom više imunodijagnostičkih testova kao što su serološki testovi: Serion ELISA IgG/IgM, Serazym ELISA i ELISA in house; imunohromatografski test (ICT); potvrdni test (Western-blot); imunohistohemijska metoda indirektno imunoperoksidaze (IIP), kao i korišćenjem molekularnih metoda (PCR) povećaće se procenat mikrobiološke i patohistološke potvrde tularemije posebno kod serološki nejasnih i nedijagnostikovanih slučajeva. Na ovaj način se omogućava postavljanje i retrogradne dijagnoze tularemije.
2. Testiranjem seruma obolelih od tularemije na prisustvo antitela IgM i IgG klase *F. tularensis*, primenom ELISA metode, u periodu praćenja od 1 do 11 god od početka bolesti, omogućava se određivanje aktuelnog serološkog statusa bolesnika tj. prisustva specifičnih antitela IgG i IgM klase i procenjuje u odnosu na aktuelnu kliničku sliku i prethodno preležanu bolest.
3. Pravovremeno postavljena dijagnoza i adekvatno sprovedena terapija u većini slučajeva sprečava pojavu komplikacija (apscedirajući i recidivirajući limfadenitis) kod bolesnika. Pojava recidivirajućeg limfadenitisa posle više godina je posledica specifičnog imunskog odgovora domaćina na infekciju, a ne neadekvatno sprovedenog lečenja.

2.2. Ciljevi istraživanja

Na osnovu formulisanih hipoteza određeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrđivanje korelacije između rezultata ispitivanja imunodijagnostičkim, histološkim imunohistohemijskim i molekularnim metodama, kao i određivanje značaja navedenih testova u dijagnostici i proveru uspeha terapije obolelih od tularemije.
2. Praćenje i određivanje serološkog statusa obolelih od tularemije u periodu od 1 do 11 godina od početka obolevanja.
3. Procena efikasnosti primenjene antibiotske terapije kod obolelih od tularemije.

3. METODOLOGIJA RADA

Osnovni metodološki postupak zasniva se na komparativnoj, prospektivnoj i manjim delom retrospektivnoj studiji. Vrsta naučnog istraživanja je klinička, primenjeno-razvojna studija.

3.1. Bolesnici i materijal

Ispitivanjem je obuhvaćena grupa od 113 bolesnika obolelih od tularemije u periodu od početka 1999. do kraja 2011. i većinom hospitalizovanih na Klinici za zarazne bolesti Kliničkog sentra u Nišu. Kontrolnu grupu je činio 111 ispitanik, od toga 31 bolesnik sa diferencijalnom dijagnozom limfadenopatije različite geneze. Ostalo su činili serumi 80 ispitanika obezbeđeni od strane Instituta Friedrich Loeffler, Jena, u Nemačkoj gde je sproveden veći deo istraživanja, i to: 20 obolelih od bruceloze, 30 obolelih od jersinioze, 20 dobrovoljnih davalaca krvi i 10 obolelih kod kojih je isključena bruceloza. Seropozitivni i seronegativni uzorci na brucelu obezbeđeni su donacijom iz Libana.

Oboleli od tularemije su klinički observirani i serološki praćeni odgovarajućim testovima, u periodu od 1 do 11 godina od početka oboljevanja. Kod novootkrivenih bolesnika uzimani su parni uzorci seruma: prvi serum od 2. do 4. nedelje od početka bolesti, a drugi od 4 do 8. nedelje od početka bolesti.

Prilikom dijagnostičke obrade bolesnika od materijala korišćen je sledeći materijal: serum i biopat limfnog čvora. Ukupno je ispitano 270 uzoraka seruma, od toga 189 seruma suspektnih na tularemiju i 111 seruma iz kontrolne grupe i 26 bioptata limfnih nodusa.

Istraživanje je urađeno u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije i njenih amandmana. Svi učesnici ispitivanja potpisali su informativni pristanak za učešće u studiji i saglasnost za dijagnostička ispitivanja. Ispitivanje je odobreno od strane etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu, odluka br.01-4608-3.

3.2. Metode

Kod svih pacijenata je obavljeno, pored kliničko-epidemiološkog i mikrobiološko-imunodijagnostičko ispitivanje. Uzoci koji su uzeti od obolelih ekstirpacijom ili punkcijom limfnih čvorova analizirani su patohistološkim, imunohistohemijskim i molekularnim metodama.

3.2.1. Serološki- imunodijagnostički testovi:

1) **Serion ELISA classic *Francisella tularensis* IgG** i

2) **Serion ELISA classic *Francisella tularensis* IgM**, komercijalni testovi, poreklom iz Instituta Virion/Serion, Würzburg, Nemačka, primenjeni su na kontrolnim serumima svih bolesnika uzetim u periodu od 1 do 11 godina nakon oboljevanja radi kontrole i praćenja nivoa IgM i IgG antitela. To su kvalitativni i kvantitativni testovi za određivanje humanih antitela klase IgM i IgG prema lipopolisaharidima (LPS) *F. tularensis* u serumu i plazmi. Test se koristi za dijagnozu tularemije, praćenje efikasnosti vakcinacije i određivanje

imunološkog statusa pre imunizacije radi izbegavanja sprovođenja vakcinacije i kao pomoćno sredstvo pri epidemiološkim ispitivanjima.

Princip testa: Mikrotitarske čašice obložene su antigenima, što čini čvrstu fazu. Uzorak pacijenta dodaje se u čašice i antitela specifična za prisutni antigen vezuju se za čvrstu fazu. Nakon odstranjivanja nevezanog materijala, dodaju se antihumana IgG ili IgM antitela konjugovana sa enzimom (alkalna fosfataza) koja reaguju sa nastalim imunim kompleksom. Nakon odstranjivanja viška konjugata ispiranjem dodaje se odgovarajući supstrat (paranitrofenilfosfat) koji reaguje sa konjugovanim enzimom pri čemu nastaje obojeni proizvod. Intenzitet boje proporcionalan je nivou vezanih specifičnih antitela i meri se fotometrijski. Eventualno prisustvo reumatoidnog faktora (nespecifičnih IgM antitela) koji mogu da uzrokuju lažno negativne rezultate kod IgM testa, uklonjeno je korišćenjem apsorbenta reumatoidnog faktora.

Interpretacija rezultata Serion ELISA classis *Francisella tularensis* IgG/IgM:

Pozitivan rezultat	>15 U/ml
Graničan	10-15 U/ml
Negativan	< 10 U/ml

3) **Serazym Anti-*Francisella tularensis* ELISA**, komercijalni, kvantitativan i kvalitativan test poreklom iz Seramun Diagnostica, Heidesee OT Wolzig, Nemačka, koristi se za detekciju svih klasa antitela.

Interpretacija rezultata **Serazym Anti-*Francisella tularensis* ELISA**:

Pozitivan rezultat	>0.25 U/ml
Granični	0.2-0.25 U/ml
Negativan	< 0.2 U/ml

4) **VIRapid-imunohromatografski test (ICT)** ili brzi test, poreklom iz Vircell S.L, Santa Fé, Španija je komercijalni, kvalitativan test za detekciju anti-*Francisella tularensis* antitela, pre svega IgG klase, primenjen kao komparativni test na svim kontrolnim serumima bolesnika.

Princip testa: Ovaj test je baziran na LPS dobijenom iz *F. tularensis*, koja je porasla na čokoladnom agaru, potom je ekstrahovan metodom vruće fenol-vode. LPS se adsorbuje i na konjugatu i na test liniji. Kontrolna linija služi za proveru performansi testa. Rezultati se čitaju posle inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Jasna crvena test linija je pozitivan test. Negativni serumi ne pokazuju reaktivnost na test liniji u ICT.

5) **In-house ELISA**, domaći test, poreklom iz Instituta Friedrich-Loeffler, Jena, Nemačka, koristi se za detekciju pre svega IgG *F. tularensis*.

Metoda je modifikovana po Porsch-Ozcürümez (11)

Princip testa: mikrotitarske čašice su obložene pročišćenim LPS dobijenim iz *F. tularensis subsp. holarctica* (Micromun, Nemačka). Kao sekundarno antitelo korišćen je kozji anti-humani IgG konjugovan peroksidazom. Cut off je 0.77. Uzorci sa OD 450[>] 0.77. su smatrani pozitivnim.

6) **Western-blot** ili potvrdni test je primenjen na većini uzoraka seruma. Rađen je na Institutu Friedrich-Loeffler, Jena, Nemačka Metoda je modifikovana po Schmitt-u (10).

F. tularensis LPS je dobijen iz Micromuna (Greifswald, Nemačka). Kao sekundarno antitelo je korišćen pročišćen rekombinantni protein A/G, obeležen alkalnom fosfatazom.

U ispitivanim serumima proveravano je eventualno prisustvo ukrštenih antitela na antigene bakterije *Brucella spp.* testovima BAB i Wright kao i na antigene *Yersinia spp.*, *Yersinia recomLine* ELISA testom.

3.2.2. Imunohistohemijske metode:

Za patohistološka ispitivanja biopsijskog materijala koji je fiksiran u 10% formalinu i rutinski obrađivan, kao i za nefiksiran, svež biopsijski materijal, primenjene su osim klasičnog bojenja hematoksilin-eozinom (HE) i imunohistohemijske metode za identifikaciju lipopolisaharidnog antigena *F. tularensis* primenom monoklonskih antitela.

Indirektna imunoperoksidazna metoda za *Francisella tularensis* korišćenjem primarnih monoklonskih antitela na *Francisella tularensis*: mab 3FT6 i mab FT 11/1/1, kao i negativne kontrole- mab C16 na BVDV (kravlji dijarejalni virus) rađena je na Institutu Friedrich-Loeffler u Nemačkoj.

MAB 3FT6 (Hyttest, Finska, www.hyttest.fi)

Monoklonalni mišji anti-*Francisella tularensis* LPS je mešavina dva monoklonska antitela T14 i FB11.

Specifičnost: MAb T14 reaguje sa LPS *F. tularensis*. MAb FB11 prepoznaje LPS virulentnog i vakcinalnog soja *F. tularensis*.

MAb 3FT6 ne daje ukrštenu reakciju sa *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, *Br. ovis*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *V. cholera*, *E. coli*, *Fr. novicida*.

MAb izotipovi: IgG2 za Mab FB11 i IgG3 za Mab T14

Primena: Monoklonska antitela T14 i FB11 se mogu koristiti za detekciju antigena *F. tularensis* u ELISA i imunofluorescentnim tehnikama.

MAB FT11/1/1 (Greiser-Wilke et al., 1989)

Napravljen je protiv oslabljenog soja *F. tularensis tularensis* (*F. tularensis* ATCC6223). Ima visok afinitet za *F. tularensis* 6SVA (Robert Koh Institut, Berlin) a nizak afinitet za *F. tularensis* (ATCC6223). Reaguje sa multipnim lancima između 40 i 116 kD antigenih determinanti na 0 antigenu LPS polisaharida. Ne reaguje ukršteno sa *Brucella spp.*, *Y. enterocolitica* (0:9), *Y. pseudotuberculosis*. Pripada IgG1 izotipu.

Princip metode: Endogena peroksidaza je blokirana tokom inkubacije u rastvoru metanol/hidrogen peroksid. Antigen je otkriven mikrotalasnim zagrevanjem u citratnom buferu (mab FT 11/1/1, mab C16) ili digestijom pomoću proteinaza K (mab 3FT6). Nespecifično vezivanje je blokirano 20-to minutnom inkubacijom sa 10% ovčijim serumom inaktivisanim toplotom. Bioplati su inkubirani sa primarnim antitelima 60 minuta. Kao sekundarno antitelo korišćen je ovčiji anti-mišji IgG obeležen peroksidazom. Trajanje inkubacije je još 60 minuta. Pozitivna reakcija je razvijanje crvene boje za razliku od nespecifične braon-crne precipitacije. Za pozitivnu kontrolu uzet je bioplat slezine kunića obolelog od tularemije.

3.2.3. Molekularne metode:

Polymerase chain reaction (PCR) - tehnika amplifikacije DNA je primenjena na uzorcima zamrznutih tkiva limfnih nodusa, za direktno dokazivanje prisustva *F. tularensis* u ispitivanom materijalu, a rađena je na Institutu Friedrich-Loeffler u Nemačkoj.

3.2.4. Mesto istraživanja

Navedena istraživanja obavljena su na Klinici za zarazne bolesti KC Niš, u ambulantomama Domova zdravlja opština Sokobanja, Pirot i Aleksinac, u laboratoriji Neolab, Institutu za patologiju KC Niš i u Federalnom Veterinarskom Institutu za bakterijske bolesti i zoonoze-Friedrich-Loeffler, Jena, Nemačka.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja su sistematizovani i prikazani tabelama i grafički (Excel 2007, Word 2007), a obrađeni su statističkom metodom deskriptivne i kvantitativne analize (SPSS 16.0 for Windows 2007). Poređenje apsolutnih frekvencija vršeno je Hi kvadrat (χ^2) testom ili kada je jedna od očekivanih frekvencija manja od pet, Fišerovim testom egzaktne verovatnoće. Poređenje aritmetičkih sredina dva uzorka vršeno je t-testom ili *Mann-Whitney*-evim U testom u zavisnosti od distribucije podataka. Upoređivanje više grupa vršeno je ANOVA testom ili *Kruskal-Wallis*-ovim testom u odnosu na distribuciju podataka.

Poređenje dijagnostičkih rezultata imunoloških testova vršeno je na osnovu tabele kontigencije 2x2, u kojoj su ispitanici klasifikovani kao pozitivni ili negativni na osnovu zlatnog standarda i kliničkog pregleda. Za procenu tačnosti ispitivanih dijagnostičkih metoda upotrebljeni su testovi dijagnostičke senzitivnosti, specifičnosti, dijagnostičke efikasnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV).

Senzitivnost je mera tačnosti testa koja se odnosi na populaciju bolesnika kod kojih bolest postoji, tj. sposobnost testa da identifikuje one ispitanike koji po zlatnom standardu imaju bolest. Senzitivnost testa je izračunata po formuli:

$$Se = \frac{TP}{TP + FN}$$

Specifičnost testa je mera tačnosti koja se odnosi na populaciju bolesnika kod kojih bolest ne postoji, odnosno sposobnost testa da isključi postojanje poremećaja kod onih bolesnika koji nemaju bolest. Specifičnost testa određena je po formuli:

$$Sp = \frac{TN}{FP + TN}$$

Dijagnostička tačnost (efikasnost testa) određena je po formuli:

$$Efikasnost = \frac{TP + TN}{N}$$

Pozitivna prediktivna vrednost predstavlja verovatnoću da ciljna bolest postoji ako je test pozitivan. Pozitivna prediktivna vrednost određena je po formuli:

$$PPV = \frac{TP}{TP + LP}$$

Negativna prediktivna vrednost pokazuje koliko ispitanika sa negativnim testom nema ciljnu bolest. Ova vrednost se izračunava po sledećoj formuli:

$$NPV = \frac{TN}{LN + TN}$$

Stepen postignute dijagnostičke saglasnosti između različitih imunoloških testova je određen Kohenovim *kappa* (k) koeficijentom. *Kappa* koeficijent interpretiran je prema skali Landisa i Kocha.

Vrednost K	Stepen saglasnosti
<0	Bez saglasnosti
0,01 – 0,20	Neznatna saglasnost
0,21 – 0,40	Dovoljna saglasnost
0,41 – 0,60	Umerena saglasnost
0,61 – 0,80	Značajna saglasnost
0,81 – 0,99	Skoro potpuna saglasnost
1	Potpuna saglasnost

4. REZULTATI

4.1. Epidemiološke karakteristike tularemije

Kliničko-epidemiološko istraživanje je obuhvatilo 144 bolesnika, od toga 113 obolelih od tularemije i kontrolnu grupu od 31 bolesnika sa diferencijalnom dijagnozom tularemije infektivne i neinfektivne geneze.

Tabela 1. Distribucija obolelih od tularemije hospitalizovanih na Klinici za zarazne bolesti KC Niš, po uzrastu i polu u periodu od 1999 do 2011.

Uzrasna grupa (godine)	Pol	Oboleli od tularemije		Kontrolna grupa		Ukupno	
		n	%	n	%	n	%
0 - 6	M	1	0,9	1	3,2	2	1,4
	Ž	-	-	1	3,2	1	0,7
	Ukupno	1	0,9	2	6,5	3	2,1
7 - 19	M	12	10,6	4	12,9	16	11,1
	Ž	7	6,2	6	19,4	13	9,0
	Ukupno	19	16,8	10	32,3	29	20,1
20 - 59	M	34	30,1	6	19,4	40	27,8
	Ž	38	33,6	7	22,6	45	31,2
	Ukupno	72	63,7	13	41,9	85	59,0
≤60	M	7	6,2	3	9,7	10	6,9
	Ž	14	12,4	3	9,7	17	11,8
	Ukupno	21	18,6	6	19,4	27	18,8
Ukupno	M	54	47,8	14	45,2	68	47,2
	Ž	59	52,2	17	54,8	76	52,8
	Ukupno	113	100,0	31	100,0	144	100,0

$p < 0,05$

Rezultati epidemiološkog istraživanja su sledeći: u grupi obolelih od tularemije je bilo 54 muškaraca (47,8%) i 59 žena (52,2%), od kojih je 72 pacijenta (63,7%) bilo starosti od 20 do 59 godina. Prosečna starost obolelih od tularemije iznosila je $42,04 \pm 18,90$ godina. Kontrolnu grupu je činilo 14 muškaraca (45,2%) i 17 žena (54,8%), od kojih je 13 osoba (41,9%) bilo starosti od 20 do 59 godina. Prosečna starost pacijenata u kontrolnoj grupi iznosila je $36,48 \pm 22,66$ godina. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji bolesnika prema polu ($\chi^2=0,07$, $p=0,955$), a postoji statistički značajna razlika u starosti pacijenata između ove dve ispitivane grupe ($\chi^2=8,46$, $p=0,037$). Obolevanje od tularemije se statistički značajno češće javlja kod osoba starijih od 20 godina (82,3%), predominantno od 20 do 59 godine, a u kontrolnoj grupi kod osoba mlađih od 20 godina (38,8%) ($\chi^2=5,06$, $p=0,024$) (Tabela 1).

Najveći broj obolelih hospitalizovanih pacijenata prijavljen je 2003. godine - (35), potom 2000. - (14), 2004. i 1999. po 11 bolesnika. U odnosu na ukupan broj obolelih po opštinama, najveći broj obolelih pripadao je opštini Sopkobanja (30), Aleksinac (17), slede opštine: Merošina (9), Pirot (7), Niš (7), Ražanj (6) i Žitorađa (6). U odnosu na broj obolelih po godinama i opštinama, najveći broj obolelih registrovan je u opštini Sokobanja: 1999. (10) i 2003.- (10) bolesnika. Slede opština Aleksinac: 2000.- (5), opština Pirot: 2003.- (5 bolesnika) (Tabela 2).

Tabela 2. Geografska distribucija obolevanja od tularemije kod hospitalizovanih bolesnika na Klinici za zarazne bolesti, u periodu od 1999. do 2011

Opština	Godina obolevanja													Ukupno
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	
Sokobanja	10	2	1	-	10	3	3	-	-	-	-	-	1	30
Aleksinac	1	5	-	1	3	1	2	1	-	2	-	1	-	17
Ražanj	-	3	-	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	6
GadžinHan	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	3
Svrljig	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Merošina	-	-	-	-	3	2	1	2	-	-	1	-	-	9
Doljevac							1							1
Niš					2	3				1	1			7
Pirot				2	5									7
BelaPalanka					1									1
Prokuplje			1	1	1	1				2	1			7
Žitorađa		2			3	1								6
Blace					1									1
Leskovac					1									1
Lebane					2									2
Vranje										1	1			2
KosKamenica				2								2	1	5
Gnjilane			2	2	1									5
Štrpce		1												1
Ukupno	11	14	4	9	35	11	9	3	0	8	4	3	2	113

Tabela 3. Distribucija obolelih od tularemije i u kontrolnoj grupi prema prebivalištu

Prebivalište	Oboleli od tularemije		Kontrolna grupa		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Selo	106	93,8	15	48,4	121	84,0
Grad	7	6,2	16	51,6	23	16,0
Ukupno	113	100,0	31	100,0	144	100,0

p<0,001

Među obolelima od tularemije je bilo 93,8% pacijenata sa sela i 6,2% pacijenata iz grada, a u kontrolnoj grupi bolesnika sa limfadenopatijom, procenat pacijenata sa sela i iz grada je bio ujednačen (51,6% odnosno 48,4%). Statistički je utvrđeno da se obolevanje od tularemije značajno više javlja u ruralnoj sredini u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=34,08$ p<0,001) (Tabela 3).

Tabela 4. Distribucija hospitalizovanih bolesnika prema zanimanju

Zanimanje	Oboleli od tularemije		Kontrolna grupa		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Poljoprivrednici	10	8,8	2	6,4	12	8,3
Domaćice	35	31,0	5	16,1	40	27,8
Predškolska deca	1	0,9	1	3,2	2	1,4
Školska deca i studenti	18	15,9	11	35,5	29	20,1
Penzioneri	8	7,1	7	22,6	15	10,4
Ostalo	41	36,3	5	16,1	46	31,9
Ukupno	113	100,0	31	100,0	144	100,0

p<0,01

U grupi obolelih od tularemije najveći broj pacijenata, činile su domaćice – 31,0%, a u kontrolnoj grupi školska deca i studenti – 35,5%. Utvrđeno je da postoji statistički značajna

razlika u vrsti zanimanja u odnosu na ispitivanu grupu ($\chi^2=16,38$ $p=0,006$). Obolevanje od tularemije je češće kod poljoprivrednika i domaćica, ali ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,119$). Udeo učenika i studenata je bio statistički značajno manji u grupi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=4,63$, $p=0,031$) (Tabela 4).

Tabela 5. Sezonska distribucija obolevanja od tularemije među bolesnicima lečenim na Klinici za zarazne bolesti u periodu od 1999. do 2011. godine

Mesec	Oboleli od tularemije		Kontrolna grupa		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
I	34	30,1	2	6,4	36	25,2
II	25	22,1	3	9,7	28	19,6
III	12	10,6	2	6,4	14	9,8
IV	2	1,8	3	9,7	5	3,5
V	2	1,8	3	9,7	5	3,5
VI	5	4,4	3	9,7	8	5,6
VII	1	0,1	2	6,4	3	2,1
VIII	-	-	-	-	-	-
IX	-	-	3	9,7	2	1,4
X	11	9,7	2	6,4	13	9,1
XI	6	5,3	4	12,9	10	7,0
XII	15	13,3	4	12,9	19	13,3
Ukupno	113	100,0	31	100,0	143	100,0

$p<0,001$

Iz epidemiološke ankete pacijenata o početku obolevanja dobijeni su sledeći podaci: obolevanje od tularemije se najčešće javlja u januaru (30,1%), februaru (22,1%), decembru (13,3%) i martu mesecu (10,6%). Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji obolevanja u zimskim mesecima u odnosu na ostale mesece u godini među obolelima od tularemije ($\chi^2=29,771$, $p<0,001$), kao i između ispitivanih grupa ($\chi^2=16,569$, $p<0,001$). Sezonski karakter obolevanja od tularemije je jasno uočljiv dok kod kontrolne grupe ne postoji (Tabela 5).

Tabela 6. Pretpostavljeni put transmisije kod obolelih od tularemije

Put transmisije	Oboleli od tularemije		Kontrolna grupa		Ukupno
	n	%	n	%	n(%)
Direktni kontakt sa životinjama	11	9,7	5	16,1	16 (11,1)
Nepoznat	91	80,5	24	77,4	115 (79,9)
Alimentarni	11	9,7	2	6,5	13 (9,0)
Ukupno	113	100,0	31	100,0	144 (100,0)

Kod većine obolelih od tularemije (80,5%), kao i u kontrolnoj grupi pacijenata (77,4%) pretpostavljeni put transmisije je bio nepoznat. Alimentarni i direktni kontaktni put u grupi obolelih su bili podjednako zastupljeni sa po 9,7%. Razlike u odnosu na puteve prenošenja između grupa nisu značajne ($p=0,545$) (Tabela 6).

4.2. Kliničke karakteristike

Kliničko istraživanje je obuhvatilo 113 pacijenata obolelih od tularemije i 31 pacijenta u kontrolnoj grupi. Kontrolna grupa je bila heterogena i činio je 31 bolesnik sa diferencijalnom dijagnozom tularemije infektivne i neinfektivne geneze: (infektivna mononukleozna, bakterijska angina, erizipel lica, bolest mačije ogrebotine, tuberkuloza, toksoplazmoza, benigni i maligni tumori vrata, limfadenopatija nepoznate geneze). Najčešće kliničke manifestacije kod svih obolelih su bile: limfadenopatija, tonzilofaringitis, febrilnost i promene po koži.

Tabela 7. Kliničke karakteristike tularemije i diferencijalnih dijagnoza tularemije

Kliničke karakteristike	Tularemija (n=113)	Kontrolna grupa (n=31)	p
	∑ (%)	∑ (%)	
Limfadenopatija	108 (95,6)	29 (93,6)	0,64
Tonzilofaringitis	54 (47,8)	11 (35,5)	0,309
Febrilnost	100 (88,5)†	21 (67,7)	0,012†
Promene po koži	24 (21,2)	5 (16,1)	0,707

† p<0,05

Limfadenopatija je bila prisutna kod 95,6% obolelih od tularemije i kod 93,6% bolesnika u kontrolnoj grupi. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti limfadenopatije između ispitivanih grupa (p=0,64).

Tonzilofaringitis je bio prisutan kod skoro polovine obolelih od tularemije (47,8%) i kod 35,5% kontrolnih bolesnika. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti tonzilofaringitisa u odnosu na ispitivanu grupu (p=0,309).

Febrilnost je bila prisutna kod 88,5% obolelih od tularemije i kod 67,7% kontrolnih pacijenata. Utvrđeno je da se febrilnost statistički značajno češće javlja kod obolelih od tularemije u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=6,34$, p=0,012).

Promene po koži su bile prisutne kod 21,2% obolelih od tularemije i 16,1% kontrolnih pacijenata. Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti promena po koži u odnosu na ispitivanu grupu (p=0,707) (Tabela 7).

Tabela 8. Zastupljenost različitih kliničkih oblika u ispitivanim grupama

Klinički oblik	Lokalizacija	Oboleli (n=113)		Kontrolna grupa (n=31)		p
		n (%†)	∑ (%*)	n (%†)	∑ (%*)	
Tonziloglandularni	Jednostrana	48 (88,9)	54 (47,8)	8 (66,7)	12 (38,7)	0,486
	Obostrana	6 (11,1)		4 (33,3)		
Glandularni	Jednostrana	49 (94,2)	52 (46)	15 (88,2)	17 (54,8)	0,504
	Obostrana	3 (5,8)		2 (11,8)		
Ulceroglandularni	Jednostrana	6 (100,0)	6 (5,3)	-	-	-
	Obostrana	-		-		
Okuloglandularni	Jednostrana	1 (100,0)	1 (0,9)	2 (100,0)	2 (6,5)	0,117
	Obostrana	-		-		
Ukupno	Jednostrana	104 (92,0)	113 (100,0)	25 (80,6)	31 (100,0)	0,131
	Obostrana	9 (8,0)		6 (19,4)		

* u odnosu na ukupan broj obolelih u grupi, † u odnosu na klinički oblik

Najčešći klinički oblici kod obolelih od tularemije bili su: tonziloglandularni (47,8%), glandularni (46,0%), ulceroglandularni (5,3%) i okuloglandularni (0,9%). Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti tonziloglandularnog ($p=0,486$), glandularnog ($p=0,504$) i okuloglandularnog oblika ($p=0,117$) između obe ispitivane grupe. (Slika 7 i 8).

Lokalizacija promena kod obolelih od tularemije kao i kod kontrolnih bolesnika je dominantno jednostrana (92,0% tularemija, 80,6% kontrolna grupa) ali ne postoji statistički značajna razlika između grupa ($p=0,132$). Jednostrano lokalizovan tonziloglandularni oblik je bio češći kod obe grupe ispitanika (oboleli: 88,9%, kontrolna grupa i: 66,7%) kao i jednostrano lokalizovan glandularni oblik (94,2%, odnosno 88,2%). Ulceroglandularni i okuloglandularni oblik su isključivo bili jednostrani u obe ispitivane grupe (Tabela 8).

Tabela 9. Klinički nalaz različitih lokalizacija limfadenopatije u ispitivanim grupama

Lokalizacija limfadenopatije		Oboleli (n=113)		Kontrolna grupa (n=31)		p
		n (%)	∑ (%*)	n (%)	∑ (%*)	
Cervikalna	Jednostrana	93 (93,0)	100 (88,5)	19 (73,1)	25 (80,6)	0,033 [†]
	Obostrana	7 (7,0)		6 (26,9)		
Aksilarna	Jednostrana	8 (72,7)	11 (9,7)	2 (40,0)	5 (16,1)	
	Obostrana	3 (5,8)		3 (60,0)		
Ingvinalna	Jednostrana	2 (50,0)	4 (3,5)	2 (50,0)	4 (12,9)	
	Obostrana	2 (50,0)		2 (50,0)		
Epitrohlearna	Jednostrana	4 (100,0)	4 (3,5)	0	1 (3,2)	
	Obostrana	0		1 (100,0)		
Ukupno	Jednostrana	107 (88,9)	119	23 (65,7)	35	0,001 [†]
	Obostrana	12 (10,1)		12 (34,3)		

* u odnosu na ukupan broj obolelih u grupi

† u odnosu na lokalizaciju između grupa

Kod obolelih od tularemije najzastupljenija je bila cervikalna limfadenopatija (88,5%), potom aksilarna (9,7%), ingvinalna (3,5%) i kubitarna (3,5%). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji različitih lokalizacija između ispitivanih grupa ($p=0,203$). Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti cervikalne ($p=0,152$), aksilarne ($p=0,586$), ingvinalne ($p=0,145$) i epitrohlearne limfadenopatije ($p=0,693$) između ispitivanih grupa.

Među svim lokalizacijama limfadenopatije, jednostrana cervikalna limfadenopatija je bila najzastupljenija u obe ispitivane grupe. Jednostrana cervikalna limfadenopatija je statistički značajno zastupljenija kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=4,51$, $p=0,033$). Takođe, u grupi obolelih jednostrana cervikalna limfadenopatija je bila statistički značajno zastupljenija u odnosu na ostale lokalizacije ($\chi^2=4,61$, $p=0,032$).

Jednostrana aksilarna limfadenopatija je bila zastupljenija u odnosu na obostranu kod obolelih od tularemije (72,7%), ali nije bilo statistički značajne razlike između grupa ($p=0,299$).

Epitrohlearna limfadenopatija se kod svih obolelih od tularemije javila jednostrano. U kontrolnoj grupi samo jedan pacijent je imao kubitarnu lokalizaciju limfadenopatije i to obostranu. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti jednostrane u odnosu na obostranu zahvaćenost limfonodusa u kubitarnoj regiji između ispitivanih grupa ($p=0,200$).

Ingvinalna limfadenopatija je podjednako bila zastupljena u obe ispitivanje grupe. Kod polovine bolesnika je imala jednostranu lokalizaciju,

Utvrđeno je da je jednostrana lokalizacija limfadenopatije bila dominantna u grupi obolelih od tularemije (88,9%), i njena zastupljenost statistički značajno veća nego u kontrolnoj grupi ($\chi^2=10,27$, $p=0,001$) (Tabela 9).

Tabela 10. Klinički nalaz limfadenopatije prema proširenosti

Proširenost limfadenopatije		Tularemija		Kontrolna grupa		p†
		n (%)	∑ (%*)	n (%)	∑ (%*)	
Lokalizovana	Jednostrana	96 (96,0)	100 (92,6)	20 (87,0)	23 (79,3)	0,234
	Obostrana	4 (4,0)		3 (13,0)		
Proširena	Jednostrana	5 (83,3)	6 (5,6)	3 (100,0)	3 (10,3)	0,666
	Obostrana	1 (16,7)		0		
Generalizovana		-	2 (1,8)	-	3 (10,3)	
Ukupno	Jednostrana	101 (93,5)	108 (100,0)	23 (79,3)	29 (100,0)	0,191
	Obostrana	5 (4,6)		3 (10,3)		
	Generalizovana	2 (1,8)		3 (10,3)		

* u odnosu na ukupan broj bolesnika sa limfadenopatijom

† Zastupljenost jednostane lokalizacije između grupa

Limfadenopatiju je imalo 108 od 113 obolelih od tularemije (95,6%). Lokalizovana limfadenopatija je podrazumevala zahvaćenost limfnih nodusa u jednoj regiji, proširena limfadenopatija je značila zahvaćenost najmanje dve lokalizacije limfonodusa u bliskim regijama (npr. kubitarna i aksilarna regija) a generalizovana najmanje dve lokalizacije u različitim regijama. Lokalizovana limfadenopatija je bila najzastupljenija, kod 92,6% obolelih od tularemije i 79,3% pacijenata u kontrolnoj grupi. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti lokalizovane limfadenopatije između ispitivanih grupa ($p=0,0978$). Jednostrana lokalizovana limfadenopatija je bila zastupljena kod 96,0% obolelih od tularemije i kod 87,0% pacijenata u kontrolnoj grupi. Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti jednostrane lokalizovane limfadenopatije između ispitivanih grupa ($p=0,234$).

Proširena limfadenopatija je bila prisutna kod 6 pacijenata obolelih od tularemije (5,6%), od kojih je 4 pacijenta imalo jednostranu epitrohlearnu i aksilarnu limfadenopatiju a dva pacijenta cervikalnu i aksilarnu limfadenopatiju. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti jednostrane nad obostranom lokalizacijom između grupa u odnosu na ispitivanu grupu ($p=0,666$).

Generalizovanu limfadenopatiju je imalo 1,8% obolelih od tularemije i 10,3% pacijenata u kontrolnoj grupi.

Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u ukupnoj zastupljenosti jednostrane lokalizacije nad obostranom kod tularemije u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,191$) (Tabela 10).

Tabela 11. Veličina limfnih čvorova u odnosu na prisustvo komplikacija kod bolesnika

Veličina limfnog čvora (cm)	Oboleli od tularemije		Kontrolna grupa	
	Sa komplikacijama	Bez komplikacija	Sa komplikacijama	Bez komplikacija
1,1-3,0	9 (19,1)	35 (58,3)	2 (22,2)	12 (60,0)
3,1-5,0	23 (48,9)	19 (31,7)	5 (55,6)	8 (40,0)
>5,1cm	15 (31,9)	6 (10,0)	2 (22,2)	-
Ukupno	47 (100,0)	60 (100,0)	9 (100,0)	20 (100,0)

Kod obolelih od tularemije koji su imali komplikacije, najčešća veličina limfonodusa iznosila je 3,1-5cm (48,9%). Čvorove veće od 5cm imalo je 31,9% obolelih sa komplikacijama. Kod obolelih bez komplikacija većina je imala limfonoduse veličine do 3 cm (58,3%). U grupi obolelih od tularemije utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između veličine limfnog čvora i pojave komplikacija ($\chi^2=18,29$, $p<0,001$). Ne postoji statistički značajna razlika u veličini limfonodusa kod pacijenata sa komplikacijama između obe ispitivane grupe ($p=0,845$).

Utvrđeno je da i u kontrolnoj grupi postoji statistički značajna povezanost između veličine limfnog čvora i pojave komplikacija ($\chi^2=7,090$, $p=0,028$) (Tabela 11).

Tabela 12. Zastupljenost tonzilofaringitisa u obe ispitivane grupe

Tonzilofaringitis	Oboleli n (%)	Kontrolna grupa n (%)	p
Jednostrani eksudativni	34 (63,0)	10 (90,9)	0,090
Obostrani eksudativni	9 (16,7)	0	
Jednostrani kataralni	10 (18,5)	0	
Obostrani kataralni	1 (1,8)	1 (9,1)	
Ukupno	54 (100,0)	11 (100,0)	

Tonzilofaringitis je imalo 54 (47,8%) obolelih i 11 (35,5%) pacijenata u kontrolnoj grupi. Jednostrana lokalizacija je bila dominantna u obe ispitivane grupe: oboleli 44 (81,5%) a kontrolna grupa 10 (90,9%). Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti jednostrane lokalizacije između ispitivanih grupa ($p=0,749$).

Najzastupljeniji oblik kod svih bolesnika je bio jednostrani eksudativni tonzilofaringitis (67,7%): kod obolelih (63,0%) a u kontrolnoj grupi (90,9%). Slede: jednostrani kataralni (18,5%), obostrani kataralni (16,7%) i obostrani kataralni (1,2%) kod obolelih. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u pojavi različitih oblika tonzilofaringitisa u odnosu na ispitivanu grupu ($p=0,090$) (Tabela 12).

Tabela 13. Distribucija nivoa febrilnosti u ispitivanim grupama

Telesna temperatura	Oboleli n (%)	Kontrolna grupa n (%)	p
Afebrilni $\leq 37^\circ\text{C}$	13 (11,5)	10 (32,2)	0,005*
Subfebrilni $37,1 - 38^\circ\text{C}$	15 (13,3)	11 (35,5)	
Febrilni $38,1 - 39^\circ\text{C}$	45 (39,8)	10 (32,2)	
Visoko febrilni $\geq 39,1^\circ\text{C}$	40 (35,4)*	-	
Ukupno	113 (100,0)	31 (100,0)	

Febrilnost je bila prisutna kod 100 (88,5%) obolelih od tularemije i 21(67,7%) pacijenata iz kontrolne grupe. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti febrilnosti između ove dve grupe ($\chi^2=6,345$, $p=0,011$). Na prijemu oboleli od tularemije su bili febrilni u 88,5%, od toga subfebrilni 13,3%, febrilni 39,8% i visoko febrilni 35,4%. Preovladava febrilnost i visoka febrilnost nad subfebrilnošću u grupi obolelih. Hiperpireksija ($TT \geq 39,1^\circ\text{C}$) je značajno zastupljenija u tularemiji u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=11,98$, $p=0,005$) (Tabela 13).

Tabela 14. Srednje vrednosti telesne temperature (u $^\circ\text{C}$) kod ispitanika

Statistički parametar	Oboleli od tularemije	Kontrolna grupa	p
Xsr ($^\circ\text{C}$)	39,10*	38,03	0,011*
SD	0,80	0,75	
CV	2,04	1,97	
I kvartil	38,52	37,53	
Medijana	39,0	37,90	
III kvartil	39,95	38,40	

Prosečna vrednost telesne temperature je bila statistički značajno veća kod pacijenata obolelih od tularemije (Xsr=39,1 $^\circ\text{C}$ i Me 39,0 $^\circ\text{C}$) u odnosu na kontrolnu grupu (Xsr=38,03 $^\circ\text{C}$ i Me 37,9 $^\circ\text{C}$) ($t=2,61$, $p=0,011$) (Tabela 14).

Tabela 15. Prosečno trajanje febrilnosti u danima

Statistički parametar	Oboleli od tularemije	Kontrolna grupa	p
Xsr	7,50	6,20	0,514
SD	8,63	6,37	
CV	115,07	102,74	
I kvartil	3,00	3,25	
II kvartil (Me)	5,00	4,00	
III kvartil	8,00	4,75	

Prosečno trajanje febrilnosti kod obolelih od tularemije iznosilo je 7,50 dana, odnosno Me 5,00 dana, a kod pacijenata u kontrolnoj grupi Xsr=6,20, odnosno Me 4,00. Ne postoji statistički značajna razlika u prosečnom trajanju febrilnosti između obolelih od tularemije i pacijenata u kontrolnoj grupi ($p=0,514$) (Tabela 15).

Tabela 16. Kožne manifestacije kod tularemije i kontrolne grupe

Promene po koži	Oboleli n (%)	Kontrolna grupa n (%)	p
Makulozna ospa	3 (12,5)	1 (20,0)	
Erythema fixum	1 (4,2)	-	
Erythema exsudativum multiforme	6 (25,0)	-	0,743
Urtikarijalna ospa	2 (8,3)	-	
Erythema nodosum	6 (25,0)	2 (40,0)	
Ulceracija (primarni afekt)	6 (25,0)	2 (40,0)	
Ukupno	24 (100,0)	5 (100,0)	0,707

Promene po koži imalo je 24 obolelih (21,2%) i 5 pacijenata (16,1%) u kontrolnoj grupi. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u pojavi promena po koži u odnosu na ispitivanu grupu ($p=0,707$). Najčešći tip kožnih manifestacija kod obolelih bili su

eksudativni multiformni eritem (25%), nodozni eritem (25%) i ulceracija kao primarni afekt (25%). Slede makulozna (12,5%), urtikarijalna ospa (8,3%) i fiksni eritem (4,2%). Ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti kožnih promena između ispitivanih grupa ($p=0,743$) (Tabela 16).

Tabela 17. Lokalizacija promena po koži u ispitivanim grupama

Lokalizacija	Oboleli n (%)	Kontrolna grupa n (%)	p
Šake	12 (44,4)	0	0,289
Potkolenice	10 (37,0)	3 (60,0)	
Trup	2 (7,4)	1 (20,0)	
Lice, glava i vrat	3 (11,1)	1 (20,0)	
Ukupno	27 (100,0)	5 (100,0)	

U tabeli je prikazana lokalizacija promena po koži. Šake su najčešća lokalizacija promena po koži kod pacijenata sa tularemijom (44,4%), potom potkolenice (37,0%). U kontrolnoj grupi najčešća lokalizacija bile su potkolenice (60,0%). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji kožnih promena između ispitivanih grupa ($p=0,289$) (Tabela 17, Prilog Slika 9,10).

Tabela 18. Vrsta komplikacija kod obolelih od tularemije i u kontrolnoj grupi

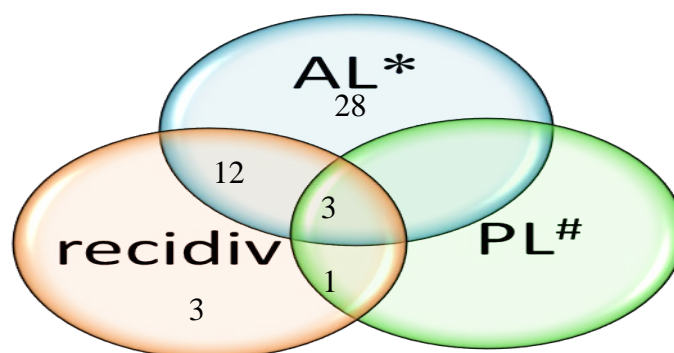
Komplikacije	Oboleli n (%)	Kontrolna grupa n (%)	P*
Apscedirajući limfadenitis	43 (65,2)*	5 (55,6)	0,037*
Recidiv	19 (28,8)	1 (11,1)	0,075
Perzistentna limfadenopatija	4 (6,0)	3 (33,3) [†]	0,033 [†]
Ukupno	66 (100,0)	9 (100,0)	

* u odnosu na ukupan broj obolelih

[†] u odnosu na ukupan broj komplikacija

Od 113 obolelih od tularemije, ukupno 47 (41,6%) je imalo komplikacije. Jedan pacijent je mogao imati više od jedne komplikacije (npr. absces i recidiv 12 pacijenata, absces, recidiv i perzistentna limfadenopatija 3 i recidiv i perzistentna limfadenopatija 1), te je ukupan broj komplikacija 66 kod 47 pacijenata koji su imali komplikacije.

U odnosu na ukupan broj obolelih ($n=113$ tularemija, $n=31$ kontrolna grupa), apscedirajući limfadenitis je statistički značajno zastupljeniji kod tularemije u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=4,32$, $p=0,037$). Zastupljenost recidiva i perzistentne limfadenopatije se statistički značajno ne razlikuje između grupa (recidiv: 0,075, perzistentna limfadenopatija : $p=0,349$) (Tabela 18, Prilog Slika 11, 12, 13).



*Abscedirajući limfadenitis

† Perzistentna limfadenopatija

Grafikon 1. Prisustvo komplikacija kod obolelih

Struktura komplikacija u grupi obolelih je bila sledeća: abscedirajući limfadenitis – 43 pacijenata (65,2%), recidiv-19 pacijenata (28,8%) i perzistentna limfadenopatija - 4 pacijenta (6,0%). Po jedan recidiv je imalo 14 pacijenata (73,7%) a 5 pacijenata su imala po 2 recidiva (26,3%).

Pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti abscedirajućeg limfadenitisa ($p=0,714$), kao ni recidiva ($p=0,429$) kod pacijenata sa komplikacijama između grupa. Perzistentna limfadenopatija je bila statistički značajno zastupljenija u kontrolnoj grupi kod pacijenata sa komplikacijama u odnosu na obolele od tularemije ($p=0,033$). (Tabela 18, Grafikon 1).

Tabela 19. Evolucija i tretman abscedirajućeg limfadenitisa bolesnika sa limfadenopatijom

Evolucija abscedirajućeg limfadenitisa	Tularemija n (%)	DDg tularemije n (%)	p
Hirurška intervencija	32 (78,7)	5 (83,3)	0,540
Spontana fistulizacija	6 (12,8)	1 (16,7)	
Spontana involucija	5 (8,5)	0	
Ukupno	43 (100,0)	6 (100,0)	

Sudbina abscedirajućeg limfadenitisa kod obolelih je sledeća: 78,7% je podvrgnuto hiruškoj intervenciji, 12,8% je imalo spontanu fistulizaciju i 8,5% je imalo spontanu involuciju. U kontrolnoj grupi 83,3% abscedirajućih limfadenita je hirurški tretirano a 16,7% je imalo spontanu fistulizaciju.

Ne postoji statistička značajnost među primenjivanim postupcima u evoluciji abscedirajućeg limfadenitisa između ispitivanih grupa ($p=0,540$) (Tabela 19).

Tabela 20. Komplikacije kod bolesnika sa limfadenopatijom u odnosu na početak obolevanja

Komplikacije	Tularemia n=113 n (%)	DDg n=31 n(%)	p
Rane komplikacije	43 (91,5)	9 (100,0)	0,840
Kasne komplikacije	4 (8,5)	0	
Ukupno	47 (100,0)	9 (100,0)	0,287

Komplikacije je imalo ukupno 47 od 113 obolelih od tularemije (41,6%) i 9 pacijenata od 31 u kontrolnoj grupi (29,0%). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti komplikacija između grupa ($p=0,287$).

U odnosu na početak oboljevanja, komplikacije su bile rane i kasne. Rane komplikacije su se javile u prvih 3 do 6 meseci od početka oboljevanja a kasne posle više od 6 meseci od početka oboljevanja. Rane komplikacije su činile 91,5% svih komplikacija kod obolelih i 100% svih komplikacija u kontrolnoj grupi. Kasne komplikacije je imalo 4 obolela od tularemije i to kod dvoje je bila prisutna perzistentna limfadenopatija a kod dvoje recidivantni limfadenitis. Perzistentna limfadenopatija se održavala do 4 godine i više, kod jednog pacijenta (poslednje vreme kontrole početak 2013. god). Recidivantni limfadenitis se javio čak posle 9 godina od početka oboljevanja kod jednog pacijenta.

Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vremenu javljanja komplikacija u odnosu na ispitivanu grupu ($p=0,840$) (Tabela 20).

4.3. Imunodijagnostika tularemije

Ukupno 144 bolesnika sa diferencijalnom dijagnozom tularemije je klinički observirano, dijagnostikovano i praćeno u periodu od 1 do 11 godina od početka oboljenja. Serumski su testirani serološkim testovima a biopsije limfnih nodusa imunohistohemijskom metodom indirektno imunoperoksidaze (IIP). Rezultati prethodnog testiranja seruma MAT i ELISA (VMA) testom, komparirani su sa rezultatima testiranja novim testovima: IgG Serion ELISA, IgM Serion ELISA, Serazym ELISA, In-house ELISA, VIRapid i Western blot. Korišćeni su i rezultati testa indirektno imunofluorescencije (IIFT) za detekciju antigena na uzorcima briseva guše i punktata limfonodusa (236).

4.3.1. Komparacija rezultata prethodnog testiranja seruma pacijenata MAT i ELISA testom u odnosu na rezultate dobijene ostalim imunodijagnostičkim testovima

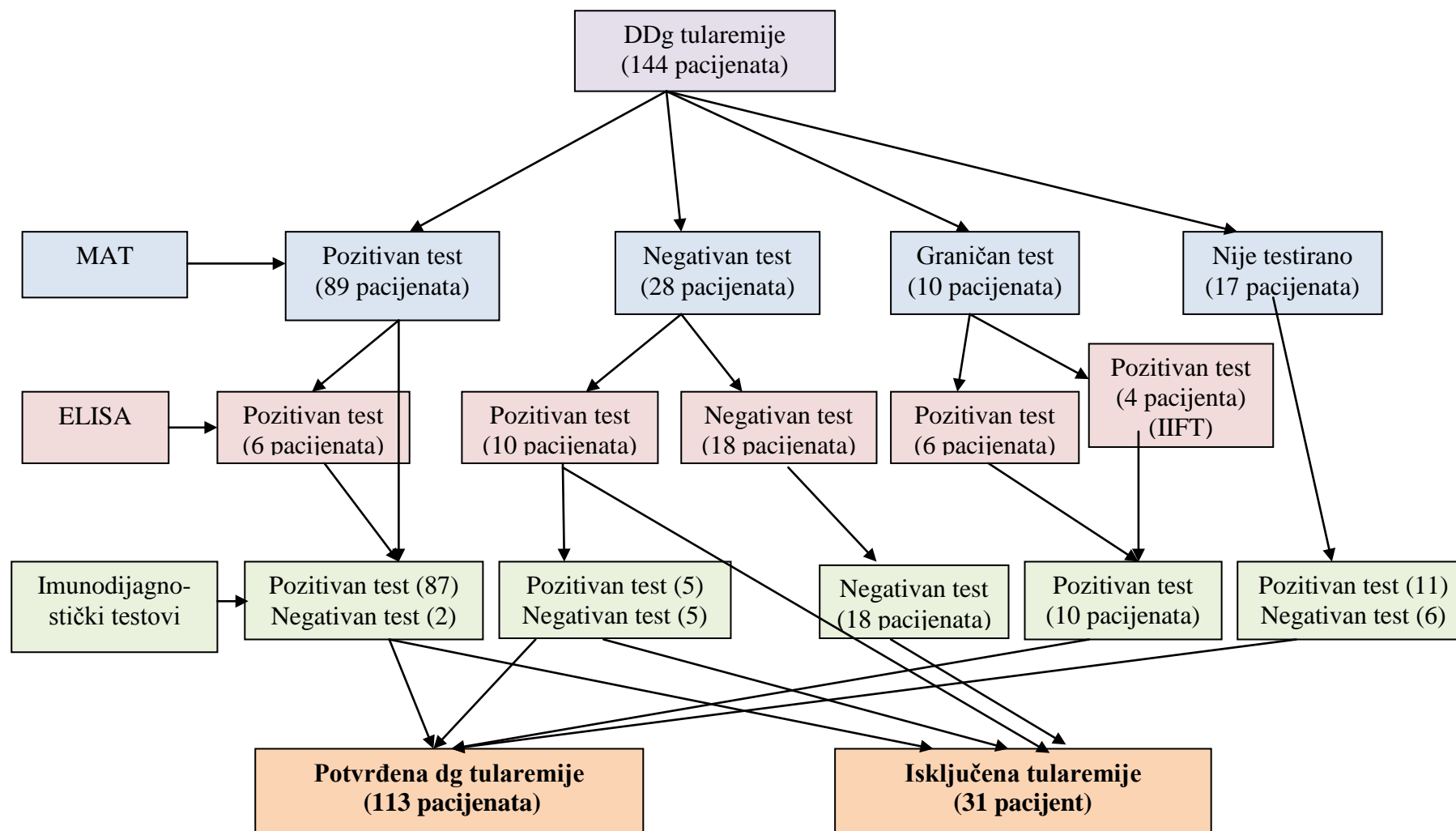
Prethodnim višestrukim testiranjem seruma pacijenata MAT testom dobijeni su sledeći rezultati: 89 pozitivnih, 28 negativnih i 10 seruma pacijenata sa graničnim vrednostima. Preostalih 17 seruma pacijenata nisu analizirana MAT testom.

Naknadnim istovremenim testiranjem seruma navedenim imunodijagnostičkim testovima (IgG Serion ELISA, IgM Serion ELISA, Serazym ELISA, In-house ELISA, VIRapid i Western blot.) od ukupno 89 pacijenata pozitivnih MAT-om, kod 87 je potvrđena tularemija sa više pozitivnih testova po pacijentu. Kod dva pacijenta je isključena tularemija i to sa 5 i 6 negativnih testova po pacijentu. Od ukupno 28 pacijenata negativnih seruma u MAT-u, kod 10 je dokazana tularemija, ELISA (VMA) testom. od kojih je, naknadno, kod 5 potvrđena, a kod 5 isključena navedenim imunodijagnostičkim testovima. Kod preostalih 18 pacijenata negativnih u MAT-u, tularemija je isključena nakon primene imunodijagnostičkih testova. Kod 13 pacijenata tularemija je isključena testiranjem seruma sa više navedenih imunodijagnostičkih testova, a kod jednog pacijenta je samo test dokazivanja antigena *F.tularensis* IHC metodom IIP bio negativan. Kod preostala 4 pacijenta negativna u MAT-u, dokazana je druga etiologija limfadenopatije (*Streptococcus pyogenes* kod dvoje, *Toxoplasma gondii* i *Bartonella henselae*). Kod 10 pacijenata sa graničnim vrednostima titra antitela

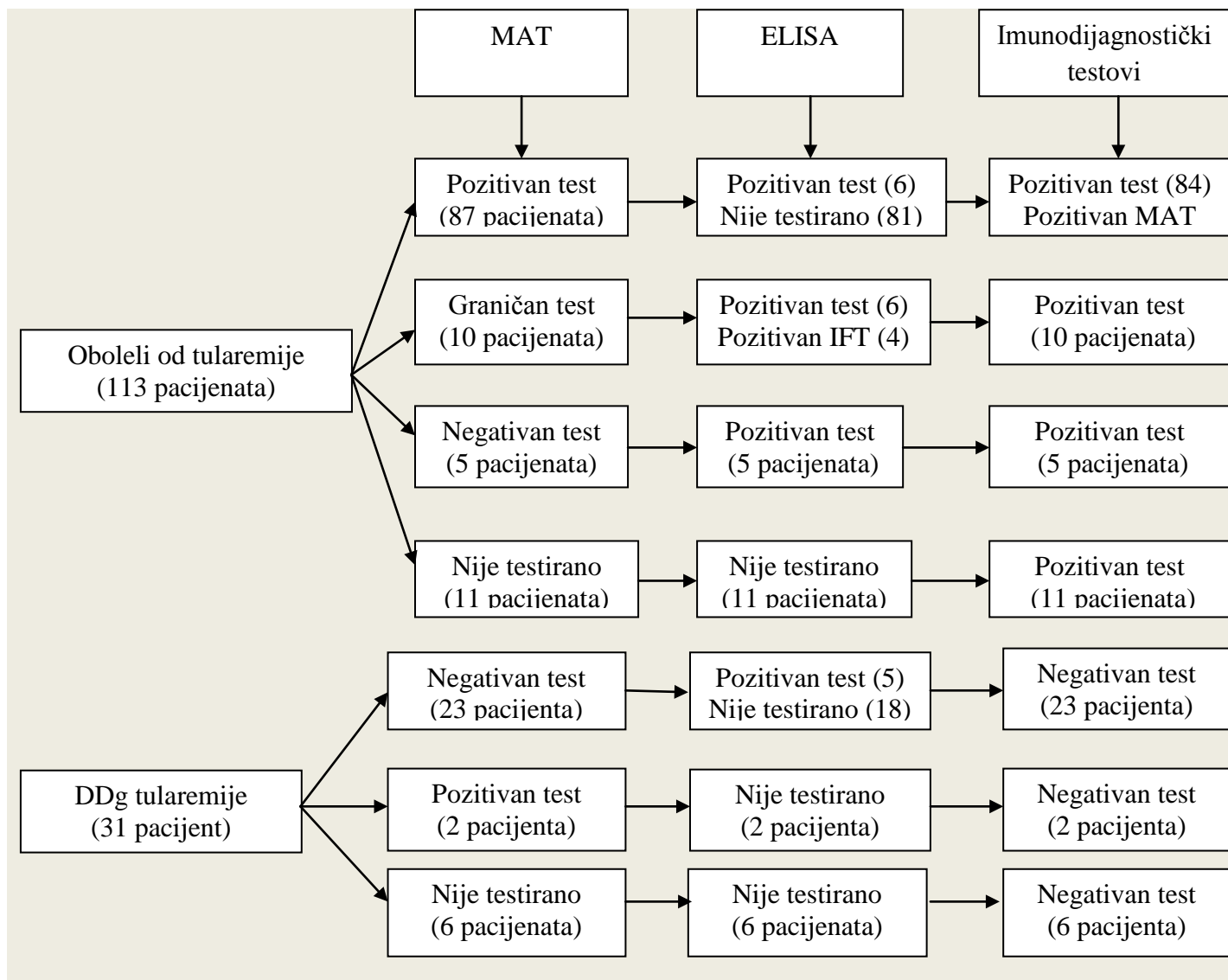
seruma MAT testom, 6 je bilo pozitivno ELISA testom i 4 imunofluorescentnim testom. Svih 10 pacijenata sa graničnim titrom antitela u MAT-u, je bilo pozitivno serološkim testovima (svih 6 pozitivnih testova kod 8 pacijenata, a kod 2 pacijenta 5 pozitivnih testova). Pozitivan antigen *F.tularensis* je nađen kod jednog pacijenata sa graničnim vrednostima u MAT-u i sa pozitivnim IFT i imunodijagnostičkim testovima. Serumi 17 pacijenata koji nisu bili testirani MAT testom, analizirani su ostalim navedenim imunološkim testovima. Tularemija je potvrđena kod 11 pacijenata (kod 7 je bilo pozitivno više testova, a kod 4 samo imunohistohemija), a isključena kod 6 pacijenata (Grafikon 2).

Kod obolelih od tularemije (n=113) konačni rezultati testiranja seruma pacijenata MAT testom bili su sledeći: 87 pozitivnih, 5 negativnih i 10 seruma pacijenata sa graničnim vrednostima. Kod preostalih 11 pacijenata nije vršeno testiranje seruma MAT testom. Od ukupno 15 seruma u kojima nisu dokazana specifična antitela na *F.tularensis*, MAT testom, kod 11 je tularemija potvrđena ELISA testom, a kod 4 imunofluorescentnim testom. Svih 15 negativnih seruma u MAT testu je analizirano napred navedenim imunodijagnostičkim testovima (kod 13 pacijenata svih 6 testova je bilo pozitivno, kod 1 pacijenta 5 testova je bilo pozitivno i kod 1 pacijenta 4 testa su bila pozitivna). Serumi svih 11 pacijenata koji nisu testirani MAT-om su bili pozitivni nakon testiranja IgG Serion ELISA, IgM Serion ELISA, Serazym ELISA, In-house ELISA, VIRapid i Western blot i IHH. Kod sedam pacijenata je bilo pozitivno više testova, a kod četiri samo imunohistohemija.

U kontrolnoj grupi prethodnim višestrukim testiranjem MAT testom dobijeni su sledeći rezultati: kod 23 pacijenta je isključena tularemija, kod 2 pacijenta je potvrđena tularemija, a 6 pacijenata nije testirano. Naknadnim testiranjem seruma sa više imunodijagnostičkih testova tularemija je isključena kod oba pacijenta kod kojih su prethodno dokazana specifična antitela na *F.tularensis*. Od 23 pacijenta negativnih seruma u MAT-u, ELISA testiranjem 5 negativnih je potvrđeno kao pozitivno a naknadnim testiranjem navedenim imunodijagnostičkim testovima kod svih 5 pacijenata je isključena tularemija. Kod svih 6 pacijenata koji nisu testirani MAT testom tularemija je isključena imunodijagnostičkim testovima (kod tri pacijenta je bilo negativno više testova a kod tri samo imunohistohemija). Šematski prikaz komparativne imunodijagnostike je dat na Grafikonu 3.



Grafikon 2. Imunodijagnostika tularemije



Grafikon 3. Komparativna imunodijagnostika obolelih od tularemije i DDg tularemije

4.3.2. Karakteristike ispitivanih imunodijagnostičkih testova

Ukupno je ispitano 224 bolesnika imunodijagnostičkim testovima: 113 obolelih od tularemije i 111 ispitanika u kontrolnoj grupi. Serumi su testirani serološkim testovima a bioptati limfnih nodusa imunohistohemijskom metodom indi rektne imunoperoksidaze. Korišćeni su sledeći testovi IgG Serion ELISA, IgM Serion ELISA, Serazym ELISA, In-house ELISA, VIRapid i Western blot.

Tabela 21. Prikaz dobijenih rezultata korišćenih testova na ukupnim uzorcima bolesnika (serumi i bioptati)

	IgG Serion ELISA n (%)	IgM Serion ELISA n (%)	Serazym ELISA n (%)	In-house ELISA n (%)	VIRapid n (%)	WB n (%)	IIP n (%)
Pozitivni	152 (71,4)	151 (71,6)	185 (70,9)	126 (48,1)	166 (63,4)	161 (75,2)	13 (50,0)
Negativni	61 (28,6)	60 (28,4)	76 (29,1)	136 (51,9)	96 (36,6)	53 (24,8)	13 (50,0)
Sp*	148 (69,5)	142 (67,3)	151 (57,8)	120 (45,8)	150 (57,2)	139 (65,0)	13 (50,0)
Sn	54 (25,4)	48 (22,7)	72 (27,6)	102 (38,9)	92 (35,1)	38 (17,8)	6 (23,1)
Lp	4 (1,9)	9 (4,3)	34 (13,0)	6 (2,3)	16 (6,1)	22 (10,3)	0 (0)
Ln	7 (3,3)	12 (5,7)	4 (1,5)	34 (12,9)	4 (1,5)	15 (7,0)	7 (26,9)
Ukupno	213(100,0)	211(100,0)	261(100,)	262 (100,0)	262(100,0)	214(76,2)	26(100,0)

*Sp- Stvarno pozitivni, Sn- Stvarno negativni, Lp-Lažno pozitivni, Ln-Lažno negativni

U tabeli su prikazani podaci o svim nalazima imunodijagnostičkih testova na bolesničkom materijalu: svim serumima uključujući više uzoraka seruma po jednom pacijentu kao i na bioptatima. Najveći procenat stvarno pozitivnih nalaza antitela (Sp) na bolesničkom materijalu, dobijen je IgG Serion ELISA testom (69,5%), a najmanji In-house ELISA testom (45,8%). Najviše stvarno negativnih nalaza antitela (Sn) utvrđeno je In-house ELISA testom (38,9%), a najmanje Western blot testom (17,8%). Najviše lažno pozitivnih nalaza (Lp) nađeno je Serazym ELISA testom (13,0%). IIP testom nisu nađeni lažno pozitivni uzorci. Najviše lažno negativnih (Ln) uzoraka utvrđeno je In-house ELISA testom (12,9%), a najmanje Serazym i VIRapid testovima (po 1,5%) (Tabela 21)

Tabela 22. Prikaz rezultata testiranja seruma i bioptata u odnosu na ispitivane grupe pacijenata

		IgG Serion ELISA n (%)	IgM Serion ELISA n (%)	Serazym ELISA n (%)	In-house ELISA n (%)	VIRapid n (%)	WB n (%)	IIP n (%)
Oboleli od tularemije	Sp*	148 (95,5)	142 (92,2)	151 (97,4)	120 (77,9)	150 (97,4)	139 (90,2)	13 (50,0)
	Ln	7 (4,5)	12(7,8)	4 (2,6)	34(22,1)	4 (2,6)	15(9,8)	7 (26,9)
	Ukupno	155(100,0)	154(100,0)	155(100,0)	154(100,0)	154(100,0)	154(100,0)	20(100,0)
Kontrolna grupa	Sn	54 (93,1)	48 (84,2)	72 (67,9)	102 (94,4)	92 (85,2)	38 (63,3)	6 (23,1)
	Lp	4 (6,9)	9 (15,8)	34 (32,1)	6 (5,6)	16 (14,8)	22 (36,7)	0 (0)
	Ukupno	58 (100,0)	57 (100,0)	106(100,0)	108(100,0)	108(100,0)	60 (100,0)	6 (100,0)
Ukupno		213	211	261	262	262	214	26

*Sp- Stvarno pozitivni, Ln-Lažno negativni

Kod obolelih od tularemije najveći broj stvarno pozitivnih uzoraka dobijen je Serazym ELISA testom (97,4%), a najmanji IIP testom (50,0%). Najviše lažno negativnih uzoraka nađeno je In-house ELISA testom (22,1%). U kontrolnoj grupi najveći broj stvarno negativnih nalaza antitela utvrđen je In-house ELISA testom (94,4%), a najmanji Serazym ELISA testom (67,9%). Najviše lažno pozitivnih uzoraka dobijeno je Western blot testom (36,7%) i Serazym ELISA testom (32,1%) (Tabela 22).

Tabela 23. Rezultati imunodijagnostičkih testova kod svih pacijenata uključenih u istraživanje (n=224)

	IgG Serion ELISA n (%)	IgM Serion ELISA n (%)	Serazym ELISA n (%)	In-house ELISA n (%)	VIRapid n (%)	WB n (%)	IIP n (%)
Pozitivni	104 (66,7)	103 (66,9)	136 (66,3)	83 (40,3)	119 (57,8)	112 (70,9)	13 (50,0)
Negativni	52 (33,3)	51 (33,1)	69 (33,7)	126 (61,2)	87 (42,2)	46 (29,1)	13 (50,0)
Sp*	100 (64,1)	95 (61,7)	103 (50,2)	77 (37,4)	103 (50,0)	92 (58,2)	13 (50,0)
Sn	49 (31,4)	44 (28,6)	69 (33,6)	97 (47,1)	87 (42,2)	35 (22,2)	6 (23,1)
Lp	4 (2,5)	8 (5,2)	33 (16,1)	6 (2,9)	16 (7,8)	20 (12,6)	0 (0)
Ln	3 (1,9)	7 (4,5)	0(0)	26 (12,6)	0 (0)	11 (12,6)	7 (26,9)
Urađeno	156(100,0)	154(100)	205(100,0)	206(100,0)	206(100,0)	158(100,0)	26(100,0)

*Sp- Stvarno pozitivni, Sn- Stvarno negativni, Lp-Lažno pozitivni, Ln-Lažno negativni

U tabeli su prikazani podaci o rezultatima imunodijagnostičkih testova kod svih pacijenata uključenih u istraživanje (n=224) gde je po pacijentu analiziran samo jedan serum. Analizirani su poslednji uzorci seruma kod bolesnika praćenih u intervalu od 1 do 11 godina. Prikazani su i rezultati IIP na patohistološkom materijalu. Najveći procenat pacijenata je imao stvarno pozitivne nalaze antitela u IgG Serion ELISA (64,1%), a najmanji u In-house ELISA testu (37,4%). Najviše pacijenata je imalo stvarno negativne nalaze antitela u In-house ELISA testu (47,1%), a najmanje u Western blot testu (22,2%). Najviše lažno pozitivnih nalaza antitela dobijeno je Serazym ELISA testom (16,1%). IIP testom nisu nađeni lažno pozitivni uzorci. Najviše lažno negativnih nalaza antitela nađeno je In-house ELISA testom (12,6%). Serazym i VIRapid testom nisu nađeni lažno negativni uzorci (Tabela 23).

Tabela 24. Rezultati imunodijagnostičkih testova u odnosu na ispitivane grupe

		IgG Serion ELISA n (%)	IgM Serion ELISA n (%)	Serazym ELISA n (%)	In- house ELISA n (%)	VIRapid n (%)	WB n (%)	IIP n (%)
Oboleli od tularemije	Sp*	100(97,1)	95(93,1)	103(100,0)	77(74,8)	103(100,0)	92(89,3)	13(65,0)
	Ln	3(2,9)	7(6,9)	0(0)	26(25,2)	0(0)	11(10,7)	7(35,0)
	Urađeno	103(100,0)	102(100,0)	103(100,0)	103(100,0)	103(100,0)	103(100,0)	20(100,0)
Kontrolna grupa	Sn	49(92,4)	44(84,6)	69(67,6)	97(94,2)	87(77,0)	35(63,6)	6(23,1)
	Lp	4(7,6)	8(15,4)	33(32,4)	6(5,8)	16(23,0)	20(36,4)	0(0)
	Urađeno	53(47,7)	52(46,8)	102(91,1)	103(92,8)	103(92,8)	55(49,5)	6(100,0)

*Sp- Stvarno pozitivni, Ln-Lažno negativni

U tabeli su prikazani podaci o broju stvarno pozitivnih i lažno negativnih uzoraka u grupi obolelih od tularemije i u kontrolnoj grupi. U grupi obolelih od tularemije svi pacijenti su imali stvarno pozitivne nalaze antitela (100,0%) u Serazym ELISA i VIRapid testu.

Najmanji broj stvarno pozitivnih uzoraka je dobijen IIP metodom (65,0%) i In-house ELISA testom (74,8%). Procenat urađenih testova kod obolelih (n=113) je preko 90%.

U kontrolnoj grupi najviše stvarno negativnih uzoraka je dobijeno IgG Serion ELISA testom (92,4%), a najmanje IIP (23,1%). Lažno pozitivnih nalaza antitela je bilo najviše u Western blot-u (36,4%) i Serazym ELISA testu (32,4%). Procenat urađenih testova u kontrolnoj grupi (n=111) je od 50 do 93% (Tabela 24).

Tabela 25. Rezultati testiranja seruma obolelih od tularemije praćenih u periodu od 1 do 11 godina od početka bolesti

	IgG Serion ELISA n (%)	IgM Serion ELISA n (%)	Serazym ELISA n (%)	In-house ELISA n (%)	VIRapid n (%)	WB n (%)	IIP n (%)
Sp	86(97,7)	80(92,0)	88(100,0)	64(72,7)	88(100,0)	79(89,8)	13(50,0)
Ln	2(2,3)	7(8,0)	0(0)	24(27,3)	0(0)	9(10,2)	7(26,9)
Urađeno	88(100,0)	87(100,0)	88(100,0)	88(100,0)	88(100,0)	88(100,0)	20(100,0)

*Sp- Stvarno pozitivni, Ln-Lažno negativni

Ukupan broj bolesnika koji su praćeni u periodu od 1 do 11 godina od početka obolevanja iznosio je 95. Od njih je kod 88 pacijenata obavljeno testiranje po jednog uzorka seruma serološkim testovima a kod 7 pacijenata je primenjena jedino imunohistohemijska metoda indirektno peroksidaze. Ovom metodom je analizirano ukupno 20 uzoraka bioptata limfnih čvorova. Rezultati testiranja su sledeći: Serazym ELISA i VIRapid testovima dobijeni su stvarno pozitivni nalazi antitela na svim serumima (100%), sledi IgG Serion ELISA sa 97,7% stvarno pozitivnih uzoraka. Najveći procenat lažno negativnih uzoraka utvrđen je In-house ELISA testom (27,3%) (Tabela 25).

Tabela 26. Karakteristike dijagnostičkih testova u odnosu na ukupan bolesnički materijal

	IgG Serion ELISA	IgM Serion ELISA	Serazym ELISA	In-house ELISA	VIRapid	Western blot	IIP
Broj uzoraka	213	211	262	262	263	214	26
Senzitivnost	0,9548	0,9221	0,9742	0,7792	0,9740	0,9026	0,6500
Specifičnost	0,9310	0,8421	0,6792	0,9444	0,8519	0,6333	1,000
PPV	0,9737	0,9404	0,8162	0,9524	0,9036	0,8634	1,000
NPV	0,8852	0,8000	0,9474	0,7500	0,9583	0,7170	0,4615
Efikasnost testa	0,9484	0,9005	0,8544	0,8473	0,9237	0,8271	0,7308

U tabeli su prikazane karakteristike dijagnostičkih testova na ukupnom bolesničkom materijalu kod svih ispitanika. Pokazano je da se najveća senzitivnost dobija primenom Serazym ELISA (97,4%) kao i VIRapid testa (97,4%), potom IgG Serion ELISA (95,5%) i IgM Serion ELISA (92,2%), a najmanja primenom In-house ELISA (77,9%).

U pogledu specifičnosti, metoda IIP ima najveću specifičnost (100,0%), ali je rađena na malom broju uzoraka (n=26). Slede In-house ELISA (94,4%) i IgG Serion ELISA (93,1%). Najveća pozitivna prediktivna vrednost dobijena je primenom IgG Serion ELISA testa (97,37%), potom In-house ELISA (95,2%) i IgM Serion ELISA (94%). Najveća negativna prediktivna vrednost je dobijena primenom VIRapid (95,8%) i Serazym ELISA (94,7%). Najveću dijagnostičku efikasnost imali su testovi IgG Serion ELISA (94,8%), VIRapid

(92,4%) i IgM Serion ELISA (90,0%). Na osnovu senzitivnosti i specifičnosti pokazano je da je najbolji test za potvrđnu dijagnostiku tularemije IgG Serion ELISA test (Tabela 26).

Tabela 27. Karakteristike dijagnostičkih testova dobijene ispitivanjem poslednjih uzoraka seruma praćenih bolesnika kao i njihovih bioptata

	IgG Serion ELISA	IgM Serion ELISA	Serazym ELISA	In-house ELISA	VIRapid	Western blot	IIP
Broj pacijenata	156	154	205	206	206	158	26
Senzitivnost	0,9709	0,9314	1,000	0,7476	1,000	0,8932	0,6500
Specifičnost	0,9245	0,8462	0,6765	0,9417	0,8447	0,6364	1,000
PPV	0,9615	0,9223	0,7574	0,9277	0,8655	0,8214	1,000
NPV	0,9423	0,8627	1,000	0,7886	1,000	0,7609	0,4615
Efikasnost	0,9551	0,9026	0,8390	0,8447	0,9223	0,8038	0,7308

U tabeli su prikazane karakteristike dijagnostičkih testova analizom poslednjih uzoraka seruma praćenih bolesnika kao i njihovih bioptata. Pokazano je da najveću senzitivnost imaju Serazym ELISA (100,0%) i VIRapid test (100,0%). Najveću specifičnost imaju IIP 100%, In-house ELISA (94,2%) i IgG Serion ELISA (92,4%). Najveća pozitivna prediktivna vrednost dobijena je primenom IgG Serion ELISA (96,2%) i IgG Serion ELISA (92,4%). Najveća negativna prediktivna vrednost dobijena je primenom Serazym ELISA (100,0%) i VIRapid testa (100,0%). Upoređujući dijagnostičku efikasnost testova pokazano je da se najveća vrednost dobija primenom IgG Serion ELISA (95,5%), VIRapid (92,2%) i IgM Serion ELISA testa (90,3%). Na osnovu senzitivnosti i specifičnosti, najbolji testovi za serološko praćenje prisustva i nivoa antitela obolelih od tularemije tokom vremena su IgG Serion ELISA i VIRapid (Tabela 27).

Izračunavanjem Kohen-ovog kappa (k) koeficijenta određen je stepen slaganja između ispitivanih testova. Kappa koeficijent interpretiran je prema skali Landisa i Kocha.

Vrednost K	Stepen saglasnosti
<0	Bez saglasnosti
0,01 – 0,20	Neznatna saglasnost
0,21 – 0,40	Dovoljna saglasnost
0,41 – 0,60	Umerena saglasnost
0,61 – 0,80	Značajna saglasnost
0,81 – 0,99	Skoro potpuna saglasnost
1	Potpuna saglasnost

U tabeli 28 je prikazan stepen slaganja ispitivanih testova. Skoro potpunu saglasnost imali su testovi IgG Serion ELISA i Serazym ELISA (k=0,802). Značajnu saglasnost međusobno su imali IgG i IgM (k=0,766), IgM i VIRapid (k=0,780), IgG i VIRapid (k=0,760), IgG i In-house ELISA (k=0,642), IgG i Western blot (p=0,612) IgM i Serazym (k=0,696), IgM i Western blot (k=0,614), In-house ELISA i VIRapid (k=0,637). Umerena saglasnost postoji između sledećih testova: IgM i In-house ELISA (k=0,586), Serazym ELISA i In-house ELISA (k=0,532), Serazym ELISA i VIRapid (k=0,587), Serazym ELISA i Western blot (k=0,569), In-house ELISA i Western blot (k=0,585) i VIRapid i Western blot (k=0,559).

Na osnovu vrednosti Kohenovog koeficijenta In-house ELISA i Western blot su se pokazali kao testovi sa najmanjom saglasnošću. Primenom bilo kog od ostala četiri testa dobiće se približno isti rezultati (Tabela 28).

Tabela 28. Stepen slaganja ispitivanih testova*

	IgM Serion ELISA	Serazym ELISA	In-house ELISA	VIRapid	Western blot
IgG Serion ELISA	0,766 <0,001	0,802 <0,001	0,642 <0,001	0,760 <0,001	0,612† <0,001‡
IgM Serion ELISA	-	0,696 <0,001	0,586 <0,001	0,780 <0,001	0,614 <0,001
Serazym ELISA		-	0,532 <0,001	0,587 <0,001	0,569 <0,001
In-house ELISA				0,637 <0,001	0,585 <0,001
VIRapid					0,559 <0,001

*Vrednosti su prikazane kao : † Kohen Kappa koeficijent (k) i ‡ -verovatnoća greške procene (p)

Tabela 29. Prikaz broja testiranih seruma u odnosu na interval testiranja u akutnoj fazi bolesti

Protoklo vreme od početka bolesti (meseći)	Oboleli od tularemije n (%)	Kontrolna grupa n (%)	Broj testiranih seruma n (%)
<1	22 (31,9)	13 (56,5)	35 (38,5)
2,3	32 (46,4)	6 (27,3)	38 (41,8)
4-6	13 (18,8)	3 (13,6)	16 (17,6)
7-12	2 (2,9)	-	2 (2,2)
Ukupno	69 (100,0)	22 (100,0)	91 (100,0)

U akutnoj fazi, do godinu dana od početka bolesti, testiran je 91 serum od ukupno 47 bolesnika. Serumi su u intervalima do 1 mesec, 1-3 meseca, 4-6 meseci i 7-12 meseci od početka oboljenja. Kod obolelih od tularemije testirano je 69 seruma od 30 bolesnika a u kontrolnoj grupi 22 seruma od 17 bolesnika. Većina seruma je testirana u periodu do 3 meseca od početka bolesti kako kod obolelih od tularemije (80,3%), tako i u kontrolnoj grupi (86,4%) (p=0,135). Minimalan broj testiranih seruma po pacijentu iznosio je 1 a maksimalan 4 (Me 1, X sr 1,68) (Tabela 29).

Najviše testiranih seruma (30 od ukupno 66) kao i najviše pozitivnih nalaza antitela je nađeno u drugom i trećem mesecu od početka bolesti kod svih testova (96,7%); kod Serazym ELISA testa (93,3%). U odnosu na zastupljenost pozitivnih nalaza, u prvih mesec dana od početka bolesti najviše stvarno pozitivnih nalaza je bilo u Serazym (95,2%) i VIRapid testu (95,0%). Nakon 2, 3 meseca u odnosu na početak bolesti kao i nakon 4 do 6 meseci broj stvarno pozitivnih rezultata je ujednačen među primenjenim testovima. Nakon 4-6 meseci, primenom IgG Serion ELISA i Serazym ELISA testa 92,3% pacijenata su imali stvarno pozitivan nalaz. Primenom ostalih testova procenat stvarno pozitivnih nalaza je bio 84,6%. Nakon 7 do 12 meseci testirano je samo 2 seruma koji su bili stvarno pozitivni primenom svih seroloških testova (Tabela 30).

Tabela 30. Komparativni prikaz rezultata korišćenih testova u analizi uzoraka seruma obolelih u akutnoj fazi bolesti

Serološki testovi	Nalaz	Akutna faza (meseci)				Ukupno seruma n=69
		< 1 n=22	2 - 3 n=32	4 - 6 n=13	7 - 12 n=2	
IgG Serion ELISA	Sp	18 (85,7)	29 (96,7)	12 (92,3)	2 (100,0)	61 (92,4)
	Ln	3 (14,3)	1 (3,3)	1 (7,7)	-	5 (7,6)
IgM Serion ELISA	Sp	19 (90,5)	29 (96,7)	11 (84,6)	2 (100,0)	61 (92,4)
	Ln	2 (9,5)	1 (3,3)	2 (15,4)	-	5 (7,6)
Serazym ELISA	Sp	20 (95,2)	28 (93,3)	12 (92,3)	2 (100,0)	62 (93,9)
	Ln	1 (4,8)	2 (6,7)	1 (7,7)	-	4 (6,1)
In-house ELISA	Sp	13 (65,0)	29 (96,7)	11 (84,6)	2 (100,0)	55 (84,6)
	Ln	7 (35,0)	1 (3,3)	2 (15,4)	-	10 (15,4)
VIRapid	Sp	19 (95,0)	29 (96,7)	11 (84,6)	2 (100,0)	61 (92,4)
	Ln	1 (5,0)	1 (3,3)	2 (15,4)	-	5 (7,6)
Western blot	Sp	18 (85,7)	29 (96,7)	11 (84,6)	2 (100,0)	60 (90,9)
	Ln	3 (14,3)	1 (3,3)	2 (15,4)	-	6 (9,1)

Broj pozitivnih nalaza seruma tokom ispitivanog perioda je ujednačen. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza tokom vremena kod testova IgG Serion ELISA ($p=0,673$), IgM Serion ELISA ($p=0,876$), Serazym ($p=0,912$), VIRapid ($p=0,876$), Western blot ($p=0,740$). Broj pozitivnih nalaza tokom vremena se statistički značajno razlikuje jedino primenom In-house ELISA testa ($p=0,031$) (Tabela 30).

Tabela 31. Komparativni prikaz rezultata korišćenih testova u analizi uzoraka seruma i bioptata obolelih u periodu od 1 do 11 godina

Imunodijagnostički testovi	Nalaz	Period praćenja (godine)			Ukupno n=88
		1 - 3 n=16	4 - 7 n=31	8 - 11 n=41	
IgG Serion ELISA	Sp	16 (100,0)	31 (100,0)	39 (95,1)	86 (97,7)
	Ln	-	-	2 (4,9)	2 (2,3)
IgM Serion ELISA	Sp	15 (93,8)	28 (90,3)	37 (92,5)	80 (92,0)
	Ln	1 (6,2)	3 (3,4)	3 (7,5)	7 (8,0)
Serazym ELISA	Sp	16 (100,0)	31 (100,0)	40 (100,0)	87 (100,0)
	Ln	-	-	-	-
In-house ELISA	Sp	14 (87,5)	19 (61,3)	31 (75,6)	64 (72,7)
	Ln	2 (12,5)	12 (38,7)	10 (24,4)	24 (27,3)
VIRapid	Sp	16 (100,0)	31 (100,0)	41 (100,0)	88 (100,0)
	Ln	-	-	-	-
Western blot	Sp	15 (93,8)	27 (87,1)	37 (90,2)	79 (89,8)
	Ln	1 (1,1)	4 (12,9)	4 (9,8)	9 (10,2)
IIP	Sp	3 (60,0)	3 (100,0)	7 (58,3)	13 (65,0)*
	Ln	2 (40,0)	-	5 (41,7)	7 (35,0)

* IIP rađena kod 20 bolesnika

Ukupno je praćeno 88 pacijenata u periodu od 1 do 11 godina od početka bolesti. Od svakog pacijenta uzet je po jedan kontrolni uzorak seruma koji je testiran sa vise seroloških testova. Analizom dobijenih rezultata, nakon testiranja seruma u periodu od 1 do 11 godina od početka bolesti, pokazano je da IgG Serion ELISA, Serazym ELISA i VIRapid imaju ujednaćen broj stvarno pozitivnih uzoraka odnosu na proteklo vreme od početka bolesti. Serazym ELISA i VIRapid test pokazuju 100% pozitivnost nalaza koja se održava tokom celog ispitivanog perioda. Kod IgG Seriona ELISA testa, do 7 godina svi nalazi su stvarno pozitivni, a nakon 7 godina procenat stvarno pozitivnih je 95,1%. IgM Serion ELISA testom takođe je ujednaćen broj stvarno pozitivnih pacijenata u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti i kreće se od 90,3% do 93,8%. Slični rezultati su dobijeni i Western blot testom. In house ELISA testom nešto je manji udeo stvarno pozitivnih u odnosu na ostale testove i kreće se od (87,5%) u periodu od 1 do 3 godine, do (61,3%) od 4 do 7 godina.

Metoda indirektno imunoperoksidaze je primenjena u analizi 20 uzoraka biopata limfonodusa obolelih od tularemije. U grupi od 1 do 3 godine 60,0% pacijenata je imalo stvarno pozitivan nalaz, u grupi od 4 do 7 godina svi pacijenti su imali stvarno pozitivan nalaz i u grupi od 8 do 11 godina 58,3% pacijenata je imalo stvarno pozitivan nalaz (Tabela 31).

Tabela 32. Prikaz rezultata IgG i IgM antitela na *F. tularensis* u odnosu na period testiranja

Vremenski period (godine)	Broj bolesnika n	Pozitivan nalaz IgG n (%)	Pozitivan nalaz IgM n (%)
1	5	5 (100,0)	5 (100,0)
2	6	6 (100,0)	5 (83,3)
3	5	5 (100,0)	5 (100,0)
4	-	-	-
5	7	7 (100,0)	5 (71,4)
6	14	14 (100,0)	14 (100,0)
7	10	10 (100,0)	9 (90,0)
8	16	16 (100,0)	15 (93,8)
9	1	1 (100,0)	1 (100,0)
10	7	6 (85,7)	7 (100,0)
11	17	16 (94,1)	14 (82,4)
Ukupno	88	86 (97,7)	80 (90,9)

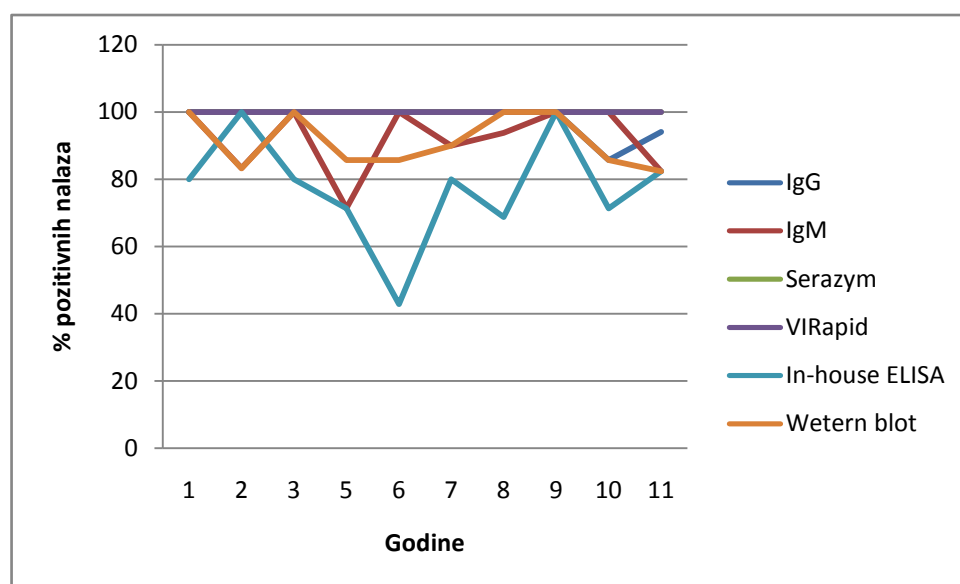
U tabeli je prikazan broj pacijenata sa pozitivnim nalazom IgG i IgM antitela u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti. IgG Serion test je dao 100% pozitivne rezultate do 9 godina od početka bolesti, potom pozitivnost blago pada posle 10. godina – 85,7% a onda blago raste posle 11. godina – 94,1%. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza IgG antitela u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti ($p=0,342$). Evidentno je održavanje pozitivnosti IgG antitela i 11 god posle infekcije.

Pozitivan nalaz IgM antitela se kretao od 71,4% do 100,0%. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza IgM antitela u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti ($p=0,432$) (Tabela 32, Grafikon 4).

Tabela 33. Rezultati seroloških testova za dokazivanje ukupnih antitela na antigene *F. tularensis* u odnosu na period testiranja

Vremenski period (godine)	Broj bolesnika n	Serazym ELISA n (%)	In-house ELISA n (%)	VIRapid n (%)	Western blot n (%)
1	5	5 (100,0)	4 (80,0)	5 (100,0)	5 (100,0)
2	6	6 (100,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	5 (83,3)
3	5	5 (100,0)	4 (80,0)	5 (100,0)	5 (100,0)
4	-	-	-	-	-
5	7	7 (100,0)	5 (71,4)	7 (100,0)	6 (85,7)
6	14	14 (100,0)	6 (42,9)	14 (100,0)	12 (85,7)
7	10	10 (100,0)	8 (80,0)	10 (100,0)	9 (90,0)
8	16	16 (100,0)	11 (68,8)	16 (100,0)	16 (100,0)
9	1	1 (100,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	1 (100,0)
10	7	7 (100,0)	5 (71,4)	7 (100,0)	6 (85,7)
11	17	17 (100,0)	14 (82,4)	17 (100,0)	14 (82,4)
Ukupno	88	88 (100,0)	64 (72,7)	88 (100,0)	79 (89,8)

Tokom perioda od 1 do 11 godina od početka bolesti, svi ispitivani serumi (100%) u Serazym i VIRapid testu su dali pozitivnu reakciju. Primenom In-house ELISA testa procenat pozitivnog nalaza u odnosu na vreme testiranja se kretao od 42,9% do 100,0%. Western blot je bio pozitivan kod većine pacijenata (82,4% -100,0%) u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti (Tabela 33, Grafikon 4).

**Grafikon 4.** Dinamika pozitivnih nalaza specifičnih antitela u u posmatranom periodu primenom navedenih testova

Primenom indirektna imunoperoksidazne metode, od 20 analiziranih bioptata limfnih čvorova u 65% je dokazan antigen na LPS *F. tularensis*. Specifičan antigen je detektovan u 33,3% do 100,0% uzoraka obolelih od tularemije u ispitivanom periodu. Najveći broj analiza IIP je obavljen nakon 10 godina od uzimanja bioptata kada je procenat pozitivnih nalaza iznosio 66,7%. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza imunohistohemije u odnosu na period testiranja ($p=0745$) (Tabela 34).

Tabela 34. Rezultati imunohistohemijske analize uzoraka tkiva obolelih od tularemije

Proteklo vreme (godine)	Pozitivan nalaz n (%)	Negativan nalaz n (%)
1	-	-
2	2 (66,7)	1 (33,3)
3	1 (50,0)	1 (50,0)
4	1 (100,0)	-
5	-	-
6	1 (100,0)	-
7	1 (100,0)	-
8	-	-
9	1 (33,3)	2 (66,7)
10	4 (66,7)	2 (33,3)
11	2 (66,7)	1 (33,3)
Ukupno	13 (65,0)	7 (35,0)

Tabela 35. Nalaz specifičnih antitela IgG i IgM klase na *F. tularensis* u serumima obolelih u odnosu na period testiranja

Period testiranja (godine)	Broj bolesnika n (%)	Pozitivan nalaz IgG n (%)	Pozitivan nalaz IgM n (%)
1-3	16 (18,2)	16 (100,0)	15 (93,8)
4-7	31 (35,2)	31 (100,0)	28 (90,3)
8-11	41 (46,6)	39 (95,1)	37 (90,2)
Ukupno	88 (100,0)	86 (97,7)	80 (90,9)

U tabeli je prikazan nalaz IgG i IgM antitela na *F. tularensis* u serumima pacijenata, testa Serion ELISA classic, u odnosu na vreme testiranja. Svi serumi pacijenata (100%) su imali pozitivan nalaz IgG antitela Serion ELISA classic testa do 7 godine od početka bolesti. Broj pozitivnih nalaza IgG antitela na *F. tularensis* je neznatno pao u periodu od 8 do 11 godina od početka bolesti (95,1%). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza IgG antitela u odnosu na vremenske intervale testiranja ($p=0,309$).

Pokazano je da je najveći broj pozitivnih nalaza IgM antitela registrovan u grupi bolesnika od 1 do 3 godine od početka bolesti (93,8%), a u ostalim grupama procenat pozitivnih nalaza je bio skoro jednak (90,3% odnosno 90,2%). Daljom analizom je pokazano da se IgM antitela održavaju tokom ispitivanog perioda. Ne postoji statistički značajna razlika u njihovom nalazu u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti ($p=0,908$) (Tabela 35).

Tabela 36. Nalaz ukupnih antitela na *F. tularensis* u serumima obolelih primenom ostalih imunodijagnostičkih testova u odnosu na vremenske intervale testiranja

Vremenski interval (godine)	Broj bolesnika n (%)	Serazym ELISA n (%)	In-house ELISA n (%)	VIRapid n (%)	Western blot n (%)
1-3	16 (18,2)	16 (100,0)	14 (87,5)	16 (100,0)	15 (93,8)
4-7	31 (35,2)	31 (100,0)	19 (61,3)	31 (100,0)	27 (87,1)
8-11	41 (46,6)	41 (100,0)	31 (75,6)	41 (100,0)	37 (90,2)
Ukupno	88 (100,0)	88 (100,0)	64 (72,7)	88 (100,0)	79 (89,8)

Analizirani serumi pacijenata bili su pozitivni u Serazym Elisa i VIRapid testu. Procenat pozitivnog nalaza u In-house ELISA testu se kretao od 61,3% do 87,5%. Western blot je bio pozitivan kod 93,8% pacijenata u periodu do 3 godine od početka bolesti, potom pozitivnost blago pada od 4 do 7 godine (87,1%) i ponovo blago raste od 8 do 11 godine (90,2% p). Ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza u odnosu na vremenske intervale testiranja (Serazym ELISA p=1,0, In-house ELISA p=0,136, VIRapid p=1,0, Western blot p=0,768) (Tabela 36).

Tabela 37. Broj pozitivnih testova koji su korišćenih u serološkoj dijagnostici tularemije

Broj pozitivnih testova	Broj pacijenata	%
1	7	6,2
2	4	3,5
3	2	1,8
4	7	6,2
5	24	21,2
6	63	55,8
7	6	5,3
Ukupno	113	100,0

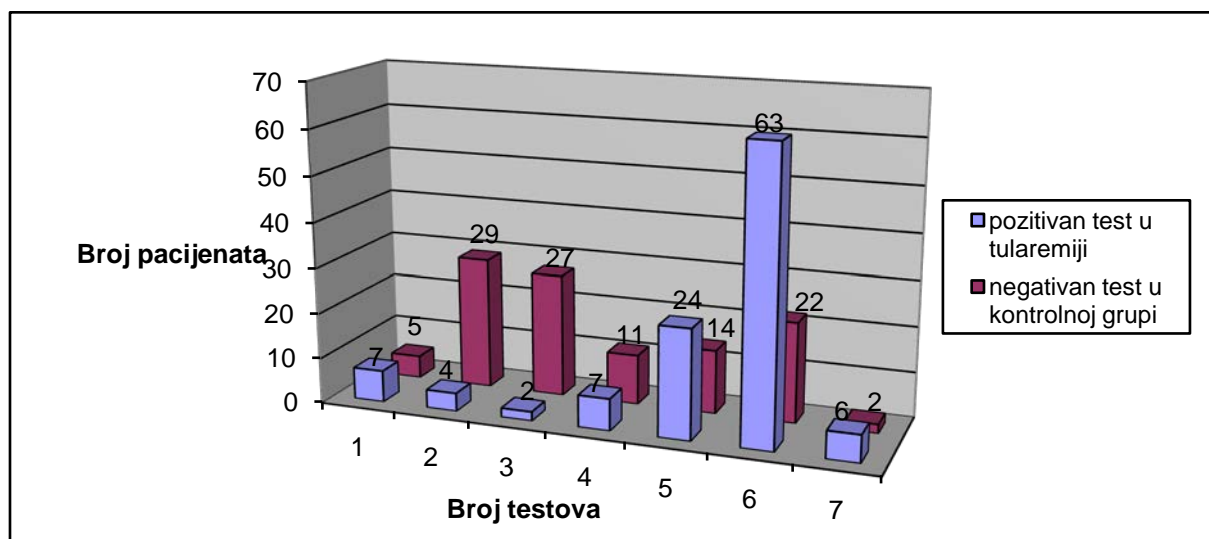
Od 113 obolelih od tularemije većina je imala 6 pozitivnih testova - 63 bolesnika (55,8%), zatim 5 pozitivnih testova-24 bolesnika (21,2%). Svih 7 pozitivnih testova imala su 6 bolesnika. Prosečan broj pozitivnih testova po bolesniku iznosio je 5,21, Me 6,0, Min 1 Max 7, SD 1,48. (Tabela 37, Grafikon 5)

Tabela 38. Broj negativnih testova kod obolelih od tularemije

Broj negativnih testova	Broj pacijenata	%
0	62	54,9
1	34	30,1
2	12	10,6
3	5	4,4
Ukupno	113	100,0

Od ukupno 8 dijagnostičkih testova, najveći broj obolelih od tularemije nije imao nijedan negativan test (svih 8 je bilo pozitivno kod 62 ili 54,9% bolesnika). Jedan negativan test imalo je 34 (30,1%) bolesnika a 2 negativna testa 12 (10,6%) bolesnika. Prosečan broj negativnih testova po bolesniku iznosio je 0,65 (Tabela 38).

U kontrolnoj grupi (n=111) najveći broj pacijenata je imao 2 negativna testa - 29 bolesnika (26,1%), zatim 3 negativna testa - 27 bolesnika (24,3%) i 6 negativnih testova (19,8%). Prosečan broj negativnih testova po bolesniku iznosio je 3,64. Na grafikonu se ne vidi linearna zavisnost broja pozitivnih i negativnih testova i pacijenata kao što bi se očekivalo. Ovo je iz razloga što nisu svi serumi pacijenata iz grupe obolelih kao i iz kontrolne grupe testirani svim testovima. Dok je u grupi obolelih najvećem broju pacijenata rađeno 6 testova, u kontrolnoj grupi najvećem broju pacijenata je rađeno 3 i 6 testova (Grafikon 5).



Grafikon 5. Odnos broja pozitivnih i negativnih testova kod obolelih i u kontrolnoj grupi

Kod izračunavanja broja pozitivnih testova po bolesniku, uzeti su u obzir testovi (IgG Serion ELISA, IgM Serion ELISA, Serazym ELISA, ELISA in house, VIRapid, Western blot i IIP). Prosečan broj pozitivnih testova po bolesniku je iznosio $5,21 \pm 1,48$, a negativnih $0,65 \pm 0,84$. Najveći broj pozitivnih testova po bolesniku je zabeležen posle godinu dana od početka bolesti ($6,20 \pm 0,084$), a najmanji nakon 10 godina od početka bolesti ($4,20 \pm 2,39$). Najveći broj negativnih testova je registrovan nakon 1 godine od početka bolesti ($2,60 \pm 2,70$) a najmanji nakon 3 godine od početka bolesti ($0,33 \pm 0,052$). Ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih i negativnih testova po bolesniku u odnosu na vreme testiranja (za pozitivne testove $p=0,638$ a za negativne $p=0,208$) (Tabela 39).

Prosečan broj pozitivnih testova u svim uzorcima seruma uključujući i parne i kontrolne iznosio je $5,28 \pm 1,45$. Ovaj broj se statistički značajno ne razlikuje u odnosu na prosečan broj pozitivnih testova kod pacijenata kojima je uzet samo jedan serum ($p=0,720$).

Prosečan broj negativnih testova na svim serumima uključujući i kontrolne iznosio je $0,61 \pm 1,05$. Ovaj broj se statistički značajno ne razlikuje u odnosu na prosečan broj negativnih seruma kod pacijenata kojima je uzet samo jedan serum ($p=0,752$).

Prosečan broj pozitivnih testova po bolesniku je statistički značajno veći u odnosu na prosečan broj negativnih testova kod obolelih od tularemije ($t=28,484$, $p<0,001$) (Tabela 39).

Tabela 39. Broj pozitivnih i negativnih testova po bolesniku u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti*

Vreme testiranja (godine)	Broj bolesnika (%)	Broj pozitivnih testova	Broj negativnih testova
<1 meseca	7 (6,2)	4,71±2,14 6,00 (1,00-7,00)	0,86±1,21† 0 (0,00-3,00) ‡
2 - 3 meseca	7 (6,2)	4,57±2,44 6,00 (1,00-6,00)	0 -
4 - 6 meseci	3 (2,6)	6 -	0 -
7 - 12 meseci	1 (0,9)	6 -	0 -
1	5 (4,4)	6,20±0,84 6,00 (5,00-7,00)	2,60±2,70 2,00 (0,00-7,00)
2	7 (6,2)	5,00±0,1,82 6,00 (5,00-6,00)	0,86±0,90 1,00 (0,00-2,00)
3	6 (5,3)	5,17±2,14 6,00 (5,00-7,00)	0,33±0,52 0,00 (0,00-1,00)
4	-	-	-
5	7 (6,2)	5,43±1,27 6,00 (3,00-7,00)	0,86±1,07 1,00 (0,00-3,00)
6	14 (12,4)	5,29±0,73 5,00 (4,00-6,00)	0,71±0,73 1,00 (0,00-2,00)
7	11 (9,7)	5,18±1,47 6,00 (5,00-6,00)	0,54±0,93 0,00 (0,00-3,00)
8	16 (14,2)	5,62±0,50 6,00 (5,00-6,00)	0,50±0,63 0,00 (0,00-2,00)
9	1 (0,9)	6 -	0 -
10	10 (8,8)	4,20±2,39 5,00 (4,00-7,00)	0,70±0,95 1,00 (0,00-2,00)
11	18 (15,9)	5,17±1,50 6,00 (2,00-6,00)	0,50±0,92 0,00 (0,00-3,00)
Ukupno	113 (100,0)	5,21±1,48 6,00 (1,00-7,00)	0,65±0,84 0,00 (0,00-3,00)

*Vrednosti su date kao † $\bar{X} \pm SD$ ili ‡ Me (Min-Max), u zavisnosti od tipa rasporeda

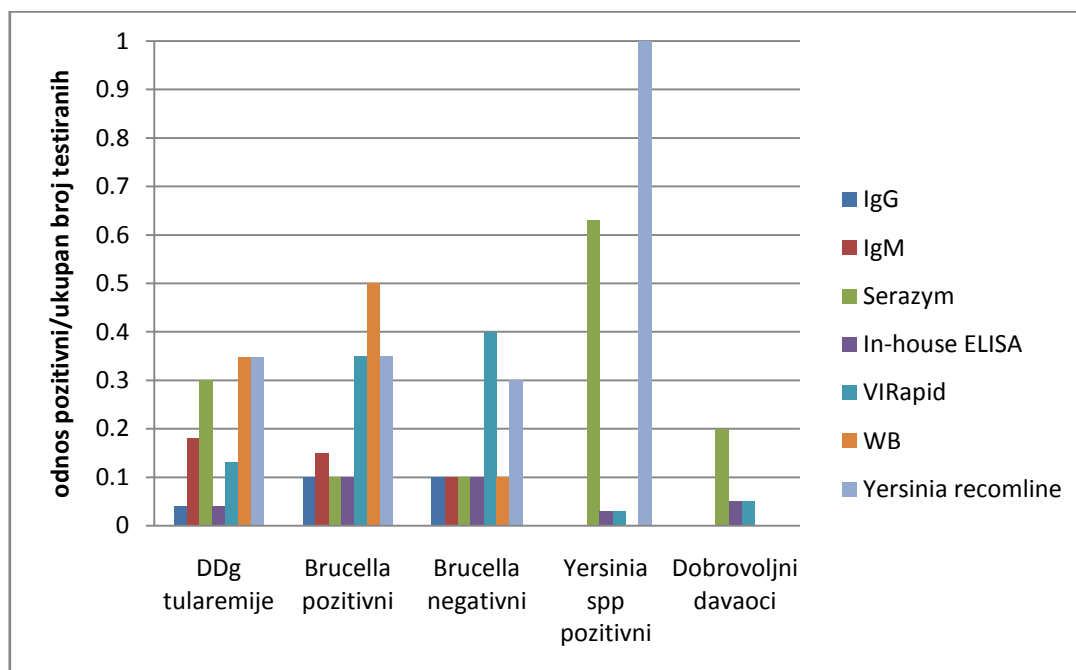
Tabela 40. Rezultati ukrštene reaktivnosti antigeno srodnih bakterija sa *Yersinia spp.* u grupi obolelih od tularemije i u kontrolnoj grupi

Yersinia recomLine test	Oboleli	Kontrolna grupa					Ukupno
		Ddg tularemije n=31	Brucella pozitivni n=20	Brucella negativni n=10	Yersinia pozitivni n=30	Yersinia negativni n=20	
Pozitivni <i>Yersinia spp</i>	22/103	6/23	6/20	3/10	19/30	-	34/103
<i>Y. enterocolitica</i>	13/103	2/23	-	-	5/30	-	7/103
<i>Y. pseudoTBC</i>	11/103	-	1/20	-	6/30	-	7/103
Negativni	57/103	15/23	13/20	7/10	-	20/20	55/103
Nije rađeno	10/113	8/31	-	-	-	-	8/111
Ukupno	103/113	23/111	20/111	10/111	30/111	20/111	103/111

Kod 46 od 103 (44,7%) seruma obolelih kojima je rađen *Yersinia recomLine* test nađena su pozitivna antitela na jersiniju. Od njih je kod 13 dokazana *Yersinia enterocolitica*, kod 11 *Yersinia pseudotuberculosis* a preostalih 22 nije moglo biti određeno kojoj vrsti pripadaju pa su činili *Yersinia spp.* U kontrolnoj grupi 48 od 103 (46,6%) seruma pacijenata kojima je rađen *Yersinia recomLine* test je imalo pozitivna antitela prema vrstama roda *Yersinia*. Od njih je kod 7 potvrđena *Yersinia enterocolitica*, kod 7 *Yersinia pseudotuberculosis* a kod preostalih 34 *Yersinia spp.* Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti antitela na jersiniju između obe ispitivane grupe ($p=0,889$) ($p=0,265$) (Tabela 40).

Tabela 41. Rezultati ukrštene reaktivnosti *F.tularensis* sa vrstama *Yersinia spp.* i *Brucella spp.* u kontrolnoj grupi

	IgG Serion ELISA	IgM Serion ELISA	Serazym ELISA	In-house ELISA	VIRapid	Western blot	<i>Yersinia recomLine</i>
DDg tularemije	1/23	4/22	7/23	1/23	3/23	8/23	8/23
Brucella pozitivni	2/20	3/20	2/20	2/20	7/20	10/20	7/20
Brucella negativni	1/10	1/10	1/10	1/10	4/10	1/10	3/10
<i>Yersinia spp.</i> pozitivni	-	-	19/30	1/30	1/30	0/1	30/30
Dobrovoljni davaoci krvi (<i>Yersinia neg</i>)	-	-	4/20	1/20	1/20	0/2	0/20



Grafikon 6. Ukrštena reaktivnost *F.tularensis* sa *Yersinia spp.* i *Brucella spp.* u kontrolnoj gr.

Tabela 41 prikazuje pozitivan nalaz antitela na *F.tularensis* i *Yersinia spp.* u serumima bolesnika kontrolne grupe, korišćenim serološkim testovima. Najmanji broj pozitivnih nalaza antitela na *F.tularensis* dobijen je primenom IgG ELISA i in-house ELISA testa, potom IgM ELISA testa. VIRapid testom dobijena je skoro trećina pozitivnih nalaza antitela na *F.tularensis* (7 od 20) u grupi *Brucella* pozitivnih seruma. WB testom je nađeno 50% antitela na *F.tularensis* u serumima obolelih od bruceloze i 34,85% u serumima bolesnika sa DDg tularemije. Serazym ELISA testom je ustanovljena ukrštena reaktivnost sa *F.tularensis* u čak 63,3% *Yersinia* pozitivnoj grupi i 30,4% u grupi Ddg tularemije. Imunoenzimskim *Yersinia recomLine* testom otkriveno je prisustvo antitela na vrste roda *Yersinia* kod 8 od 23 (34,8%) obolelih od limfadenopatija različite geneze, kod 7 od 20 bolesnika sa bruceozom (35%) i 3 od 10 bolesnika (30%) kod kojih je bruceloza isključena (Tabela 41, Grafikon 6).

4.3.3. Imunohistohemijsko ispitivanje uzoraka limfnih čvorova pacijenata sa granulomatoznim limfadenitisom

Ukupno je ispitano 26 bioptata limfnih čvorova: 19 sa serološkom potvrdom na tularemiju, 5 bez serološke potvrde i 2 sa negativnim serološkim rezultatima na antigene *F.tularensis*. Za pozitivnu kontrolu korišćeno je tkivo slezine inficiranog kunića. Korišćena je metoda indirektno imunoperoksidaze sa primenom primarnih monoklonskih antitela specifičnih za *F. tularensis*: mab FT 11/1/1 i mab 3FT6 kao i nespecifičnih za negativnu kontrolu: mab C16-protiv BVDV.

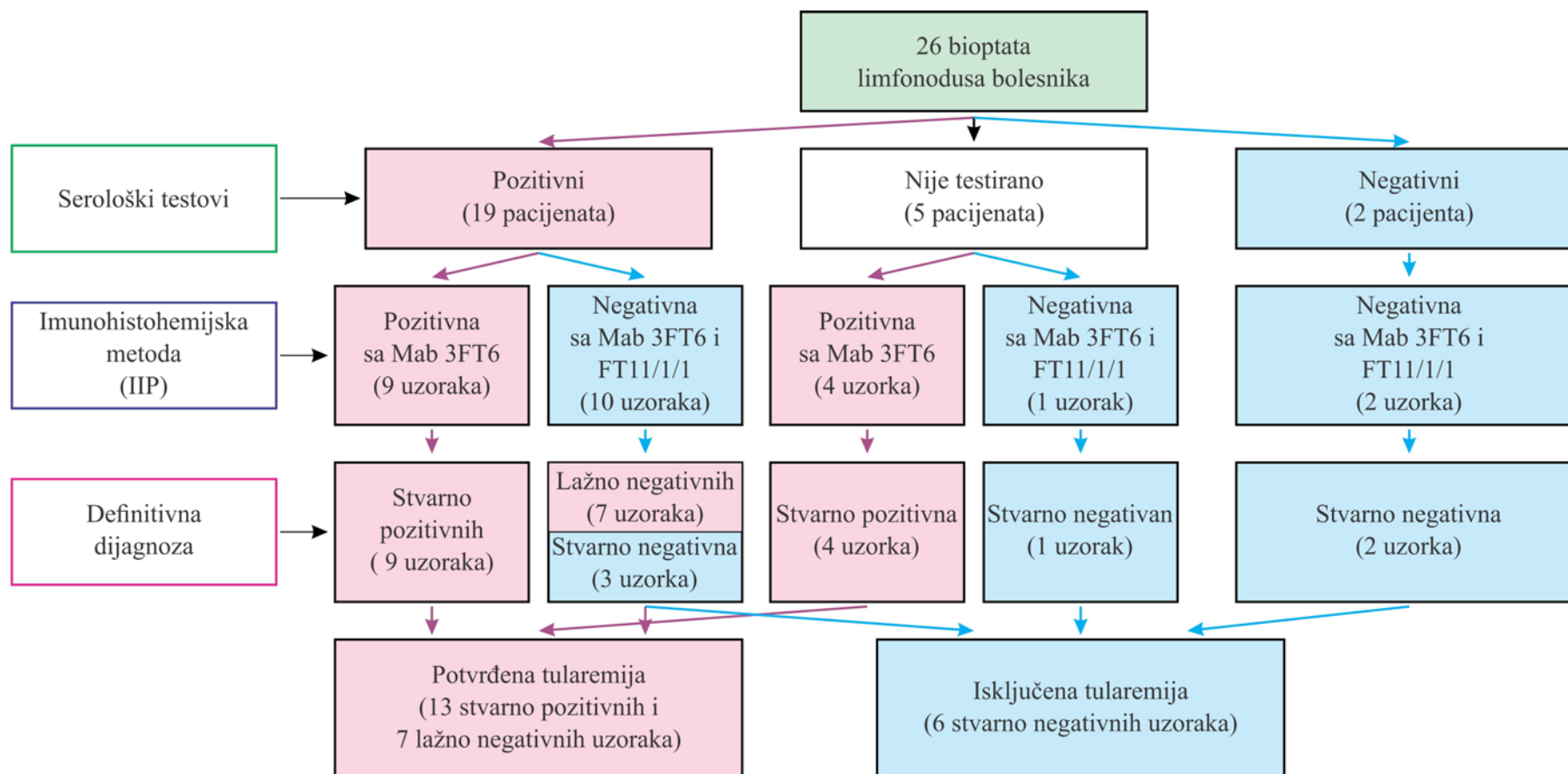
Rezultati:

Uzorak slezine kunića (pozitivna kontrola) je bio pozitivan u navedenom testu (IHH) primenom oba *Francisella*-specifična monoklonska antitela i negativan primenom nespecifičnog mab C16. Svi bioptati limfnih čvorova su bili negativni u reakciji sa nespecifičnim mab C16 (nije bilo lažno pozitivnih reakcija).

Od 19 uzoraka sa serološkom potvrdom na tularemiju, 9 je bilo pozitivno korišćenjem imunohistohemijske metode sa mab 3FT6 na antigen *F. tularensis*, a samo 2 uzorka od 9 potvrđenih sa mab 3FT6 na antigen *F. tularensis* je bilo pozitivno i sa mabFT 11/1/1. Preostalih 10 uzoraka je bilo negativno primenom oba monoklonska antitela od čega je bilo 7 lažno negativnih i 3 stvarno negativna. MabFT 11/1/1 se pokazao kao manje senzitivn.

Od 5 uzoraka bez serološke potvrde na tularemiju, 4 je bilo pozitivno nakon IHC na *F.tularensis* korišćenjem mab3FT6, a samo jedan od 4 uzorka je bio pozitivan korišćenjem manje senzitivnog mabFT 11/1/1. Preostali 1 uzorak je bio negativan primenom oba monoklonska antitela.

Dva uzorka pacijenta serološki negativnih na tularemiju su takođe bila negativna korišćenjem IHC na *F.tularensis* primenom oba monoklonska antitela. (Grafikon br 7) *Franscella tularensis* je detektovana multifokalno u područjima nekroze i/ili u makrofagima u pozitivnim uzorcima. Mikroskopski je uočen veoma nizak broj obeleženih bakterija u većini slučajeva. Nešto veći broj obeleženih bakterija je viđen samo u 4 slučajeva (Slike 19 i 20).



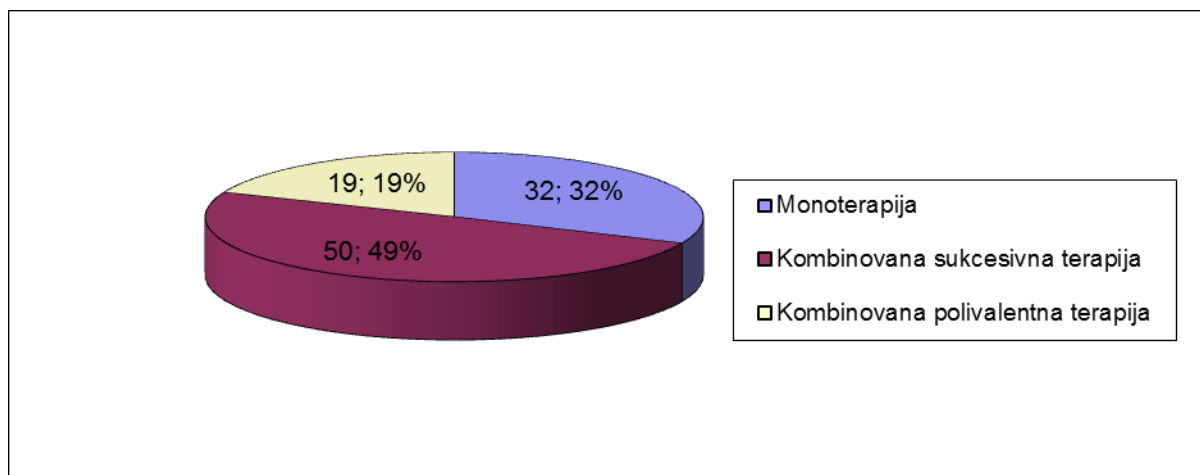
Grafikon 7. Rezultati imunohistohemijskog ispitivanja pacijenata sa granulomatoznim limfadenitisom

4.4. Terapija i ishod bolesti

Tabela 42. Prebolničko i bolničko lečenje kod obolelih od tularemije

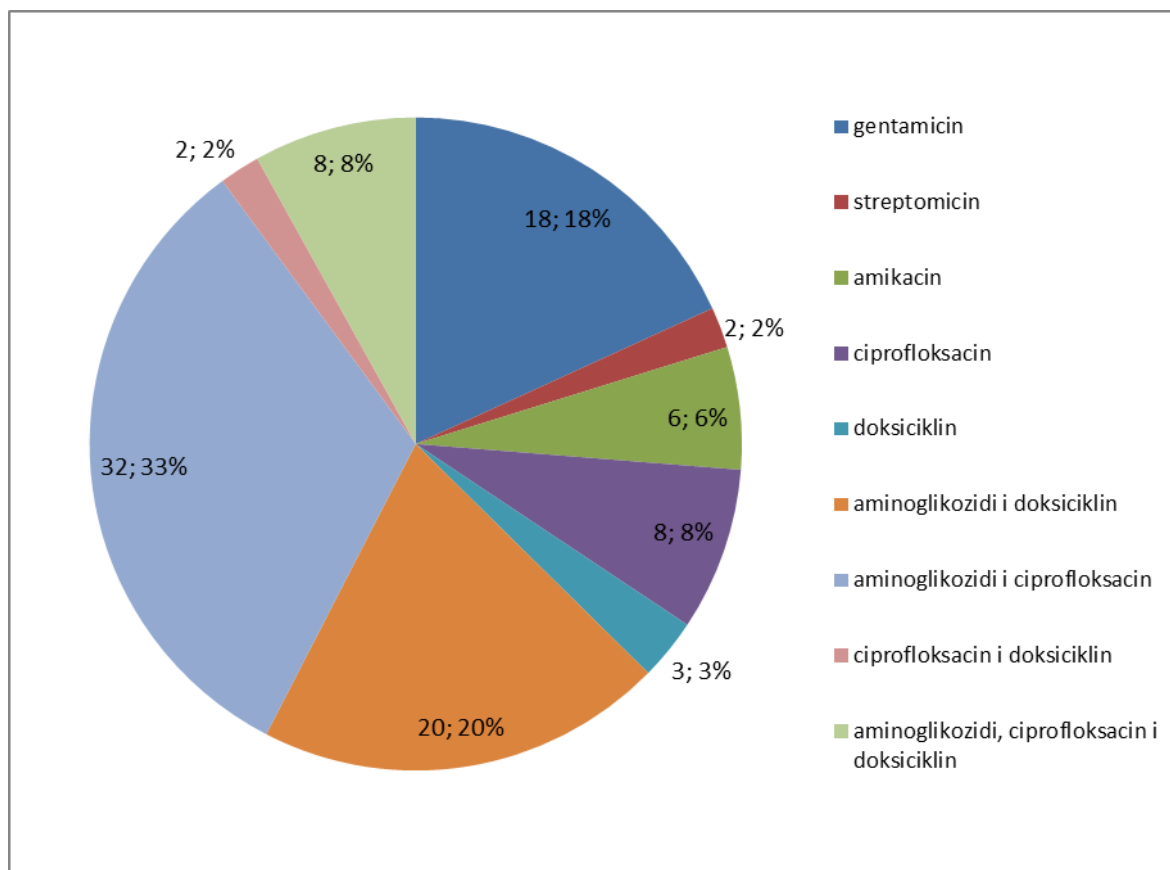
Terapija	Lečenje		p
	Prebolničko n (%)	Bolničko n (%)	
Bez terapije	13 (11,5)	0	
Neadekvatna	51 (45,1)*	2 (1,8)	<0,001
Adekvatna	9 (7,9)	77 (68,1)*	<0,001
Polipragmazija	23 (20,4)	22 (19,5)	0,448
Bez podataka	17 (15,0)	12 (10,6)	
Ukupno	113 (100,0)	113 (100,0)	

Pre hospitalizacije 11,5% obolelih nije lečeno, 45,1% je lečeno neadekvatno, 7,9 % je lečeno adekvatno, 20,4% je primalo mešovitu antibiotsku terapiju (polipragmazija), a 15,0% bolesnika nema podataka o lečenju. Polipragmazija je podrazumevala primenu polimikrobne terapije u kojoj su bili odgovarajući ali i ostali antibiotici. Kod naših hospitalizovanih bolesnika lečenih bolesnika (n=101) adekvatna terapija je primenjena kod 76,2%, neadekvatna kod 2,0%, a mešovita kod 21,8% obolelih. Neadekvatna terapija u prehospitalnom periodu je statistički značajno zastupljenija u odnosu na istu terapiju u hospitalnom periodu ($\chi^2=75,69$, $p<0,001$). Zastupljenost adekvatnog bolničkog lečenja u hospitalnom periodu je statistički značajno veća u odnosu na njenu zastupljenost u prehospitalnom periodu ($\chi^2=75,66$, $p<0,001$). Polipragmazija je podjednako zastupljena u oba perioda lečenja i povećava procenat neadekvatnog lečenja za oko 20% ($p=0,448$) (Tabela 42).



Grafikon 8. Antibioticska terapija kod obolelih od tularemije

Od 113 bolesnika, antibioticima je lečeno ukupno 101. Monoterapijom je tretirano 32 pacijenta (28,3%), kombinovanom terapijom 69 (61,1%), a za 12 bolesnika (10,6%) nije bilo podataka o lečenju. Kombinovanom polivalentnom terapijom je lečeno 19 (18,8%) a kombinovanom sukcesivnom 50 bolesnika (49,5%) (Grafikon 8).



Grafikon 9. Definitivna šema primenjenih antibiotika

Adekvatnu antimikrobnu terapiju je primalo 99 pacijenata. Pacijenti su tretirani sledećim antibioticima: 1. gentamicin (18 pacijenata, 18,2%), 2. streptomicin (2 pacijenta, 2,0%), 3. amikacin (6 pacijenata, 6,1%), 4. ciprofloksacin (8 pacijenata, 8,1%), 5. doksiciklin (3 pacijenta, 3,0%), 6. aminoglikozid i doksiciklin (20 pacijenata, 20,2%), 7. aminoglikozid i ciprofloksacin (32 pacijenata, 32,3%), 8. ciprofloksacin i doksiciklin (2 pacijenta, 2,0%), 9. aminoglikozid, ciprofloksacin i doksiciklin (8 pacijenata, 8,1%). Definitivna šema primenjenih antibiotika prikazana je na grafikonu 9.

Tabela 43. Vrsta antimikrobne terapije i dužina bolničkog lečenja

Vrsta antibiotika	Dužina lečenja (u danima)					
	Xsr	SD	CV	Me	Min	Max
Gentamicin (n=74)	10,43	6,31	60,5	10,00	4,00	42,00
Streptomicin (n=9)	9,14	1,46	15,97	10,00	6,00	10,00
Amikacin (n=10)	6,90	2,33	33,77	7,00	2,00	10,00
Ciprofloksacin (n=49)	11,06	5,70	51,54	10,00	5,00	30,00
Doksiciklin (n=33)	8,64	3,82	44,21	7,00	5,00	21,00

Najveći broj bolesnika je primao gentamicin (74), slede ciprofloksacin (49), doksiciklin (33), amikacin (10) i streptomicin (9). U pogledu dužine bolničkog lečenja najkraće bolničko lečenje iznosilo je Xsr=6,90, Me=7,00 dana kod primene amikacina. Najduže bolničko lečenje bilo je Xsr=11,06 i Me=10 dana kod lečenja ciprofloksacinom. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u dužini lečenja primenjenim antibioticima ($p=0,100$) (Tabela 43).

Tabela 44. Vrsta kombinovane terapije i dužina bolničkog lečenja

Kombinacija antibiotika	Dužina lečenja (u danima)					
	Xsr	SD	CV	Me	Min	Max
Gentamicin i doksiciklin (n=20)	16,90	5,92	35,03	16,00	8,00	30,00
Gentamicin i ciprofloksacin (n=32)	22,52	12,40	55,06	19,00	13,00	60,00
Ciprofloksacin i doksiciklin (n=2)	19,00	2,82	14,84	19,00	17,00	21,00
Gentamicin, ciprofloksacin i doksiciklin (n=8)	30,75	15,58	50,41	28,50	16,00	58,00

Među kombinovanom terapijom najveći broj bolesnika je primao gentamicin i ciprofloksacin (n=32), potom gentamicin i doksiciklin (n=20), gentamicin, ciprofloksacin i doksiciklin (n=8) a najmanje bolesnika (n=2) je primalo ciprofloksacin i doksiciklin. Kombinovana terapija je pretežno bila sukcesivna.

Najkraće bolničko lečenje iznosilo je $X_{sr}=16,9$ Me =16,0 dana kod lečenja gentamicinom i doksiciklinom, a najduže $X_{sr}=30,75$, Me=28,50 dana kod kombinacije gentamicin, ciprofloksacin i doksiciklin.

Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u dužini bolničkog lečenja u odnosu na vrstu kombinovane terapije (Kruskal-Wallis test: $\chi^2=8,091$, $p=0,044$). Mann-Whitney U test pokazuje da su oboleli od tularemije koji su lečeni kombinacijom gentamicina, ciprofloksacina i doksiciklina imali statistički značajno duže bolničko lečenje od obolelih koji su lečeni kombinacijom gentamicina i doksiciklina ($z=-2,501$, $p=0,011$). Pacijenti koji su lečeni gentamicinom i ciprofloksacinom imali su statistički značajno duže lečenje u odnosu na pacijente lečene gentamicinom i doksiciklinom ($z=-2,033$, $p=0,042$) (Tabela 44).

Tabela 45. Prosečna dužina primene antibiotske terapije kod obolelih od tularemije

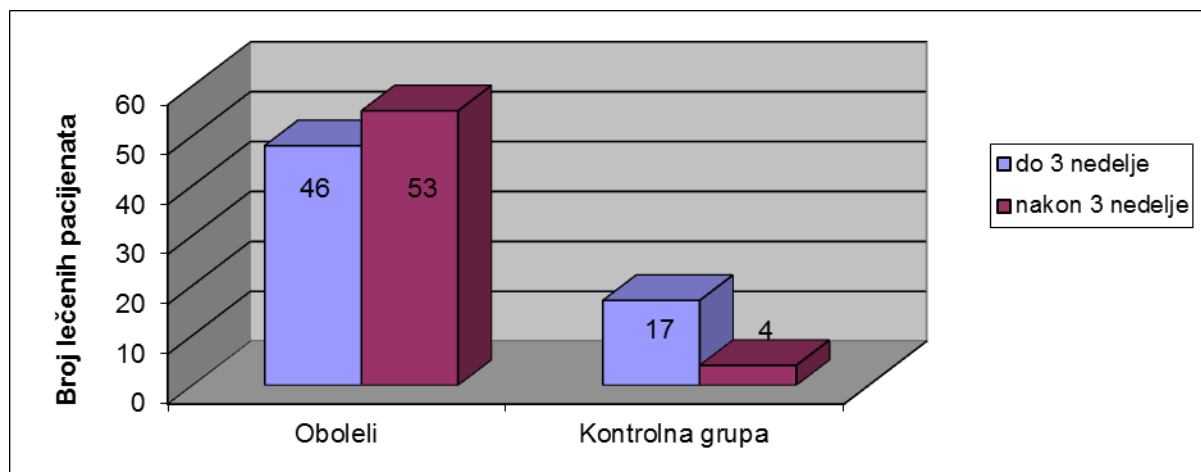
Kombinacija antibiotika	Dužina lečenja (u danima)					
	Xsr	SD	CV	Me	Min	Max
Monoterapija (n=32)	13,09	6,51	49,73	11,00	5,00	36,00
Kombinovana (n=69)	21,22	11,36	53,53	17,00	6,00	61,00

Prosečno trajanje monoterapije iznosilo je 13,0 dana a kombinovane 21,2 dana. Trajanje kombinovane terapije bilo je statistički značajno duže u odnosu na trajanje monoterapije ($z=-5,441$, $p<0,001$) (Tabela 45).

Tabela 46. Ukupno trajanje lečenja kod obolelih od tularemije

Terapija	Trajanje terapije (broj dana)					
	Xsr	SD	Cv	Me	Min	Max
Prehospitalna	15,51	11,08	71,44	10,00	2,00	60,00
Hospitalna	19,05	10,48	56,60	17,00	5,00	61,00
Ukupna	32,77	19,85	60,6	29,00	8,00	150,00

Pre hospitalizacije dužina terapije je bila $15,51\pm 11,08$ dana. Minimalno prehospitalno lečenje je trajalo 2 dana, a maksimalno 60 dana. Za vreme hospitalizacije dužina terapije je bila $19,05\pm 10,48$ dana. Najkraće hospitalno lečenje je trajalo 5 dana, a najduže 61 dan. Ukupno lečenje je trajalo $32,77\pm 19,85$ dana. Najkraće ukupno lečenje je bilo 8 dana, a najduže ukupno lečenje je trajalo 150 dana. Obolele od tularemije karakteriše velika individualna varijabilnost u dužini prehospitalnog, hospitalnog i ukupnog lečenja (Tabela 46).



Grafikon 10. Distribucija započetog adekvatnog lečenja u ispitivanim grupama

U grupi obolelih od tularemije, od ukupno 99 adekvatno lečenih bolesnika, lečenje započeto u periodu kraćem od 3 nedelje od početka bolesti je imalo 46 pacijenata (46,5%), a kod 53 pacijenta (53,5%) je adekvatno lečenje započeto nakon 3 nedelje od početka bolesti. U grupi lečenih pacijenata sa diferencijalnim dijagnozoma tularemije kod 17 pacijenata (81,0%) je započeto lečenje do 3 nedelje od početka bolesti, a kod 4 pacijenta (19,0 %) lečenje je započeto nakon 3 nedelje. Kod obolelih od tularemije je značajno kasnije započeto adekvatno lečenje u odnosu na kontrolnu grupu ($\chi^2=6,94$ $p=0,008$) (Grafikon 10).

Tabela 47. Pojava komplikacija u zavisnosti od vremena započinjanja adekvatnog lečenja kod obolelih od tularemije

Adekvatno lečenje	Sa komplikacijama	Bez komplikacija	Ukupno
	n (%)	n (%)	
< 3 nedelje	10 (23,2)	36 (64,3)	46 (46,5)
> 3 nedelje	33 (76,7)*	20 (35,7)	53 (53,5)
Ukupno	43 (100,0)	56 (100,0)	99(100,0)

* $p<0,001$

Bolesnici koji nisu imali komplikacije u 64,3% slučajeva su adekvatno lečeni do 3 nedelje od početka bolesti. Dve trećine komplikacija (76,6%) su se javile nakon kasnog započinjanja adekvatnog lečenja. Komplikacije se statistički značajno češće javljaju kod pacijenata čije je lečenje započeto nakon 3 nedelje od početka bolesti ($\chi^2=14,85$, $p<0,001$) (Tabela 47).

Tabela 48. Vrsta komplikacija u zavisnosti od vremena započinjanja adekvatnog lečenja kod obolelih od tularemije

Adekvatno lečenje	Komplikacije		
	Apscedirajući limfadenitis	Recidiv	Perzistentna limfadenopatija
< 3 nedelje (n=46)	8 (17,4%)	7 (15,2%)	0
> 3 nedelje (n=53)	31 (58,5%)*	11 (20,8%)	4 (6,6%)
Ukupno (n=99)	39 (39,4%)	18 (18,2%)	4 (4,0%)

* $p<0,001$

Apscedirajući limfadenitis je registrovan kod 17,4% od 46 pacijenta kod kojih je adekvatno lečenje započeto do 3 nedelje od početka oboljenja i 58,5% od 53 pacijenta sa započetim adekvatnim lečenjem nakon 3 nedelje od početka oboljenja. Utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između pojave apscedirajućeg limfadenitisa i vremena započinjanja adekvatnog lečenja ($\chi^2=15,74$, $p<0,001$).

Recidiv je zabeležen kod 15,2% bolesnika adekvatno lečenih unutar 3 nedelje od početka oboljenja i kod 20,8% adekvatno lečenih nakon 3 nedelje od početka oboljenja. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna povezanost između pojave recidiva i vremena započinjanja adekvatnog lečenja ($p=0,651$).

Perzistentna limfadenopatija je ustanovljena 6,6% bolesnika sa adekvatnim lečenjem nakon 3 nedelje od početka oboljenja. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna povezanost u pojavi perzistentne limfadenopatije i vremena započinjanja adekvatnog lečenja ($p=0,121$) (Tabela 48).

Tabela 49. Ishod bolesti u odnosu na primenjenu terapiju

Vrsta terapije	Izlečenje		Komplikacije		
	Bez komplikacija n (%)	Sa komplikacijama n (%)	Apscedirajući limfadenitis n (%)	Recidiv n (%)	Perzistentna limfadenopatija n (%)
Monoterapija (n=32)	26 (81,2)	6 (12,8)	5 (15,6)	1 (3,1)	0
Kombinovana terapija (n=69)	31 (44,9)	38 (55,1)	35 (50,7)	18(26,1)	4 (5,8)
Nema podataka(n=12)	9 (75,0)	3 (25,0)	3 (2,5)	0	0
Ukupno (n=113)	66 (58,4)	47 (41,6)	43 (38,0)	19(16,8)	4 (3,5)

$p=0,001$

Mono terapija je najčešće primenjivana kod bolesnika bez komplikacija. Krajnji ishod lečenja monoterapijom bio je izlečenje bez komplikacija u 81,2% slučajeva. Kombinovana terapija je češće primenjivana kod komplikacija i dovela je do izlečenja u 55,1% slučajeva. Najčešće komplikacije lečene kombinovanom terapijom bile su apscedirajući limfadeniti (50,7%) i recidivi (26,1%). Sva četiri slučaja perzistentne limfadenopatije su se javila nakon lečenja kombinovanom terapijom (Tabela 49). Utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između pojave komplikacija i vrste primenjene terapije ($\chi^2=10,30$, $p=0,001$).

Od 99 pacijenata lečenih odgovarajućom antimikrobnom terapijom kod svih je postignuto izlečenje sa ili bez komplikacija. Dva pacijenta su lečena neodgovarajućom terapijom (jedna trudnica i jedan pacijent sa početka epidemije). Preostalih 12 bolesnika nije lečeno na Infektivnoj klinici već na klinikama za ORL, hematologiju, opštu i dečiju hirurgiju.

Najveći broj pacijenata koji su imali komplikacije lečen je kombinovanom terapijom gentamicin i ciprofloksacin (20), gentamicin i doksiciklin (6), amikacin i longacef (6 bolesnika) (Tabela 50).

Tabela 50. Vrsta antimikrobne terapije i ishod lečenja

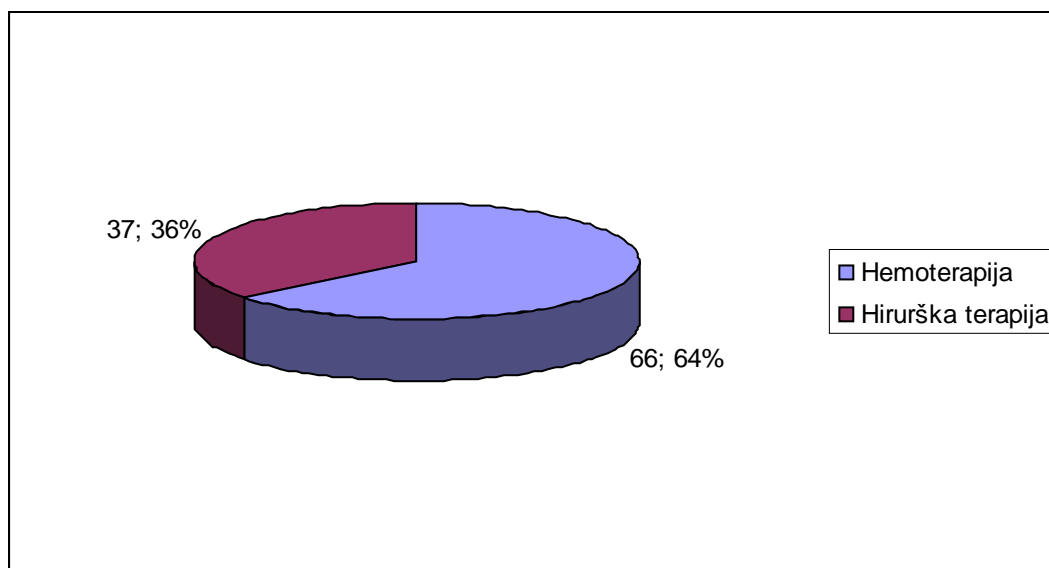
Antimikrobna terapija	Izlečenje (n=99)		Komplikacije (n=61)		
	Bez komplikacija n (%)	Sa komplikacijama n (%)	Apscedirajući limfadenitis n (%)	Recidiv n (%)	Perzistentna limfadenopatija n (%)
Gentamicin (n=18)	15 (83,3)	3 (16,7)	3 (16,7)	0	0
Streptomycin (n=2)	2 (100,0)	0	0	0	0
Amikacin (n=6)	0	6 (100,0)	6 (100,0)	0	0
Ciprofloksacin (n=8)	6 (75,0)	2 (25,0)	1 (12,5)	1 (12,5)	0
Doksicilin (n=3)	2 (66,7)	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0
Gentamicin i doksicilin (n=20)	14 (70,0)	6 (30,0)	6 (30,0)	2 (10,0)	1 (5,0)
Gentamicin i ciprofloksacin (n=32)	12 (37,5)	20 (62,5)	17 (53,1)	12(37,5)	2 (6,25)
Ciprofloksacin i doksicilin (n=2)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0	0
Gentamicin, ciprofloksacin i doksicilin (n=8)	4 (50,0)	4 (50,0)	4 (50,0)	3 (37,5)	1 (12,5)
Ukupno (n=99)	56 (56,6)	43 (43,4)	39 (39,4)	18(18,2)	4 (4,0)

Najveći procenat izlečenja bez komplikacija imala je primena streptomicina (100%) ali je ovu terapiju imalo samo dva pacijenta. Slede monoterapije gentamicinom (83,3%) i ciprofloksacinom (75%), potom kombinovana terapija gentamicinom i doksicilinom (70,0%).

Najveći procenat komplikacija imala je primena amikacina kod dece (100%) najčešće u kombinaciji sa longacefom. Apscedirajući limfadenitis se javio kod svih 6 lečenih amikacinom i longacefom (100%). Najveći procenat recidiva dala je primena gentamicina i ciprofloksacina (37,5%) (Tabela 50).

U odnosu na broj lečenih bolesnika i ishod terapije najveći procenat izlečenja, imala je primena gentamicina kod pacijenata koji nisu imali komplikacije a kod pacijenata sa komplikacijama, primena gentamicina i ciprofloksacina. Najveći broj komplikacija tokom lečenja gentamicinom i ciprofloksacinom činili su apscedirajući limfadeniti (17) i recidivi (12).

Kortikosteroidna terapija je primenjena kao dopunska terapija kod pojave komplikacija. Na terapiji kortikosteroidima je bilo 53 pacijenta (46,9%), 45 pacijenata nije primalo kortikosteroide (39,8%) i za 15 pacijenata (13,3%) nema podataka. Kortikosteroidnu terapiju je primalo 24 pacijenta (45,3%) koji su imali komplikacije i 29 pacijenata (54,7%) koji nisu imali komplikacije. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti kortikosteroidne terapije u odnosu na prisustvo komplikacija ($p=0,577$). Prosečno trajanje kortikosteroidne terapije je bilo $6,71 \pm 3,23$, medijana 5,5 (4-8,25) dana.



Grafikon 11. Odnos konzervativne i radikalne terapije u grupi obolelih

Kod obolelih od tularemije 76 (67,3%) pacijenata je imao konzervativnu antibiotsku terapiju, a 37 (32,7%) hirušku intervenciju. U kontrolnoj grupi 17 (54,8%) bolesnika je imao konzervativni a 14 (45,2%) hirurški tretman. Konzervativna terapija je bila zastupljenija u odnosu na hiruršku pri lečenju, ali ne statistički značajno ($p=0,285$)(Grafikon 11).

Tabela 51. Vrsta hirurških intervencija u tretmanu komplikacija limfadenopatije

Hirurške intervencije	Oboleli n=113 n (%)	Kontrolna grupa n=31 n (%)	p
Incizija	7 (6,2)	1 (3,2)	0,286
Punkcija	4 (3,5)	0	0,119
Biopsija	13 (11,5)	8 (25,8)	0,268
Ekstirpacija	6 (5,3)	5 (16,1)	0,148
Kombinacija	7 (6,2)	0	0,168
Ukupno intervencija	37 (32,7)	14 (45,2)	0,285
Bez intervencije	76 (67,3)	17 (54,8)	

Kod obolelih od tularemije, hirurški tretman je sproveden kod 37 od 113 ispitivanih bolesnika (32,7%). Po jedna hirurška metoda je primenjena kod 30 bolesnika a više od jedne (kombinacija hirurških metoda) kod 7 bolesnika (kod 3 bolesnika incizija i punkcija, kod 3 incizija i biopsija i kod jednog incizija i ekstirpacija). U najvećem broju slučajeva je urađena biopsija (11,5%), zatim incizija (6,2%), ekstirpacija (5,3%) i punkcija kod 3,5% pacijenata. U kontrolnoj grupi kod 25,8% pacijenata je urađena biopsija i kod 16,1% ekstirpacija. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u primenjivanim hirurškim intervencijama u između grupa: incizija ($p=0,286$), punkcija ($p=0,119$), biopsija ($p=0,268$), ekstirpacija (0,148) i kombinacija ($p=168$) (Tabela 51).

Tabela 52. Prikaz svih urađenih hirurških intervencija

Hirurške intervencije	Oboleli n (%)	Kontrolna grupa n (%)
Incizija	13 (29,5)	1 (7,1)
Punkcija	8 (18,2)	0
Biopsija	14 (31,8)	8 (57,1)
Ekstirpacija	9 (20,4)	5 (35,7)
Ukupno	44 (100,0)	14 (100,0)

U tabeli je dat prikaz ukupnog broja urađenih hirurških intervencija, uključujući više od 1 intervencije po jednom bolesniku. Tako je kod 37 bolesnika urađeno 44 hirurških intervencija. Među hirurškim intervencijama najzastupljenija je bila biopsija (31,8%), potom incizija (29,5%) i ekstirpacija 20,4% (Tabela 52).

Tabela 53. Prehospitalni, hospitalni period i ukupno trajanje bolesti

Trajanje bolesti (dani)	Tularemija n=113	Kontrolna grupa n=31	p
Prehospitalni period	36,4±36,2	24,2±34,0	0,015
Hospitalni period	18,6±11,8	11,3±5,9	0,001
Ukupno	54,8±37,9	35,8±33,3	0,002

Prehospitalni period trajanja bolesti je bio statistički značajno duži kod obolelih od tularemije u odnosu na kontrolnu grupu ($z=-2,423$, $p=0,015$). Hospitalni period trajanja bolesti je bio statistički značajno duži kod obolelih od tularemije u odnosu na kontrolnu grupu ($z=-3,292$, $p=0,001$). Ukupno trajanje bolesti je bio statistički značajno duži kod obolelih od tularemije u odnosu na kontrolnu grupu ($z=-3,126$, $p=0,002$) (Tabela 53).

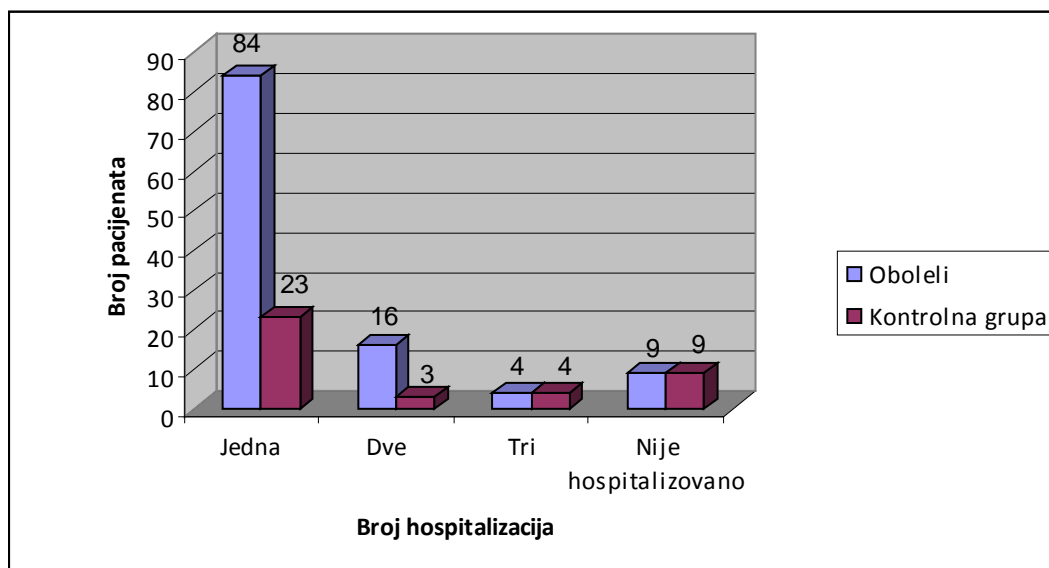
Tabela 54. Trajanje bolesti u odnosu na prisustvo komplikacija kod obolelih od tularemije

Trajanje bolesti (dani)	Sa komplikacijama n=47	Bez komplikacija n=66	p
Prehospitalni period	48,02±43,15	25,40±27,26	0,001
Hospitalni period	23,16±14,89	13,44±5,57	<0,001
Ukupno	67,65±38,99	38,33±27,83	<0,001

Prehospitalni period kod obolelih koji su imali komplikacije iznosio je 48 dana naspram 25 dana kod obolelih bez komplikacija. Dužina hospitalizacije kod obolelih sa prisustvom komplikacija iznosila je 23 dana nasuprot 13 dana kod obolelih bez komplikacija. Ukupno trajanje bolesti kod obolelih sa prisustvom komplikacija iznosilo je 68 dana u odnosu na 38 dana kod obolelih bez komplikacija. Utvrđeno je da je trajanje prehospitalnog i hospitalnog perioda kao i ukupno trajanje bolesti statistički značajno duže kod obolelih koji su imali komplikacije u odnosu na one koji nisu imali komplikacije: prehospitalni period ($z=-3,472$, $p=0,001$), hospitalni period ($z=-3,599$, $p<0,001$) i ukupno trajanje bolesti ($z=-4,890$, $p<0,001$) (Tabela 54).

Na grafikonu 12 je prikazan broj hospitalizacija u grupi obolelih i u kontrolnoj grupi. Kod obolelih od tularemije najveći broj pacijenata 84(74,3%) je imao jednu hospitalizaciju. Po dve hospitalizacije je imalo 16 pacijenata (14,2%), tri hospitalizacije 4 pacijenta (3,5%) a 9 pacijenata (8,0%) nije hospitalizovano na Klinici za zarazne bolesti. Utvrđeno je da postoji

statistički značajna razlika u distribuciji različitog broja hospitalizacija između grupa ($\chi^2=10,02$, $p=0,018$) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Odnos broja hospitalizacija i ukupnog broja bolnički lečenih pacijenata

Tabela 55. Broj hospitalizacija kod obolelih od tularemije u odnosu na prisustvo komplikacija

Broj hospitalizacija	Sa	Bez	Ukupno	p
	komplikacijama	komplikacija		
	n (%)	n (%)	n (%)	
Jedna	25 (53,2)	59 (89,4)	84 (74,3)	<0,001
Dve	15 (31,9)	1 (1,5)	16 (14,2)	<0,001
Tri	4 (8,5)	0	4 (3,5)	0,027
Nije hospitalizovano	3 (6,4)	6 (9,1)	9 (8,0)	0,863
Ukupno	47 (100,0)	66 (100,0)	113 (100,0)	

Najveći broj pacijenata bez komplikacija 59 (89,4%) je imao jednu hospitalizaciju. Dve hospitalizacije je imalo 31,9% a tri hospitalizacije 8,5% pacijenata sa komplikacijama u odnosu na 1,5% i 0 kod pacijenata bez komplikacija. Pacijenti sa komplikacijama su hospitalizovani više puta u odnosu na pacijente bez komplikacija (jedna hospitalizacija: $p<0,001$, dve hospitalizacije $p<0,001$, $p=0,027$) (Tabela 55).

Tabela 56. Ukupna dužina hospitalizacije i lečenja u odnosu na broj hospitalizacija kod obolelih

	Prosečno trajanje (dani)	Broj hospitalizacija			p
		Jedna	Dve	Tri	
Dužina hospitalizacije	18,6±11,8* 15,0(2,0-60,0)‡	14,6 ±7,1 13,5(2,0-45,0)	32,4±12,0 32,5(17,0-55,0)	45,2±14,4 47,5(26,0-60,0)	<0,001
Dužina hospitalnog lečenja	19,0±10,5 17,0(5,0-61)	15,7±5,4 15,0(5,0-36,0)	30,8±12,1 30,0(10,0-58,0)	42,0±21,5 43,0(21,0-61,0)	<0,001
Ukupna dužina lečenja	32,8±19,8 29,0(8,0-150)	28,4±13,6 26,0(8,0-73,0)	51,0±32,2 43,0(10,0-150,0)	52,2±22,6 52,5(29,0-75,0)	<0,001

*aritmetička sredina ±standardna devijacija,

‡ medijana(Min-Max)

Prosečna dužina hospitalizacije kod obolelih od tularemije iznosila je 18,6 dana, kolika je bila i dužina hospitalnog lečenja (19 dana). Ukupna dužina lečenja bila je duža pošto je obuhvatala i prehospitalno lečenje i iznosila je 32,8 dana. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između prosečne dužine hospitalizacije, dužine hospitalnog lečenja i ukupne dužine lečenja ($\chi^2=60,9$, $p<0,001$). Dužina hospitalizacije statistički značajno raste sa brojem hospitalizacija ($\chi^2=36,509$, $p<0,001$), kao i dužina hospitalnog lečenja ($\chi^2=32,611$, $p<0,001$) i ukupna dužina lečenja ($\chi^2=16,849$, $p<0,001$). Pacijente obolele od tularemije karakteriše velika varijabilnost u vrednostima ukupne dužine lečenja i dužine hospitalizacije po ispitivanim grupama.

5. DISKUSIJA

5. 1. Epidemiološke karakteristike tularemije

Prva epidemija tularemije na području jugoistočne Srbije registrovana je krajem 1998. godine u sokobanjskom regionu. Trajala je i tokom 1999. godine (142, 143, 233), kada je zvanično registrovano 35 obolelih. Pretpostavlja se je ovaj broj daleko veći zbog brojnih subkliničkih i abortivnih formi bolesti, naročito u tonzilofaringealnom obliku. Iz uginulih miševa roda *Apodemus* sa područja planine Rtanj, početkom 1999. godine izolovana je *F. tularensis*, pa je to je prvi izolat *F. tularensis* na našem prostoru (234, 235). Godine 2000. javilo se novo žarište u regionu oko Pirota i Aleksinca, kada je prijavljeno 45 novih slučajeva. Naredne godine došlo je do smirivanja epidemije i sporadičnog javljanja kod 6 osoba. Isti trend sporadičnog javljanja se nastavlja i 2002 godine kada je registrovano ukupno 13 obolelih. Krajem 2002. ponovo je buknuła epidemija te je 2003. godine registrovan najveći broj obolelih (58) na istim lokalitetima: Sokobanja, Pirot i Aleksinac (236). Kako je najveći broj obolelih poticao iz opštine Sokobanja (66), dobijena kumulativna stopa na 100 000 stanovnika za period 1999-2003. iznosila je 358,56 što je ukazalo na endemski karakter bolesti u sokobanjskoj opštini (236). Razlika između kumulativnih stopa po opštinama je bila visoko statistički značajna (236).

Narednih godina beleži se pad u obolevanju. Tularemija se javlja sporadično u različitim regionima. Ukupan broj hospitalizovanih obolelih 2004. je 11, 2005 je 9, 2006. tri obolela, a 2007 nije zabeležen nijedan slučaj obolevanja od tularemije. Od 2008. do 2011. održava se isti trend obolevanja, maksimalan broj hospitalizovanih obolelih bio je 8 (2008.) a minimalan 2, (2011.) godine.

U odnosu na naše podatke, u epidemijama tularemije u drugim zemljama je registrovan različit broj obolelih: u Bosni 141 (1995), na Kosovu 327 (1999), u Bugarskoj 285 (1997-2004), Turskoj 205 (1988-1998), Španiji 585 (1996), Švedskoj 270 (2000) (38, 46, 47, 49, 52, 59, 236). Ipak, ubedljivo je najveći broj prijavljenih u SAD-u: 1353, u periodu od 1990 do 2000. godine (64).

U Bugarskoj, žarište epidemije je zahvatilo područje veličine približno oko 4000 km², na lokalitetu zapadnog dela granice sa Srbijom. Prvi slučaj tularemije je objavljen u novembru 1997. godine. Od 1998. do 2000. godine, otkriven je 171 slučaj. Nakon toga epidemija je jenjavala s obzirom da je, tokom 2001-2002. godine dokumentovano svega 16 slučajeva. Incidencija obolevanja je ponovo porasla u 2003. godini, kada je prijavljeno novih 76 slučajeva tularemije. Izveštaji iz 2004. i 2005. godine ukazuju da postoji i dalje postoji progresija oboljevanja u Bugarskoj (49). Ovi podaci su značajni sa aspekta upoređivanja i epidemiološkog praćenja tularemije u Bugarskoj sa tularemijom u našoj zemlji zbog istog vremenskog perioda u kome se javlja, kao i sličnih geografskih karakteristika obe zemlje.

U periodu od početka 1999. do kraja 2011. godine ukupno je praćeno 113 bolesnika obolelih od tularemije među kojima je bilo 54 muškaraca (47,8%) i 59 žena (52,2%). Prosečna starost obolelih je bila 42,0 ±18,9 godina što se poklapa sa prosečnom starošću obolelih od 1999. do 2003.(236). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji bolesnika prema polu, a postoji statistički značajna razlika u starosti pacijenata između obolelih i kontrolne grupe. U tularemiji obolevanje je statistički značajno češće kod

pacijenata starijih od 20 godina (82,3%), predominantno od 20 do 59 godine (63,7%) što je u skladu sa prethodnim rezultatima (236). Iako je broj obolelih bio najveći u starosnoj grupi od 20 do 59 godina, stopa morbiditeta je u odnosu na broj stanovnika u toj uzrasnoj grupi, bila najveća za starosnu grupu preko 60 godina i iznosila 5,52 (236). U ostalim epidemijama tularemije u svetu podjednaka je distribucija obolevanja po polu, osim u skandinavskim zemljama, Japanu i SAD-u, gde više obolevaju muškarci (lovci, farmeri) zbog profesionalnog karaktera oboljenja (35, 48). Takođe, srednje uzrasno doba je najčešće pogođeno tularemijom i u drugim zemljama.

U odnosu na geografsku distribuciju obolevanja u periodu od 1999. do 2011, najveći broj hospitalizovanih obolelih je bio 2003. godine-(35), potom 2000. -(14), 2003.-(13), 1999. i 2004. po 11 bolesnika. U odnosu na ukupan broj obolelih po opštinama, najveći broj obolelih poticao je iz opštine Sokobanja (30), Aleksinac (17), slede opštine Merošina (9), Pirot (7), Niš (7), Ražanj (6), Žitorađa (6) i ostale. U odnosu na broj obolelih po godinama i opštinama, najveći broj hospitalizovanih obolelih je imala opština Sokobanja: 1999. -(10) i 2003.-(10) bolesnika. Slede opština Aleksinac: 2000.- (5) i opština Pirot: 2003.- (5) bolesnika).

Među obolelima od tularemije je bilo 93,8% pacijenata sa sela i 6,2% pacijenata iz grada. Statistički je utvrđeno da oboleli od tularemije značajno više potiču sa sela u odnosu na grad od kontrolne grupe što je u skladu sa prethodnim istraživanjem (236). Učestalu pojavu tularemije u ruralnoj sredini prikazuju i drugi autori u Bugarskoj, Turskoj i Skandinaviji (27,49,51). Seoska populacija, naročito pojedinci koji provode vreme u endemskim područjima kao što su farmeri, lovci, ljubitelji prirode i šumarski radnici su u najvećem riziku od dobijanja tularemije (22, 71, 172, 238).

U odnosu na distribuciju obolelih prema zanimanju, obolevanje od tularemije je češće kod domaćica i poljoprivrednika (39,8%) što se poklapa sa prethodnim istraživanjem (236) ali nije statistički značajno češće u odnosu na kontrolnu grupu. Učenici i studenti statistički značajno ređe oboljevaju od tularemije u odnosu na kontrolnu grupu.

Sezonska distribucija obolevanja nam otkriva da je obolevanje od tularemije bilo najčešće u januaru (30,1%), februaru (22,1%), decembru (13,3%) i martu mesecu (10,6%). Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji obolevanja u zimskim mesecima kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu. Sezonski karakter obolevanja od tularemije je potvrđen u prethodnom istraživanju i vezuje se za sezonsku aktivnost glodara i artropoda, određene sezonske radove i zanimanja (236).

Naši rezultati su u skladu sa rezultatima onih autora koji opisuju epidemije tularemije u zimskim mesecima, nastale u kontaktu sa glodarima (51, 52, 72), za razliku od rezultata drugih autora koji opisuju tularemiju kao vektorsku bolest sa pikom javljanja u letnjim mesecima (37, 57).

Kod nas nije registrovana bimodalna distribucija bolesti koja se javlja u pojedinim zemljama. Tako se npr. u SAD-u jedan pik obolevanja javlja od novembra do februara i povezan je sa lovom, a drugi pik se javlja od maja do septembra i u vezi je sa izlaganjem ubodima krpelja (4).

S obzirom na endemsku karakteristiku, sporadično ali povremeno epidemijsko javljanje tularemije u našoj zemlji, od izuzetnog je bilo značaja ustanoviti puteve transmisije i preduzeti adekvatne mere prevencije u cilju sprečavanja širenja bolesti. U tome nam je

pomogla detaljno uzeta epidemiološka anketa svakog pojedinačnog slučaja tularemije kao i klinički oblik bolesti (236).

Iako su glavni putevi transmisije tularemije u endemskim područjima sveta ubod krpelja, direktni kontakt sa zaraženim životinjama (dranje kože i manipulacija sa mesom zaraženih životinja), inhalacija i ingestija kontaminirane hrane ili vode (32, 35, 37, 41, 44, 45), naša iskustva su nešto drugačija. Kod većine obolelih od tularemije (80,5%) pretpostavljeni put transmisije je bio nepoznat što se poklapa sa prethodnim istraživanjem (236). Alimentarni put je bio zastupljen sa 9,7% kao i kontaktni put, koji je podrazumevao kontakt sa zečevima i pacovima. Razlike u odnosu na puteve prenošenja između grupa nisu značajne. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji navode da čak u 68,5% slučajeva rizičan faktor u epidemiji orofaringealne tularemije nije prisutan (58, 137, 141).

Pošto se kao najčešći oblik javljao orofaringealni, put transmisije je morao biti alimentarni, tj. aerogeni. To je u skladu sa rezultatima istraživanja na Kosovu i Metohiji, Bugarskoj i Turskoj (50, 52, 72).

Kako je seosko stanovništvo najčešće bilo zahvaćeno i način snabdevanja vodom za piće ukazao je da su oboleli najčešće konzumirali izvorsku vodu (70,5%), zatim vodu iz bunara (24,2%), a samo 5,3% iz vodovodne mreže (236). Hidrične epidemije pijaćom vodom nastaju obično preko zime, dok se epidemije nastale kao posledica kupanja u rekama i potocima javljaju tokom leta. Pretpostavlja se da su obe epidemije 2004. i 2005. u Turskoj hidričnog porekla i da su posledica konzumiranja kontaminirane izvorske vode za piće ekskretima glodara (239). Epidemija hidričnog porekla dokazana je na Kosovu, u Bugarskoj i Švedskoj direktnom izolacijom *F. tularensis* iz vode (38, 46, 72). U Bugarskoj, glodari ili njihove izlučevine su mogli biti izvor kontaminacije vode, ali ova pretpostavka nije mogla biti dokazana, budući da nije bilo izolata poreklom iz glodara koji bi služili za komparaciju. Prema Kantardijevu, bakterijski uzročnici su mogli biti uneseni preko glodara koji su prešli na teritoriju Bugarske iz Srbije. Pošto su poljoprivredni uslovi i postupci slični u obe susedne zemlje, porast populacije glodara u jednoj zemlji doveo bi do istog takvog porasta u drugoj zemlji, u istom periodu, pošto se takve migracije glodara obično odvijaju u dva pravca. Izbijanje epidemija u periodu 1998-2005, može biti posledica reorganizacije poljoprivrede u Bugarskoj tokom 90-tih godina prošlog veka, pri čemu se zemlja obrađivala plugovima, tako da su jazbine glodara ostale netaknute, a kao posledica toga došlo je do postepenog uvećavanja njihove populacije (49).

S obzirom da kod nas nije bilo direktnih metoda za izolaciju *F. tularensis* iz vode, nismo sa sigurnošću mogli utvrditi hidrični put transmisije tularemije. Bilo je slučajeva sa pretpostavljenim hidričnim putem transmisije kod dece iz jednog kosovskog sela, koja su konzumirala vodu sa bunara u kome je nađena crknuta mačka. Svi su imali tonziloglandularni formu bolesti i serološku potvrdu MAT-om. Izolacijom bakterije iz uginulih miševa roda *Apodemus*, sa područja planine Rtanj, već opisanog endemskog područja, dokazan je izvor infekcije (234).

Dok u drugim zemljama ulceroglandularni oblik tularemije najčešće nastaje transmisijom putem vektora i to: u SAD-u i zemljama centralne Evrope preko krpelja (32), a u severnoj Evropi preko komaraca (38), kod nas nije bilo vektorskog puta, već direktnog kontakta sa zečevima (dranje zeca). Kontaktni i vektorski put transmisije se osim u SAD-u,

Švedskoj i Norveškoj, opisuje u Japanu, Rusiji i Španiji (35, 37, 38, 39, 40, 69) sa predominantnom ulceroglandularnom formom bolesti (do 97%) dok je kod nas ova forma zastupljena svega sa 6%,

Naša ispitivanja su pokazala da kod nas nije bilo slučajeva obolevanja nastalih nakon aerogene transmisije koja je opisana u SAD-u, kao i na farmama u skandinavskim zemljama (23, 44).

Saznanja o velikom prisustvu glodara (pacova i miševa) u seoskoj sredini, upotrebi uglavnom izvorske vode za piće i obavljanju poljoprivrednih radova, kao i najvećoj zastupljenosti tonziloglandularne i glandularne forme bolesti, upućuju nas na zaključak da je najverovatniji put transmisije bolesti u našoj sredini alimentarni i vazdušni. Alimentarni put je najčešće podrazumevao konzumiranje kontaminirane vode ili hrane, a vazdušni udisanje sitnih čestica prašine i sena prilikom obavljanja poljoprivrednih i stajskih radova. Kao ređi put opisuje se direktan kontakt sa zaraženom životinjom gde smo imali 6 slučajeva ulceroglandularne tularemije nakon dranja zeca. Tačan put transmisije i pored intenzivnog rada epidemiološke službe nije do kraja razjašnjen, pa ostaje pretpostavka o mogućim putevima prenošenja infekcije (236).

5. 2. Kliničke karakteristike

Ispitivani bolesnici imali su nagli početak bolesti sa uobičajenom groznicom, drhtavicom, glavoboljom, malaksalošću, slabošću, gušoboljom i otokom limfnih žlezdi, uglavnom na vratu. U prvi mah su shvaćeni kao akutni tonzilo-faringitisi ili mononukleozni sindrom koji je bio prihvatljiv za mlađe uzraste, ali se nije mogao objasniti kod starijih osoba koji su dijagnostikovani kao *Tu colli* ili *Lymphadenopathia colli*. Ova lutanja pre postavljanja definitivne dijagnoze tularemije sreću se i kod drugih autora (4, 138, 221, 239, 241, 242).

Nereagovanje na do tada primenjenu antibiotsku terapiju koju su činili uglavnom B-laktamski antibiotici, pobudilo je sumnju da se ipak radi o nekom drugom oboljenju što je je bilo u skladu sa iskustvima drugih autora (142, 143, 239).

Najčešće kliničke manifestacije kod obolelih od tularemije bile su: limfadenopatija, tonzilofaringitis, febrilnost i promene po koži.

Limfadenopatija je bila dominantna u čak 95,6% slučajeva što se poklapa sa rezultatima drugih autora (62, 237, 239). U epidemiji tularemije u Bosni i Turskoj, svi pacijenti oboleli od tularemije (100%) su imali uvećanje limfnih čvorova (237, 239). Najčešće su uvećani limfni čvorovi bili inicijalni ili jedini znak infekcije, što je takođe u skladu sa iskustvima drugih autora (62). Dominira jednostrana nad obostranom limfadenopatijom, kod 89,3 % obolelih što potvrđuje rezultate prethodnog istraživanja (236). Statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu je granična obzirom na oštrije kriterijume u odabiru kontrolnih bolesnika.

Najzastupljenija je bila cervikalna limfadenopatija (88,5%) i to jednostrana (82,3% svih obolelih), što je bilo statistički značajno više u odnosu na kontrolnu grupu. Slede aksilarna (9,7%), ingvinalna (3,5%) i epitrohlearna (3,5%) limfadenopatija. Ovi podaci se poklapaju sa rezultatima prethodnog istraživanja (236) kao i sa rezultatima onih autora koji opisuju orofaringealnu tularemiju kao najzastupljeniju (51), za razliku od dominantne zahvaćenosti drugih limfnih čvorova: epitrohlearnih i aksilarnih u ulceroglandularnoj tularemiji kod drugih autora (221). Nema značajne razlike u zastupljenosti jednostrane ili desnostrane

limfadenopatije za razliku od rezultata Ozdemira koji opisuje pretežno levostranu lokalizaciju limfadenopatije (63,6%) kod bolesnika sa orofaringealnom i okuloglandularnom tularemijom u Turskoj. Ohara objašnjava levostranu lokalizaciju ulceroglandularne tularemije u Japanu, činjenicom da su dešnjaci levom rukom držali zaklanu životinju, dok su desnom manipulirali i pri tom se verovatno ozledili (35, 57, 239).

Kao druga važna klinička manifestacija opisuje se tonzilofaringitis, prisutan kod skoro polovine bolesnika, kao eksudativan (79,7%) ili neeksudativan (20,3%), najčešće jednostran eksudativan (63%). Jednostrana lokalizacija je bila dominantna i opisuje se u 81,5% slučajeva, što je duplo više u odnosu na rezultate Golubovića (41,2%) (237). Pri tome, podjednaka je zastupljenost levostranog i desnostranog tonzilofaringitisa, što je takođe bilo praćeno istostranom limfadenopatijom. Bez vidljivog traga ozlede ne možemo objasniti jednostranu lokalizaciju tonzilofaringitisa (Prilog, slika 7).

Ovi podaci se podudaraju sa rezultatima onih autora koji opisuju orofaringealnu formu kao najzastupljeniju: po Goluboviću tonzilofaringitis je imalo 36,2% a po Ozdemiru 54,5% bolesnika (237, 239); nasuprot epidemija ulceroglandularne i respiratorne tularemije gde je tonzilofaringitis imao manji broj obolelih (20%) (62). Prikazuje se i nešto manja ukupna zastupljenost eksudativnog tonzilofaringitisa (53%), a približna zastupljenost neeksudativnog (kataralnog) tonzilofaringitisa (31,4%) (11). Kod naših bolesnika nije registrovan ulcerozni tonzilofaringitis koji se opisuje kod Golubovića u 15,7% i Celebija u 23% obolelih (51, 237).

Povišene vrednosti telesne temperature imala je većina obolelih (88,5%). Utvrđeno je da se febrilnost statistički značajno češće javlja kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu. Slične rezultate iznosi Golubović: u momentu prijema 79,4% bolesnika je bilo febrilno sa uglavnom razvijenom glandularnom fazom bolesti (237), kao i Evans (85%), Perez (90,8%) i Ozdemir (81,8%) (62, 221, 239). Preovladava febrilnost i visoka febrilnost nad subfebrilnošću kod obolelih. Hiperpireksija ($TT \geq 39,1^{\circ}\text{C}$) je statistički značajno zastupljenija u tularemiji u odnosu na kontrolnu grupu a prosečne vrednosti telesne temperature značajno više ($X_{sr} = 39,1^{\circ}\text{C}$ i $Me 39,0^{\circ}\text{C}$) u odnosu na kontrolnu grupu. Prosečno trajanje febrilnosti iznosilo je 7,5 dana, sa medijanom od 5 dana što se poklapa sa prethodnim (236), kao i sa rezultatima drugih autora (237), ali ne i sa rezultatima Pereza gde je prosečno trajanje febrilnosti iznosilo 13 dana i Ozdemira, 20 dana (221, 239).

Promene po koži imalo je 24 obolelih (21,2%). Najčešći tip kožnih manifestacija među njima bili su eksudativni multiformni eritem (25%), nodozni eritem (25%) i ulceracija kao primarni afekt (25%). Slede makulozna, urtikarijalna ospa, i fiksni eritem. Slične kožne promene: makulozan, papulozan, morbiliforman raš ili erythema nodosum opisane su i kod Golubovića (237). Samo 6 naših bolesnika od ukupnog broja obolelih (5,13%) je imalo kožnu lokalizaciju primarnog afekta u vidu ulceracije koju Evans opisuje kao najčešći znak tularemije, u 60% slučajeva (62), Golubović u 9,9% (237) a Celebi u 13% (51).

Kod prvih slučajeva tularemije, u kliničkoj slici je dominirala ospa pre svega na šakama, što je stvaralo dijagnostičku dilemu (142) (prilog, Slike 9 i 10). Šake su bile najčešća lokalizacija promena po koži kod naših bolesnika (44,4%), potom potkolenice (37,0%). Po Christenson i sar, *erythema multiforme*-nalik kožne lezije na gornjim i donjim ekstremitetima bile su zastupljene kod 14% obolelih od tularemije (4). Po Akdisu, 14,1% bolesnika je razvilo *erythema nodosum*. Ovi bolesnici su imali visok nivo poliklonalnih cirkulišućih imunih

kompleksa u poređenju sa bolesnicima bez promena po koži (243). Kožne promene po licu su se javile kod jednog bolesnika sa okuloglandularnim oblikom tularemije.

Inkubacija uglavnom nije mogla biti određena, ali na osnovu anamnestičkih podataka procenjena je dužina prehospitalnog trajanja bolesti. Period bolesti pre hospitalizacije iznosio je 36,4 dana uz veoma veliku individualnu varijabilnost, zbog prethodnog lutanja u postavljanju dijagnoze, te je uzeta medijana od 28 dana kao adekvatna mera što je u skladu sa prethodnim rezultatima (236). Prema Goluboviću, prosečna inkubacija, se takođe sa sigurnošću nije mogla odrediti i verovatno je period od 7 do 28 dana, u proseku 15 dana, pre svega prodromalni period bolesti, a manje period inkubacije. Takođe duži prehospitalni period (20 dana) opisuje se i u epidemiji orofaringealne tularemije u Turskoj (239). Kod nas, ovako dug prehospitalni period bolesti objašnjava se prethodnim neprepoznavanjem oboljenja i lutanjem u postavljanju dijagnoze što je naročito bilo izraženo tokom prve epidemije 1999. kada se na tularemiju nije ni mislilo, jer do tada na našim prostorima ona nije bila prepoznata. Isti razlozi navode se i u prethodno opisanim epidemijama u Bosni i Turskoj (52, 138, 237).

Najčešći klinički oblici kod obolelih od tularemije bili su: tonziloglandularni (47,8%), i glandularni (46,0%). Ređe su se javljale ulceroglandularna i okuloglandularna forma. (Prilog, slika 8). Lokalizacija promena kod svih je bila dominantno jednostrana, u čak 92,0%. Mnogi naši bolesnici nisu uočili period kada su imali primarni afekt što se poklapa sa iskustvima drugih autora (58, 137, 141). Kako klinički oblik zavisi od puta transmisije smatramo da glandularne i tonziloglandularne forme pripadaju istoj, orofaringealnoj formi tularemije, s tom razlikom što kod glandularne forme nije nađen primarni afekt u momentu hospitalizacije, sa pretpostavkom da se desio i prošao u prehospitalnom periodu. Najverovatnije je da su svi oblici eksudativne ili neeksudativne angine u stvari primarni afekti na tonzilama (237).

Iako dominantan, zastupljen čak kod 93,8% obolelih, orofaringealni oblik tularemije je u početku kada se na tularemiju nije mislilo bio nedijagnostikovano, što se poklapa sa iskustvima drugih autora (236). Često se mogao zameniti sa ostalim infektivnim i neinfektivnim bolestima koji zahvataju cervikalne limfne noduse kao što su streptokokna angina, infektivna mononukleoza, tuberkuloza i limfomi (137, 141, 163, 236). Naši rezultati se poklapaju sa rezultatima Golubovića iz epidemije u BIH-a 1995, gde se najčešće radilo o glandularnom (48,9%) i anginoznom (oralno-glandularnom) obliku (36,2%), koji su verovatno preneti putem kontaminirane vode, hrane ili prstima. Tonziloglandularna forma bolesti se osim kod nas opisivala na Kosovu, Bugarskoj (96,5%) i Turskoj (46, 49).

Za razliku dominacije ulceroglandularnog oblika u SAD-u, Japanu, Skandinaviji, Španiji, Rusiji (75-96%) (4, 35-40, 64), kod nas je ovaj oblik bio prisutan u 5,3%, kao i u Bugarskoj (2,1%) (49).

Okuloglandularnu tularemiju je imao samo jedan pacijent (0,9%) kao i u Bugarskoj (1,4%) (199). Nije bilo nijednog slučaja respiratorne tularemije koja se javljala u Americi (63) i Skandinaviji (44). Interesantno je da je u Skandinavskim zemljama čak u do 50 % slučajeva registrovana respiratorna pneumonija izazvana *F. tularensis* tip B. Kod nas nije bilo smrtnih slučajeva, kao ni u epidemijama u Bugarskoj, Španiji i Turskoj (49, 221, 239) za razliku od epidemije respiratorne tularemije u SAD-u 2000. godine koja je odnela jednu žrtvu (45)

Naši bolesnici nisu imali dugotrajnu temperaturu niti opštu slabost i malaksalost, ali se zato održavala dugotrajna limfadenopatija koja je dovodila do komplikacija. Kod obolelih od tularemije utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između veličine žlezde i

pojave komplikacija. Većina onih koji su imali komplikacije je imala žlezde veće od 3cm u dijametri (80,9%). Na drugoj strani većina onih koji nisu imali komplikacije je imala žlezde manje od 3 cm (58,3%). Sličnu veličinu žlezdi, dijametra 0,5-10 cm (srednja vrednost 2cm), opisuje Evans (62). Žlezde su uglavnom bile pokretne, čvrste i lako bolno osetljive. Kod pojave supurativnog limfadenitisa žlezde su postajale na dodir mekše i fluktuantne sa hiperemičnom kožom iznad njih a drenirale su se spontano ili hirurški. Ovo se podudara sa iskustvima drugih autora (62).

Komplikacije je imalo čak 41,6% bolesnika što je u skladu sa prethodnim rezultatima (236). Najzastupljeniji je apscedirajući limfadenitis (38%) koji je bio značajno češći u odnosu na kontrolnu grupu. Slede recidivi (16,8%) i perzistentna limfadenopatija (3,5%) čije zastupljenosti se statistički značajno ne razlikuju između grupa. Jedan pacijent je mogao imati više od jedne komplikacije, (npr. apsces i recidiv 12 pacijenata, apsces, recidiv i perzistentna limfadenopatija 3 pacijenta i recidiv i perzistentna limfadenopatija 1 pacijent) te je ukupan broj komplikacija 66 kod 47 pacijenata koji su imali komplikacije. U odnosu na prethodne rezultate (21,6%) (236), zastupljenost apscedirajućeg limfadenitisa je statistički značajno veća ($p=0,015$), što se objašnjava činjenicom da su u ovom istraživanju uzeti u obzir svi pacijenti koji su imali ovu komplikaciju čak i uz ostale komplikacije (recidiv i/ili perzistentna limfadenopatija) a u prethodnom istraživanju su računati samo oni kod kojih je ova komplikacija bila jedina. Veći procenat komplikacija u vidu pojave supurativnog limfadenitisa u oko 40% bolesnika, opisuje se u Turskoj, tokom epidemije orofaringealnog oblika tularemije tipa B, jer se kasnilo sa postavljanjem dijagnoze i započinjanjem terapije (52). Evolucija apscedirajućeg limfadenitisa kod obolelih je sledeća: 78,7% je podvrgnuto hirurškoj intervenciji, 12,8% je imalo spontanu fistulizaciju i 8,5% je imalo spontanu involuciju-na kraju terapije (Prilog, slike 1-6, 11,12,13,14)

I pored tako duge terapije, duže nego što standardna literatura preporučuje, registrovan je visok procenat recidiviranja. Relapsi bolesti u vidu ponovnog uvećanja limfnih nodusa ili zahvatanja više limfnih čvorova kod tularemije javili su se kod 16,8% bolesnika, najčešće po jedan recidiv (12,4%), dok je dva recidiva imalo 4,4% bolesnika. Ovi rezultati se poklapaju sa prethodnim rezultatima (236) kao i sa iskustvom Golubovića u Republici Srpskoj, 1995, po kome je od 141 bolesnika 17% imalo recidive, pri čemu se kod nekih recidiv ponavljao 2-3 puta (237). To nas asocira na razmišljanje da su sojevi *Francisella tularensis*, sa našeg terena morali biti značajno rezistentni. Različita iskustva su zabeležena u Turskoj; kod njih nisu zapaženi recidivi ni 6. ni 12. meseca nakon prve posete lekaru (51). Slično je bilo i u Bugarskoj gde se ne opisuju ni komplikacije ni recidivi bolesti (49, 50).

Prema vremenu javljanja, u odnosu na početak obolevanja komplikacije su bile rane i kasne. Rane komplikacije su se javile u prvih 3 do 6 meseci od početka oboljevanja a kasne posle više od 6 meseci od početka obolevanja. Rane komplikacije su činile 91,5% svih komplikacija kod obolelih. Kasne komplikacije je imalo četvoro obolelih i to kod jednog je bila prisutna perzistentna limfadenopatija a kod troje recidivantni limfadenitis. Perzistentna limfadenopatija se održavala 4 godine i više, kod jednog pacijenta. Recidivantni limfadenitis se javio posle 15 meseci, posle 9 godina i 11 godina.

Nekoliko je razloga za pojavu komplikacija tokom bolesti: neadekvatna inicijalna antibiotska terapija, kasni početak adekvatne antibiotske terapije, kao i moguća pojava rezistentnog soja *F. tularensis* na našem prostoru. To je u skladu sa zapažanjima Enderlina, po

kome, odlaganje započinjanja lečenja gentamicinom i neadekvatna dužina trajanja terapije, mogu nepovoljno uticati na ishod bolesti (212). Isti je stav Trnjaka, da pravovremena terapija sprečava kolikvaciju limfnih čvorova, rekurenciju bolesti i generalizaciju infekcije (244) kao i Helvacija, da su rana dijagnoza i terapija značajne za prevenciju formiranja apscesa (52). Po Helvaciju, odgovarajuća upotreba antibiotika označavala je njihovu primenu u ranom periodu bolesti (unutar 3 nedelje) a neodgovarajuća, u kasnom periodu bolesti (posle tri nedelje). Na taj način, 75% bolesnika tretiranih odgovarajućim antibioticima unutar 3 nedelje od početka bolesti se kompletno oporavilo, a samo 26,8% je izlečeno kod započinjanja tretmana u kasnijem periodu bolesti. Razlika je bila statistički značajna ($p < 0,016$) (52). Takođe, kasna supuracija može biti povezana sa uključivanjem inicijalne antibiotske terapije nespecifične za tularemiju.

5. 3. Dijagnostička ispitivanja

U našem prethodnom istraživanju, značaj laboratorijsko-biohemijskih ispitivanja bio je sekundaran u odnosu na serološka ispitivanja imunodijagnostičkim testovima. Dokazano je da u akutnim fazama, kao i u relapsima bolesti dolazi do naglih skokova reaktanata akutne faze zapaljenja, pre svega CRP-a i sedimentacije, koji po smirivanju procesa padaju. Visoka SE i CRP, umereno povišen fibrinogen, minimalne promene u leukocitarnoj formuli i lako povišene aminotransferaze (ALT i AST) u skladu su sa literaturnim podacima i rezultatima drugih autora (1, 2, 164, 236).

5.3.1. Mikrobiološka dijagnostika

Serologija je još uvek zlatni standard u dijagnostici tularemije zbog niske senzitivnosti bakterijske kulture i još uvek nepostojećih standardizovanih komercijalnih PCR testova za direktnu identifikaciju patogena.

Pošto se bazična dijagnostika tularemije zasniva na serologiji, razvijeni su različiti serološki testovi koji u odnosu na ostale dijagnostičke metode imaju prednost zbog lakog izvođenja, šire primene i niskog rizika za laboratorijske radnike (177, 182, 245). Međutim kako je tularemija još uvek retka bolest, od laboratorija se sporadično traži izvođenje specifičnih dijagnostičkih testova, što čini još manje atraktivnim uvođenje i standardizovanje ELISA i Western blot testova. Iz tog razloga, sve više postaju aktuelni komercijalni testovi koji su sertifikovani za dijagnostičku upotrebu.

Rezultate serološkog testiranja bi trebalo uvek interpretirati u kontekstu kliničke sumnje na tularemiju. Serološke analize bi trebalo izvoditi samo na pacijentima kod kojih postoji realna mogućnost da imaju tularemiju; ne treba ih koristiti kao skrining test febrilnih pacijenata.

U našem ispitivanju za dijagnostiku tularemije je korišćeno 8 imunodijagnostičkih testova; od imunoenzimskih testova: Serion ELISA IgG i IgM, Serazym ELISA i ELISA in-house; potom imunohromatografski test (VIRapid), Western-blot, imunohistohemijska metoda indirektno imunoperoksidaze (IIP) i PCR. Cilj je bio da se odredi najbolji test za dijagnozu tularemije kao i za kasnije praćenje bolesti. Na ovaj način je bilo moguće retrogradno postaviti dijagnozu tularemije kod bolesnika sa kliničkim manifestacijama ove bolesti, kod kojih serologija nije rađena. Po prvi put je postavljena definitivna dijagnoza

tularemije na histopatološkim preparatima granulomatoznog limfadenitisa, bez prethodne serološke potvrde.

Analizom rezultata dobijenih korišćenim testovima na ukupnom bolesničkom materijalu (serumima i bioplatima), utvrđeno je sledeće:

IgG Serion ELISA ima najbolje karakteristike u pogledu senzitivnosti (95,5%) i specifičnosti (92,2%), tj. ima najveću efikasnost od svih testova (94,8%), što je u skladu sa rezultatima drugih autora (246). Iz tog razloga je test izbora za potvrdnu dijagnozu tularemije i serološko praćenje nivoa antitela.

IgM Serion ELISA je pokazao nešto nižu senzitivnost (92,2%) kao i specifičnost (84,2%) od IgG Serion ELISA. Zapaženo je da IgG i IgM Serion ELISA imaju sličnu dijagnostičku efikasnost: 94,8% IgG Serion ELISA, 90% IgM Serion ELISA. Međutim odnos između IgG i IgM u jednom uzorku seruma ne dozvoljava diferencijaciju između skore i stare infekcije (247).

Serazym ELISA je pokazala visoku senzitivnost (97,4%) ali njena specifičnost (67,9%) je niska za potvrdne svrhe, a posebno je niska kada su u pitanju anti-*Yersinia* pozitivni serum.

In-house ELISA je veoma specifična (94,4%), ali posebno u ranoj fazi infekcije njena senzitivnost je niska (77,9%), tako da ima ograničenu vrednost u skriningu obolelih. Međutim, Schmitt (182) je dokazao da je kombinacija in-house ELISA i WB pogodna za skrining i nisu nađene ukrštene reakcije sa vrstama *Brucella spp*, *E.coli spp*, *Salmonella spp* ili *Y.enterocolitica*.

Western-blot je senzitivn (90,3%) ali nisko specifičan (63,3%). Analizom seruma obolelih od tularemije metodom WB dobili smo (63,3%) pozitivnih uzoraka što je u skladu sa rezultatima drugih autora. Ovako nisku specifičnost možemo objasniti različitim protokolima tokom bojenja za detekciju antigen-antitelo reakcije. U drugim studijama anti-humana anti IgG antitela su korišćena kao sekundarna antitela dok je kod nas korišćen protein A/G obeležen alkalnom fosfatazom za WB i protein G obeležen HPR (horsereidish) peroksidazom za in-house ELISA. Ovako dizajnirana WB može se koristiti za dijagnostiku tularemije kod različitih vrsta sisara, kao skrining u određivanju nozoareala tularemije kod sisara rezervoara ove infekcije (182, 197, 246).

VIRapid je imao visoku dijagnostičku senzitivnost (97,4%) ali je specifičnost bila niža (85,2%) zbog prisutnih lažno pozitivnih rezultata kod anti-*Brucella* pozitivnih seruma. Ovaj test zauzima drugo mesto po dijagnostičkoj efikasnosti (92,4%) odmah iza IgG Serion ELISA. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u Nemačkoj a nisu u skladu sa rezultatima studije u Turskoj u kojoj je analizirano 236 seruma od 109 slučajeva tularemije i dobijena senzitivnost VIRapid od 99,3% i specifičnost od 94,6% (248), kao i sa studijom u Španiji kod 321 pacijenta, sa senzitivnošću od 95,5% i specifičnošću od 100% (249).

U pogledu specifičnosti, metoda IIP ima najveću specifičnost (100,0%), uz napomenu da je rađena na malom broju uzoraka (n=26), te može poslužiti za potvrdnu dijagnozu tularemije. Njena senzitivnost je niska (65%), te nije pogodna za skrining obolelih a kao dijagnostička metoda se više radi u istraživačke svrhe.

Analizom rezultata dobijenih korišćenim testovima utvrđeno da većina testova pokazuje visoku senzitivnost i specifičnost i međusobno daju slične rezultate. Na osnovu procene stepena slaganja ispitivanih testova skoro potpunu saglasnost imali su testovi IgG Serion

ELISA i Serazym ELISA ($k=0,802$). Značajnu saglasnost međusobno su imali IgG i IgM Serion ELISA ($k=0,766$), IgM i VIRapid ($k=0,780$), IgG i VIRapid ($k=0,760$). Na osnovu vrednosti Kohenovog koeficijenta In-house ELISA i Western blot su se pokazali kao testovi sa najmanjom saglasnošću. a samim tim i kao manje pouzdani testovi. Primenom bilo kog od ostala četiri testa dobiće se približno isti rezultati.

Prema rezultatima Chaignat, najpouzdaniji test za brzu dijagnozu tularemije za mali broj uzoraka je VIRapid kao brzi ručni detekcioni kit. IgG Serion ELISA ostaje metoda izbora za testiranje velikog broja uzoraka u ranoj fazi infekcije. VIRapid ima praktičnu upotrebu kao brzi dijagnostički test za potvrdu kliničke dijagnoze ali nije dizajniran niti koristan za masovni skrining.(246).

Prema Spletstoesseru nekomercijalna in-house imunohromatografija (ICT) je dokazano da je pouzdani test za presumptivnu dijagnozu tularemije (185).

ICT je imao senzitivnost 98.3% (58 pozitivnih seruma testirano) i specifičnost 96.5% (58 negativnih seruma testirano). Na životinjskim serumima, ukupna senzitivnost je bila 100% (22 pozitivna seruma testirano) a specifičnost 100% (70 negativnih seruma je testirano). Ovaj brzi test pre svega detektuje IgG antitela koja se javljaju rano tokom humane tularemije, ali dalja evaluacija sa humanim serumom je važna za potvrdu da ICT može biti dragocen test za presumptivnu dijagnozu tularemije. ICT može biti koristan za praćenje uspešne vakcinacije sa subjunit vakcinama ili živim vakcinalnim sojevima koji sadrže lipopolisaharid (npr. LVS) kao i za detekciju seropozitivnih jedinki ili životinja u situacijama epidemije ili u kontekstu epidemiološkog programa praćenja u endemičnim područjima.

Poredeći sadašnje rezultate testiranja seruma sa prethodnim pokazano je da je od svih testova najmanju osetljivost imao MAT 62,4% zbog velikog broja lažno negativnih rezultata u grupi obolelih. Ovo je iz tog razloga što je bilo dosta graničnih seruma sa mikroaglutinacionim titrom od 1:40 koji se održavao i u ponovljenim testiranjima, a nije mogao biti shvaćen kao pozitivan jer je granični titar pozitivne reakcije u MAT testu 1:80. Specifičnost je bila 100%, jer su u kontrolnog grupi svi uzorci seruma bili negativni, nije bilo lažno pozitivnih rezultata. Ukupna efikasnost MAT metode u otkrivanju antitela bila je 74,5% (236). Osetljivost MAT-a po Ristanovićevoj je bila viša 84,1% a specifičnost nešto niža 93,1% (234). Da bi osetljivost i specifičnost imunodijagnostičkih testova bila veća, trebalo bi za pripremu antigena koristiti autohtone izolate, tj. izolate sa vlastitog geografskog područja (234).

Na rezultate testa utiču i antitela IgG i IgA klase, koja su slabo aglutinabilna, ali svojim prisustvom mogu da onemoguće delovanje IgM antitela koja se zapravo dokazuju ovim testom. U imunskom odgovoru na *F. tularensis* rano se sintetišu IgG antitela, upravo subklasa neaglutinabilnih IgG2 α antitela i to je jedan od glavnih razloga smanjene osetljivosti MA testa, naročito u ranim fazama bolesti. Takođe, u MA testu često se pojavljuje unakrsna reaktivnost sa predstavnicima *Brucella spp*, što može uticati na manju specifičnost testa. Do pojave lažno negativnih rezultata mogu dovesti IgG2 i IgG4 antitela koja su slabi aglutinini, te svojim prisustvom ometaju reakciju aglutinacije.

Iz iskustva drugih autora, ovim testom se mogu detektovati i rezidualna cirkulišuća antitela i 20 godina posle infekcije (11). Po Martin-Seradilli, 2004, analizom MAT-a tri godine nakon akutne faze 76.92% bolesnika je održavalo titar antitela $\geq 1/160$ (250).

Negativan nalaz MAT-a, kod kliničko-epidemiološki jasne slike tularemije, ne isključuje tularemiju, ali navodi na ispitivanja senzitivnijim testovima kao što su ELISA i imunoblot (251).

Rezultati prethodnog testiranja ELISA (VMA) testom pokazuju, u odnosu na najnovija testiranja ELISA testovima, nešto niže vrednosti senzitivnosti (93%) koja se poklapa sa rezultatima Ristanovićeve 92,9% po kojoj je specifičnost bila 94,4% (187, 236.).

ELISA je dokazano da je senzitivnija od aglutinacionih testova (Carlsson et al., 1979; Syrjala et al., 1986). Njena prednost je u tome što može odvojeno odrediti različite klase antitela IgM, IgG and IgA. Njena prednost je ograničena jer IgM, IgA i IgG antitela rastu i padaju paralelno i shodno tome ELISA ne diferencira akutnu infekciju od ranije epizode tularemije (197).

Prema rezultatima Koksele i sar, od sve tri korišćene metode: ELISA, aglutinacioni test i komplement fiksirajuća ELISA, najefikasnija je ELISA IgM, IgA i IgG za ranu serodijagnozu tularemije (120).

Po Carlssonu, prosečna ELISA je 10 puta osetljivija od tube-aglutinacije (aglutinacije u epruvetama) (174) Povišen titar antitela kraja prve nedelje može biti od dijagnostičkog značaja u ELISA testu. Značajno povećanje titra u parnom serumu potvrđuje dijagnozu tularemije. Praćenje nivoa titra IgG i IgM, može biti od značaja u određivanju vremena nastanka infekcije. U sprovedenom istraživanju Carlssona, značajan nivo i IgG i IgM antitela bio je prisutan 1-2 nedelje posle infekcije. Titar antitela se povećavao tokom prvog meseca, bez značajnijih izmena u odnosu između nivoa IgG i IgM antitela. Posle 2,5 godine IgG/IgM odnos se značajno povećao. U odnosu na infekciju divljim sojem *F. tularensis*, zapaženi su su značajno niži titrovi antitela posle vakcinacije, koji su značajno porasli 6 nedelja nakon vakcinacije (174).

Glavna prednost imunoenzimskog testa nad MAT-om je što u prvoj nedelji bolesti može da dokaže antitela u 43% slučajeva, dok aglutinacija može samo u 11% slučajeva, što je važno za brzo postavljanje dijagnoze i pravovremeni početak terapije. Takođe, za razliku od aglutinacije koja detektuje uglavnom antitela IgM klase i gde su za potvrdu bolesti uglavnom potrebna najmanje dva seruma, ELISA detektuje posebno svaku klasu antitela, a za dijagnostiku je dovoljan samo jedan serum (176) Na ovaj način, uvođenjem senzitivnijih testova skratili bi dijagnostičku proceduru i racionalizovali troškove hospitalizacije i lečenja ovih pacijenata.

Naši rezultati se razlikuju od ispitivanja Ristanovićeve kada su ELISA testom analizirani serumi pacijenata lečenih od tularemije godinu dana posle antibiotskog tretmana pri čemu je u 71,43% uzoraka detektovano je prisustvo IgM i IgG antitela, u 9,52% uzoraka detektovano je prisustvo samo antitela IgG klase, dok je prisustvo samo IgM antitela detektovano samo u jednom uzorku (4,76%) (187).

Prema rezultatima Bevanjera, mikroaglutinacioni test je bio pozitivan kod 63,6% testiranih osoba, 8 godina nakon terapije. ELISA na antitela spoljašnje membrane *Francisella tularensis* bila su pozitivna u 55 % (IgA), 95% (IgG) i 27% (IgM) u kasnoj fazi ispitivanja seruma, ali sa nivoima antitela značajno nižim od onih u akutnim fazama (252).

Prema Porsch-Ozcürümez-u poređenjem ELISA, western blota (WB), mikroaglutinacionog (MAT), indirektnog imunofluorescentnog testa (IIFT) i flow citometrije za serološku dijagnozu tularemije dijagnostička senzitivnost i specifičnost bila je 100% za WB, MAT i FC, 98% za ELISA i 93% za IIFT (177). Među ispitivanim testovima

kombinovana upotreba skrining ELISA testa i potvrdnog Western blot-a je najpogodnija za serodijagnozu tularemije (182, 177). Mikroaglutinacija (MAT) ima prednosti u pogledu cene i potrebne opreme te je dijagnostika izbora u manje sofisticiranim laboratorijama ili tokom istraživanja. Međutim treba uzeti u obzir ukrštene reakcije sa vrstama *Brucella spp*, *Y. enterocolitica* i *Proteus*. Flow citometrija je obećavajuća metoda koja se može dalje usavršavati. U pogledu njene efikasnosti ima prednost u odnosu na ELISA i uporediva sa Western blot-om i mikroaglutinacijom. Ograničavajući faktori za primenu ove metode u rutinsku dijagnostiku tularemije su: komercijalna nedostupnost, visoka cena i neophodnost visoko sofisticirane tehničke opreme (177).

Nedostatak IIFT-a uprkos njegovom lakom izvođenju je subjektivna interpretacija rezultata i potrebna oprema. IIF je metoda izbora u dokazivanju antigena *F.tularensis*. u tkivima, punktatima i brisevima obolelih od tularemije što potvrđuju i rezultati našeg prethodnog istraživanja (senzitivnost IIFT-a 100%) (236). Prema rezultatima Ristanović E. i sar. IIFT je korišćen za dokazivanje antitela *F. tularensis* u serumima obolelih od tularemije i pokazao je visoku senzitivnost (90,59%) i specifičnost (92,22%) (187).

U svetskoj literaturi uglavnom se navodi primena direktnog imunofluorescentnog testa za dokazivanje antigena *F. tularensis* u različitim biološkim uzorcima: punktatima, aspiratima i biopstatima limfnih čvorova, uzorcima tkiva jetre i slezine, želudačnom aspiratu, brisevima rana (253, 254). Prema rezultatima Kantardijeva 2007, imunofluorescentni test (IFT) je potvrdio dijagnostičku vrednost u analizi uzoraka aspirata limfnih nodusa, ali je bio nedovoljno senzitivna za briseve konjunktiva i uzorke krvi (195).

U našem radu, pacijent se smatra obolelim kada ima kliničke simptome kompatibilne sa tularemijom kao i pozitivan serum na prisustvo antitela na *Francisella tularensis* tokom bolesti. Održavanje pozitivnosti antitela tokom vremena bez kliničkih manifestacija je samo indikator preležane bolesti. Obzirom da nismo imali nijedan slučaj reinfekcije nije bilo neophodno u daljem praćenju kontrolisati parne uzorke seruma niti određivati odnos IgG/IgM.

U ranoj fazi infekcije, često se zapažaju lažno-negativni rezultati zbog čega je neophodno uzimanje još jednog seruma posle 2 nedelje. Međutim neki pacijenti nikada ne naprave serokonverziju, dok drugi ostaju seropozitivni godinama posle infekcije i/ili imaju ukrštena antitela zbog infekcija sa drugim bakterijama (*Yersinia, Brucella*) (111).

U akutnoj fazi, do godinu dana od početka bolesti praćen je i kompariran nalaz seruma ispitivanim testovima u intervalima: do mesec dana, od 2 do 3 meseca, od 4 do 6 meseca i od 7 meseci do godinu dana od početka bolesti. Nalaz je interpretiran kao pozitivan ukoliko je imao vrednost iznad referentne. Broj pozitivnih nalaza seruma tokom ispitivanog perioda je bio ujednačen i kretao se od 85,7% do 100%. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza tokom vremena kod svih testova osim kod In-house ELISA testa kod koga je registrovan značajno veći broj negativnih rezultata u ranoj fazi bolesti (do mesec dana) u odnosu na kasniji period testiranja.

Najviše testiranih seruma (30 od 66) kao i najviše pozitivnih nalaza antitela je bilo u drugom i trećem mesecu od početka bolesti (kod Serazym ELISA 93,3%, a kod ostalih testova 96,7%). To se moglo i očekivati, znajući da se antitela pojavljuju od 6 do 10 dana nakon početka simptoma, tj. do 2 nedelje nakon infekcije, da dostižu maksimalne vrednosti od

4. do 7. nedelje a rezidualni titri antitela se mogu ustanoviti i do 11 godina od početka bolesti (111, 120, 169).

Analizom dobijenih rezultata u kasnoj fazi, nakon testiranja seruma 88 pacijenata u periodu od 1 do 11 godina od početka bolesti, pokazano je da su svi serumi Serazym ELISA testom i VIRapid testom bili stvarno pozitivni (100%). Slede IgG Serion ELISA sa ukupno 97,7% pozitivnih i IgM Serion ELISA 92% pozitivnih. Nešto slabiji je bio Western-blot test sa 10,2% lažno negativnih rezultata. Najlošije karakteristike je pokazao In-house ELISA sa najvećom zastupljenošću lažno negativnih rezultata (27,3%).

Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza IgG kao i IgM antitela u odnosu na proteklo vreme od početka bolesti. Nalaz je interpretiran kao pozitivan kod većih vrednosti od referentne. Pozitivnost IgG antitela je iznosila 100% do 9 godina posle infekcije potom je neznatno pala na 94,1% posle 11 godina. Pozitivnost IgM antitela se kretala od 71,4% do 100,0%, a posle 11 godina je iznosila 82,4%. Evidentno je održavanje IgG kao i IgM klase antitela i 11 god posle infekcije što je uskladu sa rezultatima drugih autora (111, 120).

Slično je bilo i sa rezultatima testiranja Serazym ELISA i VIRapid testom. Tokom perioda od 1 do 11 godina od početka bolesti, svi ispitivani serumi ovim testovima su dali pozitivnu reakciju (100%). Pozitivnost Western blota se kretala od 100% do 82,4% posle 11 godina, dok je najveća odstupanja imao In-house ELISA.

Za razliku od nekoliko drugih infekcija, značaj različitih subklasa imunoglobulina u dijagnozi akutne tularemije još uvek nije određena. Razlog za ekstremno dugu perzistenciju *Francisella*-specifičnih antitela nakon infekcije, što je prikazano od strane različitih autora je još uvek pod istraživanjem (111, 179, 251)

Prema istraživanju Ericssona, 25 godina posle prirodne infekcije *F. tularensis* humoralni imuni odgovor je beležio pad. Titri serumskih aglutinina su bili niski: od 53 bolesnika samo dvoje su imali titar >40 (111). Uloga serumskih antitela koji se stvaraju u visokom titru posle infekcije je manje poznata (99).

Sa druge strane, nakon kožne aplikacije atenuisane *F.tularensis* LVS vakcine, 25 godina nakon infekcije, bio je prisutan T ćelijski odgovor indukovan bakterijom *F. tularensis* koji je bio snažan i po veličini sličan odgovoru na PPD *Mycobacterium tuberculosis* (111). T ćelije 44 od 52 osobe su pokazale značajan proliferativni odgovor in vitro na svaki od 4 membranska proteina *F.tularensis*. Samo 2 osobe nisu imale ćelijski odgovor ni na jedan od ovih proteina. U većini limfocitnih kultura 18 testiranih individua, inkubiranih sa antigenom *F.tularensis* i stimulisanih proteinima *F.tularensis* LVS , detektovan je interferon γ . Ćelijski posredovan imuni odgovor koga karakteriše proliferacija T ćelija, može biti detektovan i 11 godina nakon tularemije (120). U nekoliko slučajeva, odloženi tip hipersenzitivne reakcije se viđa i do 40 godina posle infekcije. T ćelijska memorija, generalno se održava među recirkulišućim dugo živećim limfocitima. Održavanje ove memorije se smatra da je zbog kontinuirane ili intermitentne restimulacije. Intracelularna infekcija je generalno praćena dugotrajnim imunitetom injedina mogućnost koja objašnjava održavanje T ćelijske stimulacije bila bi latencija, koja se dešava u tuberkulozi (111).

Za tularemiju, međutim nije poznato da se održava u latentnoj formi i ne pojavljuje se ponovo u kasnijoj dobi ili tokom stanja imunodeficijencije. Naprotiv, kompletno bakterijsko izlečenje je pravilo. Ovo je u skladu sa gubitkom antitela tokom 25 godišnjeg perioda nakon

obolevanja od tularemije. Sa praktičnog stanovišta, kompletno negativna serologija ne isključuje istoriju tularemije ili prisustvo ćelijski posredovanog imuniteta na *F. tularensis* (111).

Najvažniji parametar zlatnog standarda kada je u pitanju procena stvarne pozitivnosti i negativnosti testova tokom praćenja bilo je poređenje sa rezultatima ostalih testova, pošto bolesnici nisu imali kliničku sliku tularemije. Najveći broj obolelih (77%) je imao po 5 i 6 pozitivnih testova od ukupno 7 korišćenih testova pri čemu je izuzet PCR. Svih 7 pozitivnih testova imalo je 6 od 113 obolelih (Serion ELISA IgG i IgM, Serazym ELISA, ELISA in-house; VIRapid, Western-blot i IIP). To nam je potvrđivalo stvarnu a ne lažnu pozitivnost, i da su bolesnici nosioci antitela zbog ranije preležane bolesti.

Najveći broj obolelih od tularemije je imao sve testove pozitivne i nijedan negativan test (55%) ili su imali samo jedan negativan test (30%). Prosečan broj negativnih testova po bolesniku iznosio je 0,65 (Me 0, Min 0, Max 3). Prosečan broj pozitivnih testova po bolesniku bio je statistički značajno veći u odnosu na prosečan broj negativnih testova ($p < 0,001$).

Ukrštenu reaktivnost sa jersinijom na osnovu rezultata *Yersinia recomLine* testa je imalo čak 46,6% seruma naših bolesnika i 34% seruma kontrolnih bolesnika što se poklapa sa rezultatima Herberta po kome se anti-*Yersinia* antitela mogu očekivati kod oko trećine zdrave populacije (255). U kontrolnoj grupi, Serazym ELISA testom je dobijeno najviše lažno pozitivnih rezultata čak 63,3% u *Yersinia* seropozitivnoj grupi.

Ukrštenu reaktivnost sa brucelom najviše je pokazao VIRapid test koji je dao skoro trećinu (7 od 20) lažno pozitivnih nalaza u kontrolnoj grupi *Brucella* pozitivnih, potom WB sa 50% lažno pozitivnih nalaza u grupi *Brucella* pozitivnih. U Turskoj, 4 od 50 (8%) seruma pacijenata sa brucelozom je ukršteno reagovalo, u Nemačkoj 5 od 17 (29,4%) (246).

5.3.2. Imunohistohemijska ispitivanja

Nasuprot teškoća u razvoju tehnika za direktno dokazivanje *F. tularensis*, histopatologija se pokazala kao klinički dragocena, međutim nedovoljna za definitivnu dijagnozu tularemije. Svi analizirani bioptati limfnih nodusa (256) imali su patohistološku dijagnozu granulomatoznog limfadenitisa (236). (Prilog, Slike 16, 17, 18, 19) Međutim u nekim slučajevima nije moguće pouzdano razlikovati granulome sa centralnom nekrozom kod tularemije od kazeoproduktivnih tuberculoidnih granuloma, pri klasičnom bojenju (256, 257, 258, 259). Diferencijalno dijagnostički, pored tuberkuloze dolaze u obzir bolest mačjeg ogreba (CSD), *lymphogranuloma inguinale*, *yersinia* limphadenitis ili sarkoidoza (259) mada je histopatološka diferencijacija tularemije od sarkoidoze moguća (256). Histopatološke lezije ulceroglandularne tularemije obuhvataju stelatne mikroabscese slične onima u CSD ili *lymphogranuloma venerum*. Patomorfološki nalaz respiratorne tularemije kada su zahvaćena pluća, je akutna nekrotizujuća pneumonija.

U svetu se rade imunohistohemijske studije, fluorescentna antigen testiranja i imunoelektronska mikroskopija za dijagnozu *F. tularensis* ali nijedna od ovih metoda nije u širokoj upotrebi niti lako dostupna a neke kao što je imunohistohemijska metoda su bile jedino dostupne u CDC ili vojsci SAD (205).

U našoj studiji korišćena je metoda indirektno imunoperoksidaze za dokazivanje antigena *F. tularensis* pomoću monoklonskih antitela 3FT6 i FT 11/1/1. Kao i kod Gyuranecz-a, specifični reagens na lipopolisaharid *F. tularensis*, korišćen u ovoj studiji

(3FT6) bio je mešavina dva klona mišjih monoklonskih antitela, koji obezbeđuju detekciju svih subspecijesa *F. tularensis*, s tom razlikom što je kod nas primenjen na humanim bioptatima, a kod Gyuranecsza na zečjim. bioptatima (260). Ova monoklonska antitela ne daju ukrštenu reakciju sa antigeno sličnim bakterijama kao što su: *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, *Br. ovis.*, *Y. pestis*, *Y.pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *V. cholera*, *E. coli*, *Fr. novicida*.

Analizirano je ukupno 26 uzoraka bioptata limfnih čvorova fiksiranih formalinom i obrađenih parafinom i to 20 uzoraka obolelih od tularemije i 6 kontrolnih uzoraka. Tularemija je potvrđena na 13 uzoraka (50%) a isključena kod 6 (23%). Kod preostalih 7 (27%) uzoraka pacijenata sa klinički i serološki potvrđenom tularemijom imunohistohemija je bila negativna. Ovako veliki broj negativnih rezultata možemo objasniti analiziranim uzorcima koji su dugo vremena bili ukalupljeni te nisu utvrđeni antigeni *F.tularensis* (5 lažno negativnih od 12 uzoraka analiziranih nakon 7 do 11 godina). Ostali razlozi mogu biti: neadekvatni deo uzorka koji je analiziran (ne sadrži antigene *F. tularensis*), duga primena antibiotske terapije kod obolelih i neadekvatna fiksacija i obrada tkiva (delovanjem samih sredstava, npr. formalina na bakteriju). Interesantno je da su nakon 4 do 7 godina svi analizirani uzorci tkiva imali pozitivnu reakciju imunohistohemije.

Specifičnost IIP je iznosila 100%, dok je senzitivnost bila niska 65%. U pogledu specifičnosti metodu IIP možemo koristiti za potvrdnu dijagnozu tularemije. U pogledu senzitivnosti mab 3FT6 se pokazao senzitivnijim od mab FT 11/1/1. Od 19 uzoraka sa serološkom potvrdom na tularemiju, 9 (47,4%) je bilo pozitivno korišćenjem mab 3FT6 na *F. tularensis*, a samo 2 uzorka (10,5%) sa mab FT 11/1/1. Od 5 uzoraka bez serološke potvrde na tularemiju, 4 je bilo pozitivno korišćenjem mab 3FT6, a samo jedan primenom mab FT 11/1/1. Oba monoklonska antitela su pogodna za imunohistohemiju na parafinskim tkivima, kao i u svežim i autolitičko-hemijskim nekrotičnim tkivima.

U pozitivnim uzorcima *Francisella* je detektovana multifokalno u područjima nekroze i/ili makrofagima. Broj obeleženih bakterija tj. bakterijskih antigena je bio veoma nizak ili nizak u većini slučajeva što se može objasniti uspešnom eliminacijom bakterije imunim sistemom domaćina. Srednji broj bakterija je viđen samo u 4 slučajeva (Prilog, slike 20, 21). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora (260)

Primenom indirektno imunoperoxidazne metode, od 20 analiziranih bioptata limfnih čvorova obolelih od tularemije u 13 (65%) uzoraka utvrđeno je prisustvo antigena na *F. tularensis*. Procenat pozitivnih uzoraka u odnosu na negativne, tokom vremena, kretao se od 33,3% do 100,0%. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju pozitivnih uzoraka u ispitivanom vremenskom periodu. Značaj ove metode je u tome što je postavljena retrogradna dijagnoza tularemije kod granulomatoznog limfadenitisa 4 pacijenta koji nisu imali serološku potvrdu bolesti.

Prednost IHC nad serologijom i bakterijskom kulturom je što je infektivnost tkivnih uzoraka eliminisana tokom vremena zahvaljujući fiksaciji formalinom. Nekoliko autora je pokazalo da je IHC koristan i senzitivna metoda za detekciju *F. tularensis* u organima domaćih i divljih životinja (205, 206, 260, 261).

Prema istraživanju Gyuranecz-a IHC je bila najsenzitivnija i najspecifičnija metoda u poređenju sa bakterijskom kulturom i serologijom. Antigen *F. tularensis* je detektovan imunohistohemijom u 46 od 50 slučajeva (92%) prirodno inficiranih, seropozitivnih evropskih

braon zečeva (*Lepus europeus*), dok je *F. tularensis ssp holarctica* izolovana kulturom i potvrđena PCR-om u 35 od 50 slučajeva (70%). Veći deo patohistoloških nalaza (88%) činila su žarišta sivo-beličaste boje, u pojedinačnim ili multiplim organima. Lezije su obuhvatale polja granulomatozne inflamacije koja često okružuju nekrozu (260).

Imunohistohemijsko bojenje humanih histoloških uzoraka i njegov značaj u odsustvu kulture ili drugih uzoraka pogodnih za PCR otkrio je Guarner (202). Analizirana su formalin-fiksirana tkiva u 4 slučaja tularemije, kao i kontrolna tkiva korišćenjem imunohistohemije (IHC) na *F. tularensis*. Pozitivno imunobojenje je nađeno u svim ispitivanim slučajevima tularemije: tri respiratorne i jedne ulceroglandularne. Obilni antigeni *F. tularensis* su zapaženi u alveolarnim prostorima kod sva tri slučaja respiratorne tularemije koja su završila fatalno. Pozitivno imunohistohemijsko bojenje je, osim u plućima, viđeno u slezini, limfnim čvorovima i jetri. Kod četvrtog pacijenta koji je imao ulceroglandularnu tularemiju biopsija limfnog čvora je demonstrirala tipične stelatne mikroapscese. Imunohistohemija je pokazala pozitivno bojenje bakterija u apscesima, ponekim makrofagima i endotelijalnim ćelijama u nenekrotičnim oblastima (205).

Imunohistohemijska identifikacija *F. tularensis* u formalin - fiksiranom tkivu je potvrđena u eksperimentalnoj studiji Zejdnera kao pouzdana metoda za postavljanje brze etiološke dijagnoze tularemije. Ova metoda se predlaže za brzu etiološku dijagnozu i na humanom materijalu, u uslovima kada sveža tkiva nisu dostupna za izolaciju i identifikaciju uzročnika (206). U eksperimentu DeBeya, potvrđen je značaj imunohistohemijskog testa za detekciju antigena *F. tularensis* u tkivima mačaka sa tularemijom. Tako je kod 10 životinja sa tipičnom tularemijom bolest bila potvrđena i izolacijom *F. tularensis* i imunohistohemijskom identifikacijom antigena *F. tularensis*. U preostalih 9 uzoraka dokazan je antigen *F.tularensis*. Iz navedenih uzoraka nije izolovana *F.tularensis* (261).

5.3.3. Molekularna dijagnostika

Mnoge prethodne studije su potvrdile značaj PCR metode u dijagnostici tularemije iz uzoraka krvi, ulcera i pusa (166, 191, 193, 195, 198),

Komercijalno je razvijen prvi PCR test za analizu formalinom fiksiranih tkiva na prisustvo genoma *F.tularensis* (262). PCR je bezbedna, brza senzitivna i specifična metoda za dokazivanje genoma *F.tularensis*. u tkivima ljudi i životinja obolelih od tularemije PCR analiza za 211-bp fragment lipoproteina *F. tularensis* je izvedena na tkivima 16 slučajeva tularemije. Svih 14 od 15 slučajeva sa intaktnom DNK (93%) je bilo pozitivno na *F. tularensis* metodom PCR. U tkivima gde je utvrđeno prisustvo genoma *F.tularensis* nađeni su iregularni mikroapscesi i granulomi u jetri, slezini, bubrezima i limfnim čvorovima kao i nekrotizujuća pneumonija. U retkim slučajevima nađeni su supurativni leptomeningitis i gastrointestinalni ulceri (262).

U našem istraživanju uzoraka bioptata limfnih nodusa PCR metodom nismo utvrdili genom *F.tularensis* ni u jednom analiziranom uzorku. Razlozi za negativne rezultate PCR metode mogu biti brojni. Pre svega, PCR metoda je metoda izbora u dijagnozi ulceroglandularne tularemije iz uzoraka lezije i akutne faze tularemije iz uzoraka krvi. Ostali razlozi mogu biti npr. starost kalupa, formalinska i parafinska obrada tkiva kao i duga primena antibiotika kod pacijenata kojima su uzeti uzorci tkiva za ovu analizu. Degradacija DNK tokom transporta se izgleda ne dešava (166).

PCR može potvrditi dijagnozu tularemije u retkim slučajevima gde drugi rutinski testovi uključujući serologiju ostaju negativni. U ulceroglandularnoj tularemiji, uzorci rana kod četiri slučaja klinički suspektne tularemije ali negativne kulturom i serologijom, pokazale su pozitivan nalaz PCR-om (166). Prajmeri zasnovani na tul4 omogućili su mnogo efikasniju amplifikaciju DNA nego li prajmeri bazirani na 16S rRNK genu. (197). Sumirajući rezultate studija na ulceroglandularnoj tularemiji u Švedskoj, ukupna senzitivnost PCR na tul4 gen iznosila je 77% a specifičnost 97%. Sa tul4 genom kao prajmerom, DNK *F. tularensis* je otkrivena u svim tipovima testiranih tkiva uključujući limfni čvor, jetru, slezinu, bubreg, srce, pluća, meninge i crevo (168).

Korisnost real-time PCR-a u dijagnostici tularemije potvrđena je na seriji dobrovoljaca vakcinisanih protiv tularemije. Uzorci briseva kože vakcinisanih dobrovoljaca LVS tularemičnom vakcinom testirani su PCR metodom, ciljajući na fop A gen i komparirani sa kulturom. Rezultati PCR su bili pozitivni kod većine vakcinisanih do 1 nedelje nakon vakcinacije, dok je kultura bila negativna.

Uvođenje PCR-a predstavlja značajno dostignuće u dijagnostici tularemije. Iako je do sada PCR metod primenjivan u dijagnostici tularemije kod ljudi izazvane sa manje virulentnim sojem *F. tularensis* subsp. *holarctica*, ova tehnologija će bez sumnje biti dragocena i kod infekcije sojem *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Budući komercijalni PCR test baziraće se na dokazivanju konzerviranih gena *F.tularensis* kao što je tul 4 gen.

5. 4. Terapijski pristup

Teškoće u lečenju ove bolesti odnose se na neprepoznavanje oboljenja i kasni početak adekvatne antimikrobne terapije, toksičnost preporučenih antimikrobnih lekova kao i na patofiziološki mehanizam infekcije (208).

U početku, dok se još nije sumnjalo na tularemiju, bilo je terapijskog lutanja i pokušaja primene različitih kombinacije antibiotika u cilju iznalaženja najefikasnije terapije. Ipak, najčešći oblik terapije bio je primena gentamicina, u trajanju od 7 do 10 dana, nakon čega bi terapija bila produžena primenom ciprofloksacina u trajanju od 10 dana. Deca mlađa od 15 god. lečena su amikacinom u trajanju od 7 do 10 dana ili gentamicinom (55). Kod lakših formi bolesti terapija je bila peroralna: monoterpija ciprofloksacinom 10 dana ili doksiciklinom 10 do 14 dana (142, 143, 233, 263, 264, 265).

Osim izbora antibiotika, Helvac i Meric, nalaze da je rani antibiotski tretman (unutar prve 3, odnosno 2 nedelje od početka bolesti) mnogo efikasniji za razrešenje infekcije (52, 138). Tokom epidemije tularemije u Tuskoj, 75% bolesnika koji su započeli odgovarajući antibiotski tretman unutar prve tri nedelje se kompletno oporavilo dok je samo 26,8% bolesnika tretiranih odgovarajućim antibioticima unutar 4 ili više nedelja od bolesti, izlečeno (51).

Prehospitalni period trajanja bolesti a ujedno i vreme započinjanja adekvatnog lečenja 33,4 dana uz veoma veliku individualnu varijabilnost, što je bilo statistički značajno duže u odnosu na kontrolnu grupu i duže u odnosu na rezultate Golubovića tokom epidemije u Bosni (15 dana) (237) Ovo objašnjavamo lutanjem u dijagnozi i neprepoznavanjem oboljenja koje se prvi put javlja na našem području 1999. god te su prosečne dužine prehospitalnog i

hospitalnog perioda duže na račun novootkrivenih bolesnika u prvoj, pa i u drugoj godini javljanja epidemije.

Trajanje prehospitalnog perioda je bilo statistički značajno duže kod obolelih koji su imali komplikacije (48 dana) u odnosu na one koji nisu imali komplikacije (25 dana).

U epidemiji tularemije u Turskoj, srednje vreme odlaganja početka davanja odgovarajućeg antibiotika je iznosilo 8 nedelja (1-17 nedelja) (51). Isto je zapažanje i tokom lečenja tularemije u Španiji gde se ističe dug period odlaganja od početka simptoma do postavljanja dijagnoze i započinjanja terapije. Razlog je isti kao i kod nas i u Turskoj: prethodno odsustvo bolesti na tom prostoru (221).

Prosečan bolnički period naših bolesnika iznosio je 18,6 dana a ukupno trajanje bolesti čak 54,8 dana što je bilo statistički značajno duže u odnosu na kontrolnu grupu.

Poređenjem primenjene terapije u prebolničkom i bolničkom periodu ustanovili smo da je neadekvatna terapija u prehospitalnom periodu statistički bila značajno zastupljenija u odnosu na istu terapiju u hospitalnom periodu, kao i da je zastupljenost adekvatnog bolničkog lečenja u hospitalnom periodu značajno veća u odnosu na njenu zastupljenost u prehospitalnom periodu. U prilog tome nam govore dobijeni podaci: pre hospitalizacije neadekvatno je lečeno čak 45,1% bolesnika, kod 20,4% je bila zastupljena polipragmazija, a samo 7,9% bolesnika je lečeno adekvatno. Kod hospitalizovanih bolesnika adekvatna terapija je bila primenjena kod 76,2%, neadekvatna kod 2%, a kod 21,8% je bila prisutna polipragmazija. Polipragmazija je podrazumevala primenu polimikrobne antibiotske terapije u kojoj je bilo i odgovarajućih ali i neodgovarajućih antibiotika. Ona je bila podjednako zastupljena u oba perioda lečenja i povećavala je procenat neadekvatnog lečenja za oko 20%. Naši podaci su u skladu sa rezultatima Celebija po kome je 87% bolesnika je lečeno adekvatnom antibiotskom terapijom a 13% bolesnika (od kojih se polovina oporavila spontano), nije tretirano bilo kakvom antibiotskom terapijom (51).

Terapija je ordinirana u skladu sa poznatim terapijskim principima kao i na osnovu rezultata in vitro ispitivanja osetljivosti *F. tularensis* na antibiotike, pojedinih autora. Po Ikaheimu, svih 38 sojeva *Francisella tularensis* (biovar *F. tularensis palaeartica*) je bilo osetljivo na antibiotike kao što su streptomycin (MIC₉₀ 4,0 mg/L), tetraciklin (MIC₉₀ 0,38 mg/L), hloramfenikol (MIC₉₀ 0,38 mg/L), tobramicin (MIC₉₀ 1,5 mg/L) i gentamicin (MIC₉₀ 1,0 mg/L). Hinoloni su imali nizak MIC₉₀: ciprofloksacin, 0,016 mg/L; levofloksacin, 0,016 mg/L; grepafloksacin, 0,047 mg/L; i trovafloksacin, 0,032 mg/L. Nasuprot tome svi sojevi su bili rezistentni na B-laktame i azitromicin (217). In vivo neuspeh ceftriaksonske terapije u tuleremiji dokumentovan je u literaturi (212, 266). Poznati terapijski stav o neefikasnosti penicilina u lečenju tularemije, jasno i ubedljivo je potvrđen tokom ove epidemije, što je u skladu sa iznetim činjenicama u standardnoj literaturi.

Od 113 ispitanih bolesnika, antibioticima je lečeno ukupno 101 a adekvatno lečenih je bilo 99. Kombinovana terapija je bila zastupljenija od monoterapije (61% naspram 28%), a kombinovana sukcesivna zastupljenija od kombinovane polivalentne terapije (49% spram 19%).

Među monoterapijom najveći broj bolesnika je primao gentamicin (74), slede ciprofloksacin (8), doksiciklin (3), amikacin (6) i streptomycin (2). U pogledu dužine bolničkog lečenja najkraće bolničko lečenje iznosilo je X_{sr}=6,90, Me=7,00 dana kod primene amikacina. Najduže bolničko lečenje bilo je X_{sr}=11,06 i Me=10 dana kod lečenja

ciprofloksacinom. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u dužini lečenja primenjenim antibioticima.

Među kombinovanom terapijom najveći broj bolesnika je primao gentamicin i ciprofloksacin (n=32), potom gentamicin i doksiciklin (n=20), gentamicin, ciprofloksacin i doksiciklin (n=8) a najmanje bolesnika (n=2) je primalo ciprofloksacin i doksiciklin. Najkraće bolničko lečenje iznosilo je $X_{sr}=16,9$ Me =16,0 dana kod lečenja gentamicinom i doksiciklinom, a najduže $X_{sr}=30,75$, Me=28,50 dana kod kombinacije: gentamicin, ciprofloksacin i doksiciklin. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u dužini bolničkog lečenja u odnosu na vrstu kombinovane terapije. Mann-Whitney U test pokazuje da su oboleli od tularemije koji su lečeni kombinacijom gentamicina, ciprofloksacina i doksiciklina imali statistički značajno duže bolničko lečenje od obolelih koji su lečeni kombinacijom gentamicina i doksiciklina. Pacijenti koji su lečeni gentamicinom i ciprofloksacinom imali su statistički značajno duže lečenje u odnosu na pacijente lečene gentamicinom i doksiciklinom.

U pogledu trajanja lečenja, prosečno trajanje monoterapije iznosilo je 13 dana a kombinovane 21,2 dana. Trajanje kombinovane terapije bilo je statistički značajno duže u odnosu na trajanje monoterapije ($p<0,001$).

Pre hospitalizacije prosečna dužina terapije je bila 15,5 dana (min 2 dana, max 60 dana), za vreme hospitalizacije 19 dana (min 5 dana, max 61 dan) i ukupno trajanje lečenja 32,8 (min 8 dana, max 150 dana). Obolele od tularemije karakteriše velika individualna varijabilnost u dužini prehospitarnog, hospitalnog i ukupnog lečenja, kao i prilično dugo antibiotsko lečenje. Ovo je na račun dugog prehospitarnog lečenja kao i ponovljenih hospitalizacija kod pojave komplikacija.

Dužina hospitalizacije kod obolelih sa prisustvom komplikacija iznosila je 23 dana, nasuprot 13 dana kod obolelih bez komplikacija, a ukupno trajanje bolesti 68 dana kod obolelih sa komplikacijama, u odnosu na 38 dana kod obolelih bez komplikacija. Utvrđeno je da su trajanje hospitalizacije kao i ukupno trajanje bolesti statistički značajno duži kod obolelih koji su imali komplikacije u odnosu na one koji nisu imali komplikacije. Takođe, pacijenti sa komplikacijama su hospitalizovani više puta u odnosu na pacijente bez komplikacija koji su najčešće imali jednu hospitalizaciju.

Kod obolelih od tularemije, od ukupno 99 adekvatno lečenih bolesnika, lečenje započeto u periodu kraćem od 3 nedelje od početka bolesti je imalo 46,5% bolesnika, a kod 53,5% je adekvatno lečenje započeto nakon 3 nedelje od početka bolesti. Statistički je utvrđeno da je kod obolelih od tularemije značajno kasnije započeto adekvatno lečenje u odnosu na kontrolnu grupu. Čak dve trećine komplikacija (76,6%) su se javile nakon kasnog započinjanja adekvatnog lečenja. Komplikacije se statistički značajno češće javljaju kod pacijenata čije je lečenje započeto nakon 3 nedelje od početka bolesti ($p<0,001$).

U prilog tome govori značajno češća pojava apscedirajućeg limfadenitisa kod kasno započetog adekvatnog lečenja (čak 79,5% svih supurativnih limfadenita). Utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između pojave apscedirajućeg limfadenitisa i vremena započinjanja adekvatnog lečenja ($p<0,001$).

Recidiv se takođe češće javljao kod kasnije započetog adekvatnog lečenja (61,1% svih recidiva) ali ne statistički značajno u odnosu na pojavu kod pravovremenog lečenja.

Perzistentna limfadenopatija je bila prisutna kod 6,6% bolesnika sa kasnijim početkom adekvatnog lečenja ali statistički značajna povezanost sa vremenom započinjanja adekvatnog lečenja ne postoji.

Od ukupno 99 adekvatno lečenih na našoj klinici čak 43,4% je imalo komplikacije ali je krajnji ishod kod svih bio izlečenje. Terapijski uspeh kod nas, bio je veći u odnosu na isti u Turskoj, gde se 21 od 61 bolesnika (34,4%), kompletno oporavilo od bolesti, unutar perioda od 4 meseca. Utvrđeno je da postoji visoka statistička značajnost između pojave komplikacija i vrste primenjene terapije. Monoterapija je češće primenjivana kod bolesnika bez komplikacija i dovela je do izlečenja u 81,2% slučajeva. Kombinovana terapija je češće primenjivana kod komplikacija i dovela je do izlečenja u 55,1% slučajeva. Najveći broj pacijenata koji su imali komplikacije lečen je sukcesivnom terapijom gentamicinom i ciprofloksacinom (20), slede sukcesivna terapija gentamicinom i doksiciklinom –(6) i polivalentna, amikacin sa longacefom (6 bolesnika).

Najčešće komplikacije tokom lečenja kombinovanom terapijom bile su apscedirajući limfadeniti (50,7%) i recidivi bolesti (26,1%). Sva četiri slučaja perzistentne limfadenopatije su se javila nakon lečenja kombinovanom terapijom. Manje je verovatno da je perzistentna limfadenopatija moguća posledica lečenja ovom terapijom, pre će biti da je patogeneza intracelularnog uzročnika odgovorna za dugotrajnu limfadenopatiju.

Po Kaya, 2011, neuspešnost terapije definisana je prisustvom perzistentne ili rekurentne temperature, povećanjem veličine ili pojavom nove limfadenopatije i održavanjem konstitucionalnog sindroma sa porastom nivoa proteina akutne faze infekcije (267).

U literaturi nema jasno postavljenih kriterijuma za početak drugog terapijskog režima nakon terapijskog neuspeha. Po Perezu, nastavak terapijskog režima je indikovano, kada bolesnik ima dugotrajnu temperaturu, kada se pojavljuju novi limfni čvorovi i kada se održava konstitucionalni sindrom (astenija, anoreksija, gubitak na telesnoj težini) sa povišenim markerima inflamacije (221).

Kada je u pitanju efikasnost lečenja, najveći procenat izlečenja bez komplikacija imala je primena streptomocina (100%), ali je ovu terapiju primalo samo dva pacijenta. Ovo je u skladu sa rezultatima Enderlina i sar. prema kojima je stopa izlečenja streptomocinom 97%, bez relapsa (212).

Visoku stopu izlečenja bez komplikacija imao je gentamicin (83,3%), slede ciprofloksacin (75%) i kombinovana terapija gentamicinom i doksiciklinom (70,0%).

Terapijski neuspeh podrazumevao je prisustvo fluktuantne limfadenopatije i relapsa nakon inicijalnog terapijskog režima. Apscedirajući limfadenitis se javio kod 16,7% lečenih gentamicinom, dok se recidiv javio kod jednog bolesnika sa IgA nefropatijom (268). U odnosu na naše podatke, stopa izlečenja za gentamicin prema Enderlinu bila je slična i iznosila 86%. Stopa relapsa iznosila je 6 % a neuspeh terapije 8% (212).

Kod monoterapije ciprofloksacinom, u prosečnom trajanju od 11 dana, od osam lečenih bolesnika dvoje je imalo komplikacije: kod jednog apscedirajući limfadenitis, a kod drugog recidiv. Ovo je u skladu sa podacima Russella o mogućoj pojavi relapsa nakon lečenja ciprofloksacinom (269), ali se razlikuje od rezultata drugih autora po kojima su se hinoloni pokazali kao obećavajući lekovi u terapiji tularemije (214, 215, 216, 269).

Analizirajući pojavu komplikacija u zavisnosti od primenjene terapije došli smo do zaključka da je najveći procenat komplikacija ustanovljen kod primene amikacina kod dece

(100%) najčešće u kombinaciji sa longacefom. Apscedirajući limfadenitis se javio kod svih 6 lečenih amikacinom i longacefom (100%). Najveći procenat recidiva registrovan je pri primeni sukcesivne terapije gentamicinom i ciprofloksacinom (37,5%).

Efekat primenjene terapije aminoglikozida i fluorohinolona davanih sukcesivno u trajanju od 22,5 dana je bio slabiji nego što se navodilo u dostupnoj literaturi (237). Iako je kod svih konačni efekat bio izlečenje, komplikacije su se javile kod 62,5% bolesnika, sa predominacijom apscedirajućih limfadenita u 53,1% slučajeva, potom recidiva. Da li su ove komplikacije posledica kasno započete adekvatne terapije ili prethodne polipragmazije ili su posledica lečenja navedenom terapijom ostaje pitanje.

Preliminarni podaci Limaye i sar. pokazuju da hinoloni mogu biti efikasni alternativni lekovi, sa zadovoljavajućim kliničkim odgovorom bez relapsa, kod pacijenata koji ne zahtevaju parenteralnu terapiju ili su intolerantni na standardne terapijske režime. Međutim, zbog ograničenog kliničkog iskustva i njihova uloga u tretiranju ozbiljne bolesti je neizvesna (270).

Da su fluorohinoloni odlična alternativa aminoglikozidima pokazali su Syrjala et al. 10 vrsta *F. tularensis* imalo je odličnu osetljivost na ciprofloksacin, norfloxacin, ofloksacin, i pefloksacin. U anglosaksonskoj literaturi, objavljeno je 10 slučajeva bolesnika tretiranih oralno sa hinolonima; svi ovi bolesnici bili su izlečeni (221).

U epidemiji ulceroglandularne tularemije u Španiji, tretirano je 142 bolesnika, terapijski neuspeh je bio prisutan kod 22,5% a ciprofloksacin je imao najmanji procenat neuspeha i najmanje neželjenih efekata. Terapijski neuspeh je bio povezan sa ulceroglandularnom formom bolesti i upotrebom doksiciklina kao inicijalnom terapijom. Ciprofloksacin je korišćen kod 66 bolesnika u ovoj studiji i dobijeni su bolji rezultati sa ovim lekom nego sa uobičajenim terapeutskim režimima. Kao inicijalna terapija postignut je terapijski uspeh kod 21 od ukupno 22 bolesnika (95,5%) Ciprofloksacin je korišćen kao terapija drugog reda posle neuspeha prethodne terapije kod 34 bolesnika i kod svih je postignuto izlečenje (221).

Vanbolnička terapija oralnim hinolonima, primenjena je u pustuloglandularnoj i neseptikemičnoj formi tularemije u Skandinavskim zemljama. Fluorohinoloni su se pokazali efikasnim kao sekundarna terapija nakon neuspešne primarne terapije doksiciklinom (271) i gentamicinom (272).

Prema iskustvu Sheel-a i sar. bolesnik lečen doksiciklinom, ubrzo je imao relaps te je terapija nastavljena 2 nedelje ciprofloksacinom, nakon čega je potpuno izlečen (271).

Prema rezultatu Risi-a i sar, pacijent sa ulceroglandularnom tularemijom koji je inicijalno odgovorio na terapiju gentamicinom, ubrzo je imao klinički relaps. Ciprofloksacin je nastavljen 28 dana nakon čega je bio klinički oporavljen (272).

Naše nedoumice u lečenju tularemije kod dece ciprofloksacinom, razrešila su iskustva drugih autora.

Od praktičnog je značaja efikasna primena fluorohinolona u lečenju tularemije kod dece u Norveškoj i Finskoj. Tako je u Norveškoj, svih 12-ro dece, uzrasta od 1 do 10 god, lečeno od ulceroglandularne tularemije oralnim ciprofloksacinom u dozi od 15-20mg/kg tt dnevno podeljeno u dve doze, 10-14 dana i izlečeno bez ikakvih komplikacija. Oporavak je počeo 4. dana od uvođenja terapije. Zaključeno je da je ciprofloksacin zadovoljavajući antibiotik za lečenje vanbolničke tularemije (215). U Finskoj, u periodu od 1967 do 1987. ukupno je 67

dece mlađe od 16 god, lečeno od ulceroglandularne forme tularemije, različitim antibioticima, uključujući i ciprofloksacin, bez razlike u ishodu bolesti (273).

Samo troje naših bolesnika je lečeno doksiciklinom u prosečnom trajanju od 8,64 dana, pri čemu se kod jednog javio apscedirajući limfadenitis. Prema rezultatima Enderlina stopa izlečenja za tetraciklin je 88%, a relapsi su se javili u 12% slučajeva (212). Slična su i iskustva Russela o mogućoj pojavi relapsa kod lečenja doksiciklinom. Terapijski neuspeh doksiciklina, po Castrillonu, je povezan sa ulceroglandularnom formom bolesti i upotrebom doksiciklina kao inicijalnom terapijom (221).

Tok bolesti kod naših pacijenata je zbog komplikacija bio prolongiran, kao i u epidemijama u Bosni, Španiji i Turskoj (11, 179, 198). Rekonvalescencija je bila dosta duga upravo zbog uporne i recidivantne limfadenopatije, zbog čega se nekada terapija morala primeniti i 2 do 3 puta (221, 237, 239).

Kod obolelih od tularemije 67,3% pacijenata je tretirano konzervativnom antibiotskom terapijom, a 32,7% je podvrgnuto hirurškom tretmanu što je u skladu sa prethodnim istraživanjem (236). Konzervativna terapija je bila zastupljenija u odnosu na hiruršku pri lečenju, ali ne statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu. U odnosu na naše iskustvo, veći terapijski neuspeh je zabeležen u Turskoj gde je čak 40 bolesnika (65,5%) podvrgnuto eksciziji limfnog čvora ili drenaži.

Hirurška terapija imala je i terapijski i dijagnostički značaj. Po jedna hirurška intervencija je primenjena kod 30 bolesnika a više od jedne (kombinacija hirurških intervencija) kod 7 bolesnika (kod 3 bolesnika incizija i punkcija, kod 3 incizija i biopsija i kod jednog incizija i ekstirpacija). U najvećem broju slučajeva je urađena biopsija (11,5%), zatim incizija i drenaža (6,2%), ekstirpacija (5,3%) i punkcija kod 3,5% pacijenata što je u skladu sa prethodnim istraživanjem (236). Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u primenjenim hirurškim intervencijama između grupa.

Na osnovu ranijih iskustava, u prvih par nedelja bi trebalo izbegavati inciziju zbog rizika od širenja infekcije u lokalno tkivo (4).

Evolucija apscedirajućeg limfadenitisa kod obolelih bila je sledeća: 78,7% je podvrgnuto hirurškoj intervenciji, 12,8% je imalo spontanu fistulizaciju i 8,5% je imalo spontanu involuciju. Krajnji ishod kod svih je bilo izlečenje.

Konačni ishod nakon primenjene konzervativne i radikalne terapije bio je kompletna klinička remisija bolesti kod 109 (96,5%) bolesnika, dok je kod četvoro (3,5%) ostala dugotrajna i recidivantna limfadenopatija što je u skladu sa prethodnim rezultatima (236). Jedno od objašnjenja ove pojave kao i ostalih komplikacija je moguća rezistencija *F. tularensis* na antibiotike koju opisuju i drugi autori govoreći o sve većoj pojavi rezistentnih sojeva *F. tularensis* na streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol (274).

6. ZAKLJUČAK

1. ELISA IgG Serion test je pokazao najveću osetljivost (97,4%) i specifičnost (93,1%) i predlaže se kao siguran i pouzdan test za dijagnostiku i praćenje obolelih od tularemije.
2. Imunohromatografski test (VIRapid) se može praktično koristiti kao brzi dijagnostički test za potvrdu kliničke dijagnoze zahvaljujući svojoj visokoj senzitivnosti (97,4%), ali nije pouzdan za masovni skrining, zbog niže specifičnosti (85,2%).
3. Rezultati dobijeni serološkim testovima se ne mogu tumačiti izolovano i nezavisno od bolesnika. Nalaz antitela IgM i IgG klase ili ukupnih antitela na *F.tularensis* u serumima bolesnika bez kliničkih manifestacija bolesti, i posle više godina od početka infekcije, nije pokazatelj akutne, već preležane bolesti.
4. Prisustvo antitela IgM klase u serumima pacijenata i nakon 11 godina od infekcije ukazuje na stalnu stimulaciju imunskog sistema od strane intracelularnih antigena *F.tularensis*.
5. Imunohistohemijska metoda sa monoklonskim antitelima na *F. tularensis* (FT 11/1/1 i 3FT6) ima najveću specifičnost (100%), te može poslužiti kao zlatni standard za potvrdu bolesti, a istovremeno i za postavljanje retrogradne dijagnoze tularemije. Oba korišćena monoklonska antitela su pogodna za imunohistohemijsku analizu svežih kao i parafinski obrađenih uzoraka tkiva obolelih od tularemije. Veća osetljivost je dobijena sa FT 11/1/1 monoklonskim antitelom.
6. PCR metoda nije metoda izbora za dijagnozu tularemije na biopsijskim uzorcima tkiva ukalupljenim u parafin. Negativan rezultat PCR testom ne isključuje dijagnozu tularemije, već se uzimaju u razmatranje rezultati ostalih laboratorijskih testova i klinički nalaz tularemije.
7. Orofaringealna tularemija je najzastupljenija klinička forma bolesti (93,8%) sa dominantnom jednostranom cervikalnom limfadenopatijom (91,5%). Postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti jednostrane lokalizacije limfadenopatije kod obolelih u odnosu na kontrolnu grupu.
8. Utvrđeno je da postoji statistički značajna povezanost između veličine limfonodusa i pojave komplikacija kod obolelih od tularemije. Čak 80% bolesnika sa komplikacijama je imalo limfonoduse dijametra većeg od 3 i 5cm.
9. Visok procenat komplikacija, u čak 43 % bolesnika, sa najvećom zastupljenošću apsedirajućeg limfadenitisa i recidiva bolesti, je posledica kasno započete adekvatne terapije. Komplikacije se značajno češće javljaju kod pacijenata čije je lečenje započeto nakon 3 nedelje od početka bolesti.
10. Najveća efikasnost u lečenju sa najvećim procentom izlečenja i najmanje komplikacija ustanovljena je kod primene gentamicina (83,3%), potom ciprofloksacina (75%).
11. Hirurška intervencija je imala dijagnostički i terapijski značaj kod nedijagnostikovane limfadenopatije i njenih komplikacija.
12. Terapijski uspeh se ogledao u kompletnoj kliničkoj remisiji kod 96,5% bolesnika praćenih u periodu od 1 do 11 godina, osim perzistentne limfadenopatije kod 4 bolesnika (3,5%). Nije bilo uticaja terapije na rezultate seroloških analiza obolelih.

7. LITERATURA

1. Penn RL. *Francisella tularensis* (Tularemia). In: Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th Ed, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Eds), Churchill Livingstone, Philadelphia 2010. p.2927.
2. Jacobs RF. Tularemia. In: Harrison TR, Fauci AS, Braunwald E, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2001. p. 990-3.
3. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1105: 1-29.
4. Tärnvik A, Berglund L: Tularaemia. *Eur Respir J*.2003; 21(2): 361-73.
5. Dennis TD. Tularemia. In: Armstrong D. and Cohen J, editors. Infectious diseases, 1 th ed. (vol. II), Mosby. London: An imprint of Harcourt Publisers Ltd; 1999. 6: 34.19-34.20.
6. Kugeler KJ, Mead PS, Janusz AM, et al. Molecular Epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009; 48: 863.
7. Johansson A, Goransson I, Larsson P, Sjöstedt A. Extensive allelic variation among *Francisella tularensis* strains in a short-sequence tandem repeat region. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9): 3140–6.
8. Gurycova D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol*. 1998; 14 (8): 797-802.
9. Payne MP, Morton RJ. Effect of culture media and incubation temperature on growth of selected strains of *Francisella tularensis*. *J Vet Diagn Invest*. 1992; 4 (3):264-9.
10. Fujita H, Sato T, Watanabe Y, Ohara Y, Homma M. Correlation of the polysaccharide antigens of *Francisella tularensis* with virulence in experimental mice. *Microbiol Immunol*. 1995; 39 (12) : 1007-9.
11. Fulop M, Manchee R, Titball R. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine* 1995; 13 (13): 1220-5.
12. Sjöstedt A, Tärnvik A, Sandstrom G. The T-cell-stimulating 17-kilodalton protein of *Francisella tularensis* LVS is a lipoprotein. *Infect Immun* 1991; 59(9): 3163-8
13. Surcel H. Diversity of *Francisella tularensis* antigens recognized by human T lymphocytes. *Infect Immun*. 1990; 58(8):2664-8.
14. Sjöstedt A, Sandstrom G, Tärnvik A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals. *J Clin Microbiol*. 1990; 28 (1): 43-8.
15. Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009; 73: 684.
16. Forslund AL, Salomonsson EN, Golovliov I, et al. The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 227.

17. Oyston PC. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J Med Microbiol*. 2008; 57: 921-30.
18. Barker, J. H., Weiss, J., Apicella, M. A. & Nauseef, W. M. Basis for the failure of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to prime human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 2006; 74, 3277–84.
19. Hajjar AM, Harvey MD, Shaffer SA, Goodlett DR, Sjostedt A, Edebro H, Forsman M, Bystrom M, Pelletier M. Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect Immun*. 2006; 74: 6730–8.
20. Vinogradov E, Perry MB, Conlan JW. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur J Biochem*. 2002; 269: 6112–18.
21. Thomas RM, Titball RW, Oyston PCF, Griffin K, Waters E, Hitchen PG, Michell SL, Grice ID, Wilson JC, Prior JL The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies tularensis and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect Immun*. 2007; 75: 371–8.
22. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4): 631-46.
23. Feldman KA. Tularemia. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 222(6): 725-30.
24. Berdal, BP, R. Mehl NK, Meidell AM, Lorentzen S, Scheel. O. Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 13(3):191–5.
25. Morner T. The ecology of tularemia. *Rev Sci Tech*. 1992; 11 (4): 1123-30.
26. Leighton FA, Artsob HA, Chu MC, Olson JG. A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can J Public Health*. 2001; 92(1): 67–71.
27. Magnarelli L, Levy S, Koski R. Detection of antibodies to *Francisella tularensis* in cats. *Res Vet Sci* 2007; 82(1): 22-6.
28. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandström G, Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*. 2003 ;69(1): 600-6.
29. Titball RW, Johansson A, Forsman M. Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? *Trends Microbiol* 2003; 11(3): 118-23.
30. Hubalek Z, Sixl W, Halouzka J, Mikulaskova M. Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian republics. *Cent Eur J Public Health* 1997; 5(4): 199–201.
31. Gurycová D, Výrosteková V, Khanakah G, Kocianová E, Stanek G. Importance of surveillance of tularemia natural foci in the known endemic area of Central Europe, 1991-1997. *Wien Klin Wochenschr*. 2001; 113(11-12): 433-8.
32. Hubalek Z, Treml F, Halouzka J, Juncova Z, Hunady M, Janik V. Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticularis* ticks in an enzootic focus of tularaemia. *Med Vet Entomol*. 1996; 10(3): 241-6.
33. Penn RL. Epidemiology, microbiology, and pathogenesis of tularemia. Available from: UpToDate.<http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-microbiology-and-pathogenesis-of-tularemia>. Last updated: Sep 10, 2013

34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tularemia - Missouri, 2000-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58: 744.
35. Ohara Y, Sato T, Homma M. Arthropod-borne tularemia in Japan: clinical analysis of 1, 374 cases observed between 1924 and 1996. *J Med Entomol.* 1998; 35(4): 471.
36. Rydén P, Björk R, Schäfer ML, et al. Outbreaks of tularemia in a boreal forest region depends on mosquito prevalence. *J Infect Dis.* 2012; 205: 297
37. Tarnvik A, Gandstrom G, Sjostedt A. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931-1993. *FEMS immunology and medical microbiology.* 1996; 13(3): 201-4.
38. Eliasson H, Lindbäck J, Nuorti JP, Arneborn M, Giesecke J, Tegnell A. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(9): 956-60.
39. Rossow H, Ollgren J, Klemets P, Pietarinen I, Saikku J, Pekkanen E, Nikkari S, Syrjälä H, Kuusi M, Nuorti JP. Risk factors for pneumonic and ulceroglandular tularaemia in Finland: a population-based case-control study. *Epidemiol Infect.* 2013; 2: 1-10.
40. Onishchenko GG. Infectious diseases in natural reservoirs: epidemic situation and morbidity in the Russian Federation and prophylactic measures. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2001; (3):22-8.
41. Stewart SJ. Tularemia: association with hunting and farming. *FEMS-Immunol Med Microbiol.* 1996; 13(3): 197-99.
42. González Quijada S, Rubio Díaz M, Yáñez Ortega JL, Carramiñana Martínez I, Ojeda Fernández E, Lozano García J. Tularemia: study of 27 patients. *Med Clin (Barc).* 2002; 119(12): 455-7.
43. Padeshki PI, Ivanov IN, Popov B, Kantardjiev TV. The role of birds in dissemination of *Francisella tularensis*: first direct molecular evidence for bird-to-human transmission. *Epidemiol Infect.* 2010; 138: 376.
44. Syrjala H, Kujala P, Myllyla V, Salminen A. Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand J Infect Dis.* 1985; 17(4): 371-5.
45. Feldman KA, Ensore RE, Lathrop SL, Matyas BT, McGuill M, Schriefer ME, Stiles-Enos D, Dennis DT, Petersen LR, Hayes EB. An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N Eng J Med.* 2001; 345(22): 1601-6.
46. Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, Jorgensen TR, Cotter B, Lieftucht A, D'Ancona F, Dennis DT, Kosoy MA, Mulliqi-Osmani G, Grunow R, Kalaveshi A, Gashi L, Humolli I. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(1): 69-73.
47. Grunow R, Finke JE. A procedure for differentiating between the intentional release of biological warfare agents and natural outbreaks of disease: its use in analyzing the tularemia outbreak in Kosovo in 1999 and 2000. *Clinic Microbiol Infect.* 2002; 8: 510-21.
48. Djordjevic M, Garbino J, Uckay I, Garzoni C, Kostic V, Lako B, Tasic D. An abrupt onset of tularemia in children in Kosovo. In: Abstract book of the 15th ECCMID; 2005 april 2-5; Copenhagen, Denmark. p 399.
49. Kantardjiev T, Ivanov I, Velinov T, Padeshki P, Popov B, Nenova R, Mincheff M. Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997-2005. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(4): 678-80.

50. Christova I, Velinov T, Kantardjiev T, Galev A. Tularaemia outbreak in Bulgaria. *Scand J Infect Dis.* 2004; 36(11-12): 785-9.
51. Celebi G, Baruönü F, Ayoğlu F, Cinar F, Karadenizli A, Uğur MB, Gedikoğlu S. Tularemia, a reemerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses. *Jpn J Infect Dis.* 2006; 59(4): 229-34.
52. Helvacı S, Gedikoğlu S, Akalin H, Oral HB. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16(3): 271-6.
53. Berdal BP, Mehl R, Haaheim H, Løksa M, Grunow R, Burans J, Morgan C, Meyer H. Field detection of *Francisella tularensis*. *Scand J Infect Dis.* 2000; 32(3): 287-91.
54. Berrada ZL, Telford Iii SR. Survival of *Francisella tularensis* Type A in brackish-water. *Arch Microbiol.* 2011; 193: 223.
55. El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, et al. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75:7488.
56. Djordjevic-Spasic M, Potkonjak A, Kostic V, Lako B, Spasic Z. Oropharyngeal tularemia in father and son after consumption of under-cooked rabbit meat. *Scand J Infect Dis.* 2011; 43(11-12): 977-81.
57. Ohara Y, Sato T, Homma M. Epidemiological analysis of tularemia in Japan (yato-byo). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 13(3):185-9
58. Tärnvik A, Sandström G, Sjöstedt A. Infrequent manifestations of tularemia in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 1997; 29(5): 443-6.
59. Heneberg Đ. Istraživanje prirodnih žarišta tularemije i doprinos njihovom otkrivanju i poznavanju u SFRJ. Doktorska disertacija. Vojno medicinska akademija, Beograd, 1972.
60. Borčić B. Epidemiološka obilježja tularemije u njenim prirodnim žarištima u Hrvatskoj (doktorska disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet; 1973.
61. Kartsev AD. Cyclic morbidity of certain natural foci infections in the Russian Federation. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2002; (1):23-7.
62. Evans ME, Friedlander AM. Tularemia. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR, editors. Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Part I: Warfare, Weapons, and the Casualty. Washington, DC: Borden Institute, United States Government Printing, 1997; p503 – 512.
63. Feldman KA, Julian K, Matyas BT , Telford SR, Chu MC, Petersen LR, et al. Tularemia on Martha's Vineyard: Seroprevalence and Occupational Risk. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2003; 9 (3): 350-4
64. Tularemia-United States 1990-2000. Centers for Disease Control and Prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2002; 51(9):182-4.
65. Gurycová D, Varga V, Výrosteková V, Gacíková E, Péci J. A tularemia epidemic in western Slovakia 1995-1996. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1999; 48(3):97-101.
66. Berger SA. Tularemia - Germany: Background, 2000. A ProMED-mail post. Available from:URL:<http://www.promedmail.org/pls/otn/f?p=2400:1202:2965585565480322>.
67. Greco D, Allegrini G, Tizzi T, Ninu E, Lamanna A, Luzi S. A waterborne tularemia outbreak. *Eur J Epidemiol.* 1987; 3(1): 35–8.

68. Mignani E, Palmieri F, Fontana M, Marigo S. Italian epidemic of waterborne tularaemia. *Lancet*. 1988; 2(8625):1423.
69. Eiros Bouza JM, Rodriguez Torres A. Tularemia. *Rev Clin Esp*. 1998; 198: 785–8.
70. Maurin M, Pelloux I, Brion JP, Del Banõ JN, Picard A. Human tularemia in France, 2006-2010. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(10): e133-41.
71. Leblebicioglu H, Esen S, Turan D, Tanyeri Y, Karadenizli A, Ziyagil F, Goral G. Outbreak of tularemia: a case-control study and environmental investigation in Turkey. *Int J Infect Dis*. 2007; 82(1): 22-6.
72. Komitova R, Nenova R, Padeshki P, Ivanov I, Popov V, Petrov P.J Tularemia in bulgaria 2003-2004. *Infect Dev Ctries*. 2010; 24;4(11): 689-94.
73. Conlan JW, Chen W, Shen H, Webb A, KuoLee R. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. *Microb Pathog*. 2003; 34: 239–48.
74. Geyer SJ, Burkey A, Chandler FW. Tularemia. In: Pathology of Infectious Diseases, Connor DH. (Ed), Appleton & Lange, Stamford, Conn 1997. p.869.
75. Clemens DL, Horwitz MA. Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1105:160.
76. Rotem S, Cohen O, Bar-Haim E, Bar-On L, Ehrlich S, Shafferman A. Protective immunity against lethal *F. tularensis* holarctica LVS provided by vaccination with selected novel CD8+ T cell epitopes. *PLoS One*. 2014; 9(1): e85215.
77. Santic M, Al-Khodor S, Abu Kwaik Y. Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. *Cell Microbiol* 2010; 12:129.
78. Golovliov I, Baranov V, Krocova Z, Kovarova H, Sjostedt A. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect. Immun*. 2003a; 71: 5940–50.
79. Clemens DL, Lee BY, Horwitz M. A. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun*. 2004; 72: 3204–17.
80. McCaffrey RL, Allen LA. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1224–30.
81. Ben Nasr A, Haithcoat J, Masterson JE, Gunn JS, Eaves-Pyles T, Klimpel GR. Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of Francisella leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J. Leukoc Biol*. 2006; 80: 774–86.
82. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 2005; 73: 5892.
83. Santic M, Asare R, Skrobonja I, Jones S, Abu Kwaik Y. Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. *Infect Immun*. 2008; 76: 2671–7.
84. Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli, J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103: 14578–83.

85. Mariathasan S, Weiss DS, Dixit VM, Monack DM. Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J Exp Med.* 2005; 202: 1043–49.
86. Santic M, Pavokovic G, Jones S, Asare R, Kwaik YA. Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by *Francisella tularensis*. *Microbes Infect.* 2010b; 12: 126–134.
87. Akimana C, Al-Khodor S, Abu Kwaik, Y. Host factors required for modulation of phagosome biogenesis and proliferation of *Francisella tularensis* within the cytosol. *PLoS ONE.* 2010; 5: e11025. doi: 10.1371.
88. Lai XH, Golovliov I, Sjostedt A. *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun.* 2001; 69: 4691–94.
89. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005; 73: 1907–16.
90. Asare R, Kwaik YA. Exploitation of host cell biology and evasion of immunity by *Francisella tularensis*. *Front Microbiol.* 2010; 1(145): 1-14.
91. Case ED, Chong A, Wehrly TD, Hansen B, Child R, Hwang S, Virgin HW, Celli J. The *Francisella* O-antigen mediates survival in the macrophage cytosol via autophagy avoidance. *Cell Microbiol.* 2013 ; doi: 10.1111/cmi.12246. [Epub ahead of print]
92. Reilly TJ, Baron GS, Nano FE, Kuhlenschmidt MS. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *J Biol Chem.* 1996; 271: 10973–83.
93. Mohapatra NP, Balagopal A, Soni S, Schlesinger LS, Gunn JS. AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. *Infect Immun* 2007; 75: 390–396.
94. Forestal CA, Malik M, Catlett SV, et al. *Francisella tularensis* has a significant extracellular phase in infected mice. *J Infect Dis.* 2007; 196: 134.
95. Horzempa J, O'Dee DM, Stolz DB, et al. Invasion of erythrocytes by *Francisella tularensis*. *J Infect Dis.* 2011; 204:51.
96. Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1105: 284-24.
97. Sandstrom G. The Tularemia vaccine. *J Chem Technol Biotechnol.* 1994; 59(4): 315-20.
98. Cole LE, Elkins KL, Michalek SM, Qureshi N, Eaton LJ, Rallabhandi P, Cuesta N, Vogel SN. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J Immunol.* 2006; 176(11): 6888-99.
99. Tarnvik A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. *Rev Infect Dis.* 1989;11(3):440–51.
100. Conlan JW, Shen H, Webb A, Perry MB. Mice vaccinated with the O-antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. *Vaccine.* 2002; 20: 3465–71.
101. Henry T, Brotcke A, Weiss DS, et al. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J Exp Med* 2007; 204:987

102. Kirimanjeswara GS, Golden JM, Bakshi CS, Metzger DW. Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis*. *J Immunol*. 2007; 179: 532.
103. Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1105: 284.
104. Cowley SC, Elkins KL. Immunity to *Francisella*. *Front Microbiol* 2011; 16(2): 26.
105. Syrjala H, Herva E, Ilonen J, Saukkonen K, Salminen A. A whole-blood lymphocyte stimulation test for the diagnosis of human tularemia. *J Infect Dis*. 1984; 150(6): 912–15.
106. Tarnvik A, Sandstrom G, Lofgren S. Time of lymphocyte response after onset of tularemia and after tularemia vaccination. *J Clin Microbiol*. 1979; 10(6): 854–60.
107. Karttunen R, Andersson G, Ekre H-PT, et al. Interleukin 2 and gamma interferon production, interleukin 2 receptor expression, and DNA synthesis induced by tularemia antigen in vitro after natural infection or vaccination. *J Clin Microbiol*. 1987; 25(6): 1074-8
108. Waag D, Galloway A, Sandstrom G, Bolt CR, England MJ, Nelson GO, Williams JC. Cell-mediated and humoral immune responses induced by scarification vaccination of human volunteers with a new lot of the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(9): 2256-64.
109. Sandstrom G, Sjostedt A, Johansson T, Kuoppa K, Williams JC. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. *FEMS Microbiol Immunol* 1992; 5(4): 201-10.
110. Waag DM, Sandstrom G, England MJ, Willijams JC. Immunogenicity of a new lot of *Francisella tularensis* live vaccine strain in human volunteers. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996; 13(3): 205-9.
111. Ericsson M, Sandstrom G, Sjostedt A, Tamvik 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(1): 110-14.
112. Tarnvik A, Lofgren ML, Lofgren S, Sandstrom G, Wolf-Watz H. Long-Lasting cell-mediated immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine. *J Clin Microbiol*. 1985; 22(4): 527-30.
113. Rahhal RM, Bush TJV, McLendon, MK, Apicella MA, Bishop GA. Differential effects of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide on B lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 813–820.
114. Malik M, Bakshi CS, Sahay B, Shah A, Lotz SA, Sellati TJ. Toll-like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with *Francisella tularensis*. *Infect Immun*. 2006; 74: 3657–62.
115. Thakran S, Li H, Lavine CL, Miller MA, Bina JE, Bina XR, Re F. Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J BiolChem* 2007; 283: 3751–60.
116. Malik M, Bakshi CS, McCabe K, Catlett SV, Shah A, Singh R, Jackson PL, Gaggar A, Metzger DW. Matrix metalloproteinase 9 activity enhances host susceptibility to pulmonary infection with type A and B strains of *Francisella tularensis*. *J Immunol*. 2007; 178, 1013–1020.

117. Fortier AH, Slayter MV, Ziemba R, Meltzer MS, Nacy CA. Live vaccine strain of *Francisella tularensis*: Infection and immunity in mice. *Infect Immun.* 1991;59(9):2922-8.
118. Syrjälä H, Koskela P, Ripatti T, Salminen A, Herva E. Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical forms and severities of the disease. *J Infect Dis.* 1986; 153(1):142-5.
119. Sato T, Fujita H, Ohara Y, Homma M. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(10):2372-4.
120. Koskela P, Salminen A. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6):973-9.
121. Burke DS. Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. *J Infect Dis.* 1977; 135(1): 55-60.
122. Lu Z, Perkins HM, Sharon J. Antibodies to both terminal and internal B-cell epitopes of *Francisella tularensis* O-polysaccharide produced by patients with tularemia. *Clin Vaccine Immunol.* 2014; 21(2): 227-33.
123. Fulop M, Mastroeni P, Green M, Titball RW. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis*. *Vaccine.* 2001; 19: 4465-72.
124. Stenmark, S., Lindgren, H., Tarnvik, A., and Sjostedt, A. Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*. *Microb Pathog.* 2003; 35: 73-80.
125. Lavine CL, Clinton SR., Angelova-Fischer I, Marion TN, Bina XR, Bina JE, Whitt M. A, Miller MA. Immunization with heat-killed *Francisella tularensis* LVS elicits protective antibody-mediated immunity. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 3007-3020.
126. Cole LE, Yang Y, Elkins KL, Fernandez ET, Qureshi N, Shlomchik M, Herzenberg LA, Vogel SN. Antigen-specific B-1a antibodies induced by *Francisella tularensis* LPS provide long-term protection against *F. tularensis* LVS challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 106, 4343-48.
127. Sjostedt A, Conlan JW, North RJ. Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection. *Infect Immun.* 1994; 62(7): 2779-83.
128. Elkins KL, Bosio CM, Rhinehart-Jones TR: Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect Immun* 1999; 67(11): 6002-7.
129. Klimpel GR, Eaves-Pyles T, Moen ST, Taormina J, Peterson JW, Chopra, AK, Niesel, DW, Carness P, Haithcoat JL, Kirtley M, Nasr, AB. Levofloxacin rescues mice from lethal intra-nasal infections with virulent *Francisella tularensis* and induces immunity and production of protective antibody. *Vaccine.* 2008; 26: 6874-82.
130. Crane DD, Warner SL, Bosio CM. A novel role for plasmin mediated degradation of opsonizing antibody in the evasion of host immunity by virulent, but not attenuated, *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 2009; 183: 4593-4600.

131. Dreisbach VC, Cowley S, Elkins KL. Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infect Immun.* 2000; 68: 1988–1996.
132. Krocova Z, Härtlova A, Souckova D, Zivna L, Kroca M, Rudolf E, Macela A, Stulik J. Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Microb Pathog.* 2008; 45(2): 79-85.
133. Casadevall A. Passive antibody administration (immediate immunity) as a specific defense against biological weapons. *Emerging Infect Dis.* 2002; 8: 833–841.
134. Hepburn MJ, Simpson AJ. Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008; 6(2): 231-40.
135. Klotz SA, Penn RL, Provenza JM. The unusual presentations of tularemia. Bacteremia, pneumonia and rhabdomyolysis. *Arch Intern Med.* 1987; 147(2): 214.
136. Provenza JM, Klotz SA, Penn RL. Isolation of *Francisella tularensis* from blood. *J Clin Microbiol.* 1986; 24(3): 453–5.
137. Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA. Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64(4): 251–69.
138. Meric M, Willke A, Finke EJ, Grunow R, Sayan M, Erdogan S, Gedikoglu S. Evaluation of clinical, laboratory, and therapeutic features of 145 tularemia cases: the role of quinolones in oropharyngeal tularemia. *APMIS.* 2008; 116(1): 66-73.
139. Guerrant RL, Humphries MK Jr, Butler JE, Jackson RS. Tickborne oculoglandular tularemia -case report and review of the seasonal and vectorial associations in 106 cases. *Arch Intern Med.* 1976; 136(7): 811–13.
140. Thompson S, Omphroy L, Oetting T. Parinaud's oculoglandular syndrome. *Am J Ophthalmol* 2000; 131(2): 283-284.
141. Luotonen J, Syrjälä H, Jokinen K, Sutinen S, Salminen A. Tularemia in otolaryngologic practice. An analysis of 127 cases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986; 112(1): 77–80.
142. Kostić V, Jovanović B, Krstić M, Mitrović G, Spasić M, Veličković Z. Tularemija naša prva iskustva. *Acta medica medianae.* 2000; 1:73-9.
143. Kostić V, Jovanović B, Krstić M, Jovanović M, Skorić S, Velicković Z, Lako B. An epidemic of tularemia in the Nish area. *Srp Arh Celok Lek* 2002; 130(3-4): 91-4.
144. Blanco JR, Gutierrez C, Zabalza M, Salcedo J, Erdozain I, Oteo JA. Clinical microbiological case: sore throat and painful bilateral lymph nodes. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7 (11): 654.
145. Gill V, Cunha BA. Tularemia pneumonia. *Semin Respir Infect* 1997; 12(1): 61–7.
146. Christenson B. An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden. *Scand J Infect Dis.* 1984; 16(3): 285–90.
147. Bellido-Casado J, Perez-Castrillon JL, Bachiller-Luque P, Martín-Luquero M, Mena-Martín FJ, Herreros-Fernandez V. Report on five cases of tularaemic pneumonia in a tularaemia outbreak in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(3): 218–20.
148. Jacobs R. Tularemia. *Adv Ped Infect Dis.* 1997; 12: 55-69.
149. Syrjala H, Karvonen J, Salminen A. Skin manifestations of tularemia: a study of 88 cases in northern Finland during 16 years (1967–1983). *Acta Derm Venereol.* 1984; 64(6): 513–16.

150. Roberto CF. Sweet's syndrome associated with *Francisella tularensis*. *International Journal of Dermatology*. 2001; 40: 791-3.
151. Jounio U, Renko M, Uhari M. An outbreak of holarctica-type tularemia in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29: 160.
152. Haristoy X, Lozniewski A, Tram C, Simeon D, Bevanger L, Lion C. *Francisella tularensis* Bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(6): 2774-6.
153. Rodgers BL, Duffield RP, Taylor T, Jacobs RF, Schutze GE. Tularemic meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1998; 17(5): 439-41.
154. Tancik CA, Dillaha JA. *Francisella tularensis* endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(2): 399-400.
155. Landais C, Levy PY, Habib G, Raoult D. Pericardial effusion as the only manifestation of infection with *Francisella tularensis*: a case report. *J Med Case Reports*. 2008; 2:206.
156. Gourdeau M, Lamothe F, Ishak M, et al. Hepatic abscess complicating ulceroglandular tularemia. *Can Med Assoc J*. 1983; 129(12): 1286-8.
157. Ortego TJ, Hutchins LF, Rice J, Davis GR. Tularemic hepatitis presenting as obstructive jaundice. *Gastroenterology*. 1986; 91(2): 461-371.
158. Tilley WS, Garman RW, Stone WJ. Tularemia complicated by acute renal failure. *South Med J*. 1983; 76: 273-274.
159. Tarnvik A, Henning C, Falsen E, Sandstrom G. Isolation of *Francisella tularensis* biovar palaeartica from human blood. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989; 8(2): 146-50.
160. Hill B, Sandstrom G, Schroder S, Franzen C, Tarnvik A. A case of tularemia meningitis in Sweden. *Scand J Infect Dis*. 1990; 22(1): 95-9.
161. Hofinger DM, Cardona L, Mertz GJ, Davis LE. Tularemic meningitis in the United States. *Arch Neurol* 2009; 66:523.
162. Pittman T, Williams D, Friedman AD. A shunt *Infection* caused by *Francisella tularensis*. *Pediatr Neurosurg*. 1996; 24(1): 50-1.
163. S. F. Depth public health – Infectious disease emergencies. Tularemia. 2005; Available from; www.sfcdep.org/ideguide/pdf/tularemia.
164. Syrjala H. Peripheral blood leukocyte counts, erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in tularemia caused by the type B strain of *Francisella tularensis*. *Infection*. 1986; 14(2): 51-4.
165. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001; 285(21): 2763-73.
166. Johansson A, Berglund L, Eriksson U, Göransson I, Wollin R, Forsman M, Tärnvik A, Sjöstedt A. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1): 22-6.
167. Celebi B, Kılıç S. Development of a novel *Francisella tularensis* antigen stained with tetrazolium-blue for tularemia microagglutination test *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(3): 514-22.
168. Tarnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1105:378.
169. Chocarro A, Garcia A, Gonzales A. How long persists the tularemia antibody response? In: Abstract book of the 10th European Congress of Clinical Microbiology and

- Infectious Diseases. Stockholm, Sweden, 28-31 May 2000. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6 Suppl 1:1-298.
170. Ristanović E. Imudijagnostika tularemije korišćenjem izolata *Francisella tularensis* sa našeg geografskog područja kao antigena (magistarski rad). Beograd: Biološki fakultet; 1999.
 171. Koskela P, Herva E. Immunity against *Francisella tularensis* in northern Finland. *Scand J Infect Dis.* 1982; 14(3): 195–9.
 172. Levesque BL, Serres GD, Higgins R, Artsob H, Grondin J, Major M, Gavrie M, et al. Seroepidemiologic Study of Three Zoonoses (Leptospirosis, Q Fever, and Tularemia) among Trappers in Quebec, Canada. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995; 2(4): 496–8.
 173. Gutiérrez MP, Bratos MA, Garrote JI, Dueñas A, Almaraz A, Alamo R, Rodríguez Marcos H, Rodríguez Recio MJ, Muñoz MF, Orduña A, Rodríguez-Torres A. Serologic evidence of human infection by *Francisella tularensis* in the population of Castilla y León (Spain) prior to 1997. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 35(2): 165-9.
 174. Carlsson HE, Lindberg AA, Lindberg G, Hederstedt B, Karlsson KA, Agell BO. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. *J Clin Microbiol* 1979; 10(5): 615–21.
 175. Syrjälä H, Koskela P, Ripatti T, Salminen A, Herva E. Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical forms and severities of the disease. *J Infect Dis.* 1986;153(1):142-5.
 176. Viljanen MK, Nurmi T, Salminen A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial sonicate antigen for IgM, IgA, and IgG antibodies to *Francisella tularensis*: comparison with bacterial agglutination test and ELISA with lipopolysaccharide antigen. *J Infect Dis.* 1983; 148(4): 715-20.
 177. Porsch-Ozcürümez M, Kischel N, Priebe H, Splettstösser W, Finke EJ, Grunow R. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11(6): 1008-15.
 178. Bevanger L, Maeland JA, Naess AI. Competitive enzyme immunoassay for antibodies to a 43,000-molecular-weight *Francisella tularensis* outer membrane protein for the diagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(5): 922-6.
 179. Waag DM, McKee KT Jr, Sandstrom G, Pratt LL, Bolt CR, England MJ, Nelson GO, Williams JC. Cell-mediated and humoral immune responses after vaccination of human volunteers with the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995; 2(2): 143-8.
 180. Bevanger L, Maeland JA, Naess AI. Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(3): 433-7.
 181. Fulop MJ, Webber T, Manchee RJ, Kelly DC. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 1991;29(7): 1407-12.
 182. Schmitt P, Splettstösser W, Porsch-Ozcürümez M, Finke EJ, Grunow R. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol Infect.* 2005; 133(4): 759-66.

183. Narayanan RB, Drabick JJ, Williams JC, Fortier AH, Meltzer MS, Sadoff JC, Bolt CR, Nacy-CA. Immunotherapy of tularemia: characterization of a monoclonal antibody reactive with *Francisella tularensis*. *J Leukoc Biol.* 1993; 53(1): 112-6.
184. Grunow R, Splettstoesser W, McDon.ald S, Otterbein C, O'Brien T, Morgan C, Aldrich J, Hofer E, Finke EJ, Meyer H. 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.
185. Splettstoesser W, Guglielmo-Viret V, Seibold E, Thullier P. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in sera from different mammalian species. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(5): 1629-34.
186. Tärnvik A, Löfgren S, Ohlund L, Sandström G. Detection of antigen in urine of a patient with tularemia. *Eur J Clin Microbiol.* 1987; 6(3):318-9.
187. Ristanović E. Tularemija vojnička bolest. Savremena mikrobiološka dijagnostika. Beograd: Novinsko izdavački centar; 2002.
188. Hotta A, Uda A, Fujita O, Tanabayashi K, Yamada A. Preparation of monoclonal antibodies for detection and identification of *Francisella tularensis*. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(1): 81-4.
189. Gubbins MJ, Berry JD, Schmidt L, Cabral T, Kabani A, Tsang RS. Production and characterization of a monoclonal antibody to *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Hybridoma (Larchmt).* 2007; 26(2): 98-103.
190. Petersen JM, Schriefer ME, Carter LG, Zhou Y, Sealy T, Bawiec D, et al. Laboratory analysis of tularaemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 2004a; 10: 419-425.
191. Johansson A, Ibrahim, A, Göransson I, Eriksson, Gurycova D, Clarridge J, Sjöstedt A. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol.* 2000; 11(8): 4180-5.
192. Long GW, Oprandy JJ, Narayanan RB, Fortier AH, Porter KR, Nacy CA. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(1): 152-4.
193. Junhui Z, Rujfii Y, Jianchun L, Songle Z, Meiling C, Fengxiang C, Hong C, Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol.* 1996; 45 (6): 477-82.
194. Molins CR, Carlson JK, Coombs J, Petersen JM. Identification of *Francisella tularensis* subsp. tularensis A1 and A2 infections by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 64:6.
195. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1045-8.
196. Eliasson H, Sjöstedt A, Bäck 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.

197. 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.
198. Fulop M, Leslie D, Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54: 364–6.
199. Kantardjiev T, Padeshki P, Ivanov IN. Diagnostic approaches for oculoglandular tularemia: advantages of PCR. *Br J Ophthalmol*. 2007; 91(9): 1206-8.
200. Hodges LS, Penn RL. *Francisella tularensis* (Tularemia) as an agent of tularemia. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th Ed, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (Eds), Churchill Livingstone, Philadelphia 2010. p.3971.
201. Penn RL. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of tularemia. Available from: UpToDate. <http://www.uptodate.com/store>. Last updated: Jan 9, 2012.
202. Guarner J, Zaki SR. Histopathology and immunohistochemistry in the diagnosis of bioterrorism agents. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54(1): 3-11.
203. Asano S. Granulomatous lymphadenitis. *J Clin Exp Hematop* 2012; 52(1): 1-16. Review.
204. Guarner J. Detection of microorganisms in granulomas that have been formalin-fixed: review of the literature regarding use of molecular methods. *Scientifica*. 2012; 2012: 494571.
205. Guarner J, Greer P, Bartlett J, Chu M, Shieh W, Zaki S. Immunohistochemical detection of *Francisella tularensis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Appl Immunohistol Mol Morphol*. 1999; 7: 122–126.
206. Zeidner NS, Carter LG, Monteneiri JA, Petersen JM, Schriefer M, Gage KL, Hall G, Chu MC. An outbreak of *Francisella tularensis* in captive prairie dogs: an immunohistochemical analysis. *J Vet Diagn Invest*. 2004; 16(2):150-2.
207. Thomas LD, Schaffner W. Tularemia pneumonia. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24: 43.
208. Cross JT, Jacobs RF. Tularemia: treatment failures with outpatient use of ceftriaxone. *Clin Infect Dis*. 1993; 17(6): 976–80.
209. Cross JT, Schutze GE, Jacobs RF. Treatment of tularemia with gentamicin in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. 1995; 14(2): 151–2.
210. Mason WL, Eigelsbach HT, Little SF, Bates JH. Treatment of tularemia, including pulmonary tularemia with gentamicin. *Am Rev Respir Dis*. 1980; 121(1): 39–45.
211. Urich SK, Petersen JM. In vitro susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* types A and B from North America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 2276.
212. Enderlin G, Morales L, Jacobs RF, Cross JT. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis*. 1994; 19(1): 42–7.
213. Hassoun A, Spera R, Dunkel J. Tularemia and once-daily gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 824.
214. Eliasson H, Broman T, Forsman M, Bäck E. Tularemia: current epidemiology and disease management. *Infect Dis Clin North Am*. 2006; 20: 289.
215. Johansson A, Berglund L, Gothefors L, Sjostedt A, Tarnvik A. Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19(5): 449-53.

216. Syrjala H, Schldl R, Raisainen S. In vitro susceptibility of *Francisella tularensis* to fluoroquinolones and treatment of tularemia with norfloxacin and ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991; 10(2): 68-70.
217. Ikaheimo I, Syrjala H, Karhukorpi J, Schildt R, Koskela M. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 46(2): 287-90.
218. Scheel O, Hoel T, Sandvik T, Berdal BP. Susceptibility pattern of Scandinavian *Francisella tularensis* isolates with regard to oral and parenteral antimicrobial agents. *APMIS*. 1993; 101(1): 33-6.
219. Limaye AP, Hooper CJ. Treatment of tularemia with fluoroquinolones: two cases and review. *Clin Infect Dis*. 1999; 29(4): 922-4.
220. Chocarro A, Gonzalez A, Garcia I. Treatment of tularemia with ciprofloxacin. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2): 623.
221. Perez-Castrillon JL, Bachiller-Luque P, Martin-Luquero M, Mena-Martin FJ, Herreros V. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(4): 573-6.
222. Johansson A, Berglund L, Sjostedt A, Tarnvik A. Ciprofloxacin for treatment of tularemia. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(2): 267-8.
223. Aranda EA. Treatment of tularemia with levofloxacin. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7(3): 167-8.
224. Burkhardt JE, Walterspiel JN, Schaad UB. Quinolone arthropathy in animals versus children. *Clin Infect Dis*. 1997; 25(5): 1196-1204.
225. Schaad UB, Salam MA, Aujard Y, et al. Use of fluoroquinolones in pediatrics: consensus report of an International Society of Chemotherapy commission. *Pediatr Infect Dis J*. 1995; 14(1): 1-9.
226. Gangat N. Cerebral abscesses complicating tularemia meningitis. *Scand J Infect Dis*. 2007; 39(3): 258-61
227. Hilleman MR. Overview: cause and prevention in biowarfare and bioterrorism *Vaccine*. 2002; 20(25-26): 3055-67.
228. Golovliov I, Ericsson M, Akerblom L, Sandstrom G, Tarnvik A, Sjostedt A. Adjuvanticity of ISCOMs incorporating a T cell-reactive lipoprotein of the facultative intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Vaccine* 1995; 13: 261-7.
229. Golovliov I, Kuoppa K, Sjostedt A, Tarnvik A, Sandstrom G. Cytokine expression in the liver of mice infected with a highly virulent strain of *Francisella tularensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996; 13(3): 239-44.
230. Golovliov I, Sandstrom G, Ericsson M, Sjostedt A, Tarnvik A. Cytokine expression in the liver during the early phase of murine tularemia. *Infect Immun* 1995; 63(2): 534-81.
231. Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect*. 2003; 5(2):135-42.
232. Fuller CL, Brittingham KC, Hepburn MJ, Martin JW, Petitt PL, Pittman PR, Bavari S. Dominance of human innate immune responses in primary *Francisella tularensis* live vaccine strain vaccination. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(5): 1186-8.

233. Krstić M, Konstatinović Lj, Kostić V, Mitrović G, Škorić S, Vrbić M, Jovanović M, Lako B. Analysis of 38 cases of Tularemia. In: Abstract book of the 10th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Stockholm, Sweden, 28-31 May 2000. *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6 Suppl 1:1-298.
234. Ristanović E. Imunodijagnostika tularemije korišćenjem izolata *Francisella tularensis* sa našeg geografskog područja kao antigena (magistarski rad). Beograd: Biološki fakultet; 1999.
235. Lako B, Ristanovic E, Spasic M, Prodanovic R, Djuric R. The first epidemic of tularemia in FR Yugoslavia. *ASA Newslett.* 2001; 5: 19–20.
236. Đorđević M. Kliničko epidemiološke karakteristike i značaj imunodijagnostičkih testova kod tularemije (magistarski rad). Niš: Medicinski fakultet; 2008.
237. Golubović S, Verhaz A, Rodić Ž, Tešić Z. Klinički fenomeni kod oboljelih od tularemije u ratom zahvaćenim područjima 1995. U Zborniku radova Drugog kongresa ratne medicine sa međunarodnim učešćem; 1996 April; Banja Luka. Str.11-16.
238. Gutierrez PM, Bratos AM, Garrote IJ, Duenas A, Almaraz A, Alamo R, Rodriguez MH, Rodriguez RM, Munoz M, Orduna A, Rodriguez TA. Serologic evidence of human Infection by *Francisella tularensis* in the population of Castilla y Leon (Spain) prior to 1997. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 2003; 35(2): 165-9.
239. Ozdemir D, Sencan I, Annakkaya AN, Karadenizli A, Guclu E, Sert E, Emeksiz M, Kafali A. Comparison of the 2000 and 2005 outbreaks of tularemia in the Duzce region of Turkey. *Jpn J Infect Dis.* 2007; 60(1): 51-2.
240. Bratton RL, Corey R. Tick-borne disease. *Am Fam Physician* 2005; 71(12): 2323-30.
241. Alonso Ovies A, Redondo Gonzalez LM, Lobo Valentin P, Bachiller Luque P, Martin Luquero M, Verrier Hernandez A. Tularemia in the differential diagnosis of cervical lymph node enlargement. An outbreak of tularemia in Castilla-Leon, Spain. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2000; 51(1): 62-7.
242. Nordahl SH, Hoel T, Scheel O, Olofsson J. Tularemia: a differential diagnosis in otorhino-laryngology. *J Laryngol Otol* 1993; 107(2): 127-9.
243. Akdis AC, Kilicurgay K, Helvacı S, Mistik R, Oral B. Immunological evaluation of erythema nodosum in tularemia. *Br J Dermatol.* 1993; 129 (3): 275.
244. Trnjak Z, Nožić D, Marinković V, Bojić I, Lako B, Begović V, Mikić D. Tonzilofaringealni oblik tularemije. *Vojnosanit pregl.* 1997; 54 (3): 217-221.
245. WHO. 2007. World Health Organization Guidelines on Tularaemia. In: Epidemic and Pandemic Alert and Response. Geneva: World Health Organization.
246. Chaignat V, Djordjevic-Spasic M, Ruettger A, Otto P, Klimpel D, Wolfgang Müller W, Sachse K, Araj G, Tomaso H. Evaluation of seven serological assays for diagnosis of tularemia. *Immunol.* In process.
247. Eliasson H, Back E. 2007. Tularaemia in an emergent area in Sweden: an analysis of 234 cases in five years. *Scand J Infect Dis.* 39(10): 880-889.
248. Kiliç S, Celebi B, Yeşilyurt M. 2012. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for the serologic diagnosis of tularemia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74(1): 1-5.
249. Cubero Ribas A, Menegotto F, González Cabrero S, Gutiérrez P, Bratos Pérez MA, Delgado JM, Orduña A. 2011. Evaluación de un nuevo test inmunocromatográfico

- (Virapid®Tularemia) para el diagnóstico serológico de tularemia humana. In. Malaga, Spain.
250. Martín-Serradilla JI, Sánchez Navarro JJ, Arias Giralda M, San José Alonso J. Evolution of serological characteristics in 26 patients with tularemia three years after the outbreak. *Rev Clin Esp.* 2004; 204(7): 351-4.
 251. Rastawicki W, Jagielski M, Gierczyński R. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tularemia. *Med Dosw Mikrobiol.* 2005; 57(4): 425-9.
 252. Bevanger L, Maeland JA, Kvan AI. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994; 1(2): 238-40.
 253. Ananova EV, Kamennova LS, Meshcheriakova IS, Saveleva RA. Detection of tularemia pathogens in patients with the use of an immunofluorescence reaction. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1989; (4): 46-9.
 254. Peruski AH, Johnson LH 3rd, Peruski LF Jr. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *J Immunol Methods* 2002; 263(1-2): 35-41.
 255. Tomaso H, Mooseder G, Dahouk SA, Bartling C, Scholz HC, Strauss R, Treu TM, Neubauer H. 2006. Seroprevalence of anti-Yersinia antibodies in healthy Austrians. *Eur J Epidemiol.* 21(1): 77-81.
 256. Sutinen S, Syrjala H. Histopathology of human lymph node tularemia caused by *Francisella tularensis* biovar palaeartica. *Arch Path lab.* 1986; 110(1): 42-6.
 257. Rosai J. Acherman's surgical pathology. 8th ed. (vol. II). St. Louis: Mosby; 1996.
 258. Schwartz D, Genta RM, Connor DH. Infectious and parasitic diseases. In: Rubin E, Rubin J, editors. Rubin's pathology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004. p 356-471.
 259. Symmers WStC. The lymphoreticular system. In: Symmers WStC. ed. Systemic pathology. 2nd ed. (vol II). Edinburgh: Churchill Livingstone; 1980. p. 304-391.
 260. Gyuranecz M, Szeredi L, Makrai L, Fodor L, Mészáros AR, Szépe B, Füleki M, Erdélyi K. Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 2010; 47(5): 958-63.
 261. DeBey BM, Andrews GA, Chard-Bergstrom C, Cox L. Immunohistochemical demonstration of *Francisella tularensis* in lesions of cats with tularemia. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14(2): 162-4.
 262. 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.
 263. Djordjevic M, Kostic V, Lako B, Ristanovic E. Epidemiological situation and clinical manifestations of human tularemia in the southeastern Serbia in 2003 In: Abstract book of the 4th International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. p. 40.
 264. Djordjevic M, Krstic M. Ulceroglandular form of tularemia: case report. In: Abstract book of the 4th International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. p. 36.

265. Djordjevic M, Rankovic Z. Therapy Problems in a patient with tularemia and IgA nephropathy. Case Report. In: Abstract book of the 5th European Congress of Chemotherapy and Infection. ; 2003 Oct 17-20 ; Rhodos, Greece. p. 87.
266. Gilligan PH. Therapeutic challenges posed by bacterial bioterrorism threats. *Current Opinion in Microbiology*. 2002; 5(5): 489-95.
267. Kaya A, Deveci K, Uysal IO, Güven AS, Demir M, Uysal EB, Gültekin A, İçağasioğlu FD. Tularemia in children: evaluation of clinical, laboratory and therapeutic features of 27 tularemia cases. *Turk J Pediatr*. 2012; 54(2): 105-12.
268. Russell P, Eley SM, Fulop MJ, Bell DL, Titball RW. The efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental tularaemia. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 41(4): 461-5.
269. Scheel O, Reiersen R, Hoel T: Treatment of tularemia with ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992; 11(5): 447-8.
270. Sutera V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *Antimicrob Chemother*. 2014 ; 69(1):101-10.
271. Ulu Kılıç A¹, Kılıç S, Celebi B, Sencan I. In Vitro Activity of Tigecycline Against *Francisella tularensis* Subsp. holarctica in Comparison with Doxycycline, Ciprofloxacin and Aminoglycosides. *Mikrobiyol Bul*. 2013; 47(1): 189-91
272. Risi GF, Pombo DJ. Relapse of tularemia after aminoglycoside therapy: case report and discussion of therapeutic options. *Clin Infect Dis*. 1995; 20(1): 174-5
273. Uhari M, Syrjälä H, Salminen A: Tularemia in children caused by *Francisella tularensis* biovar palaeartica. *Pediatr Infect Dis J*. 1990; 9(2):80-3.
274. Terriff CM, Schwartz MD, Lomaestro BM; Society of Infectious Diseases Pharmacists. Bioterrorism: pivotal clinical issues. Consensus review of the Society of Infectious *Pharmacotherapy*. 2003; 23(3): 274-90.

8.PRILOG

8.1. Kliničke manifestacije kod tularemije



Slika 1.



Slika 2.



Slika 3.



Slika 4.



Slika 5.



Slika 6.

Slike 1-6. Apscedirajući limfadenitis kod obolelih



Slika 7. Jednostrani eksudativni tonzilofaringitis

Slika 8. Okuloglandularni sindrom



Slika 9.



Slika 10.

Slike 9 i 10. Eksudativni multiformni eritem na šakama serološki potvrđene tularemije



Slike 11, 12. Recidivantni limfadenitis kod dece

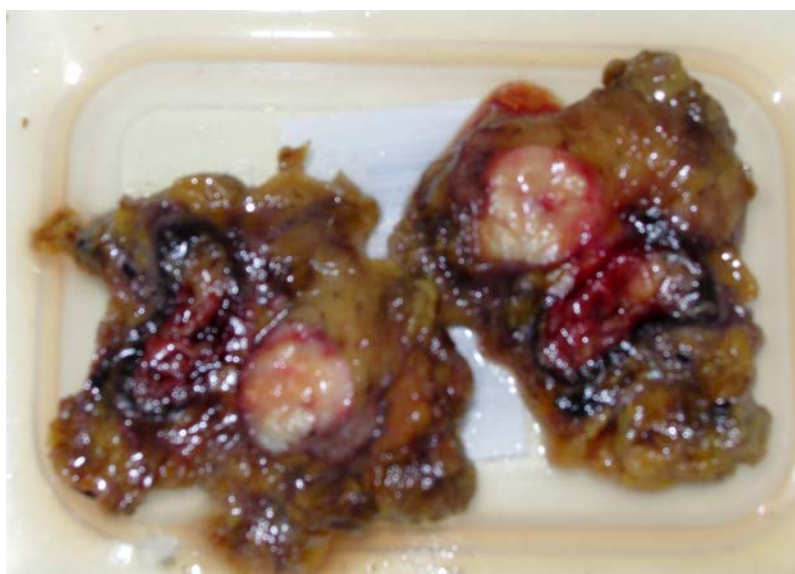


Slika 13.



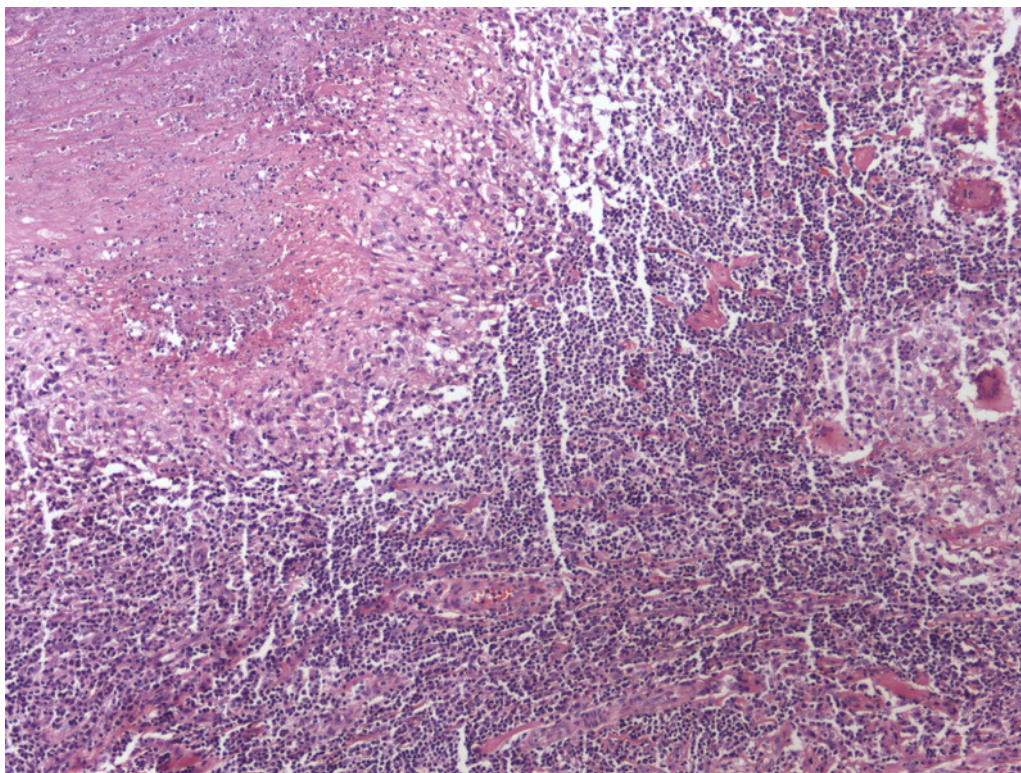
Slika 14.

Slike 13 i 14. Biopsija uvećanog limfnog čvora kod atipične obostrane limfadenopatije, serološki i imunohistohemijski potvrđene tularemije

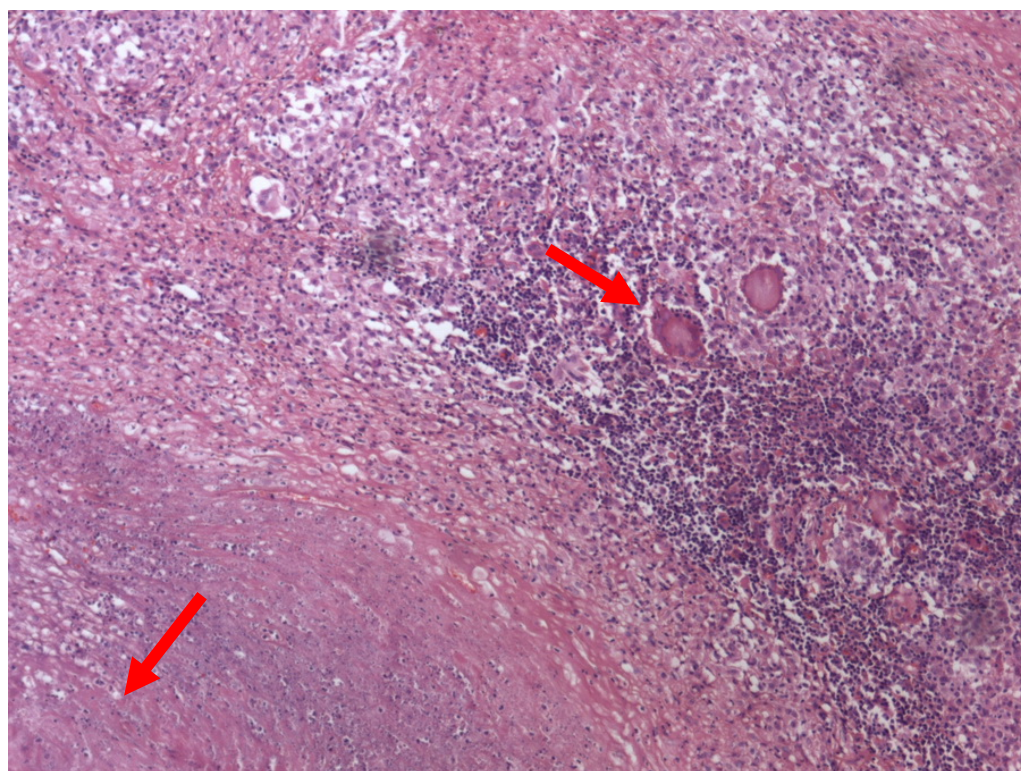


Slika 15. Isečak cervikalnog limfnog čvora

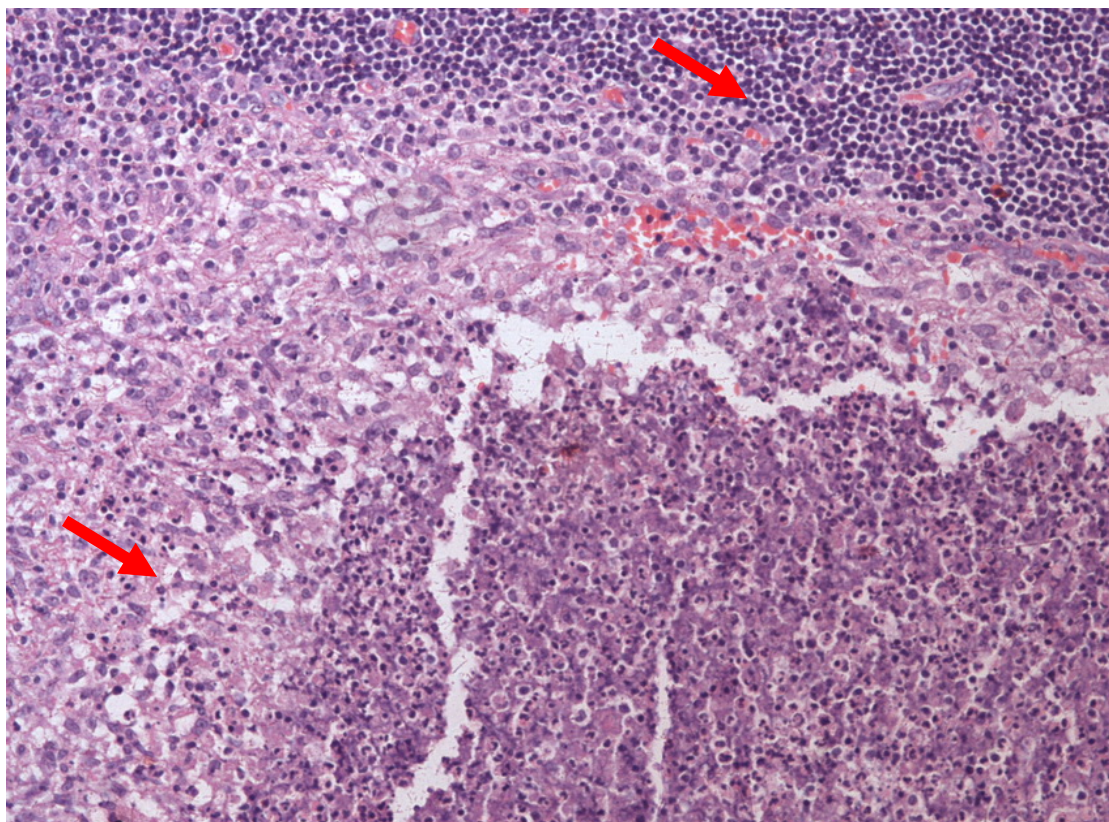
8.2. Patohistološka dijagnostika



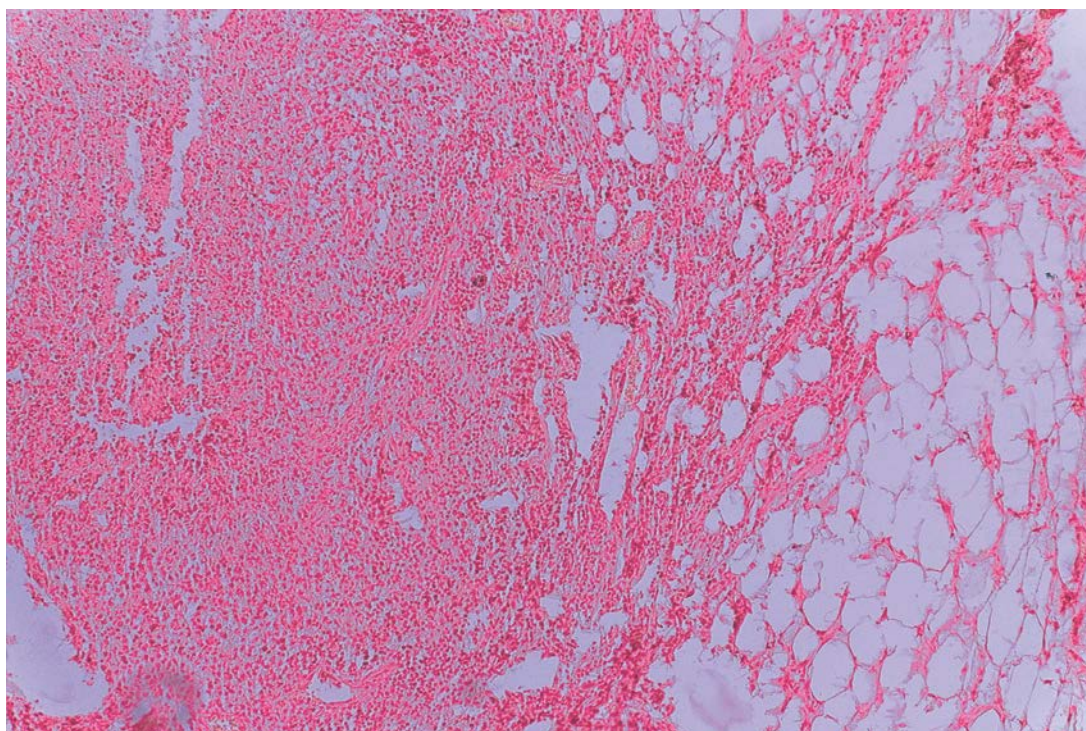
Slika 16. Granulomatozni limfadenitis. HE, obj. x 10.



Slika. 17. Granulomatozni limfadenitis. Multinuklearne džinovske ćelije i nekroza. HE, obj x 20.

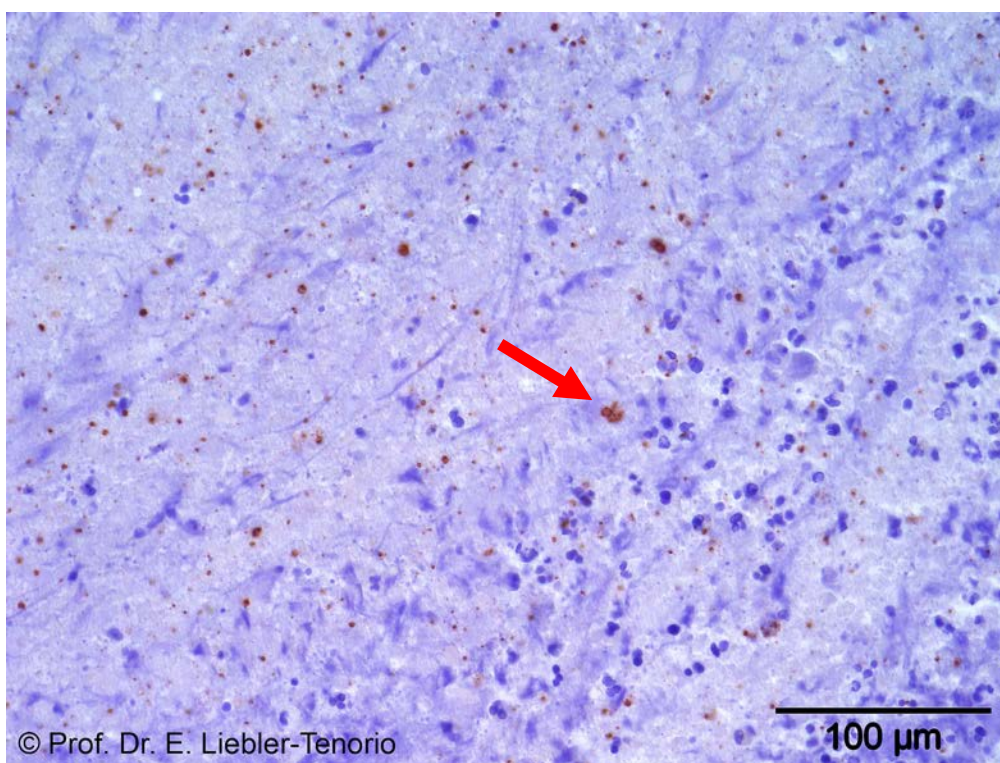
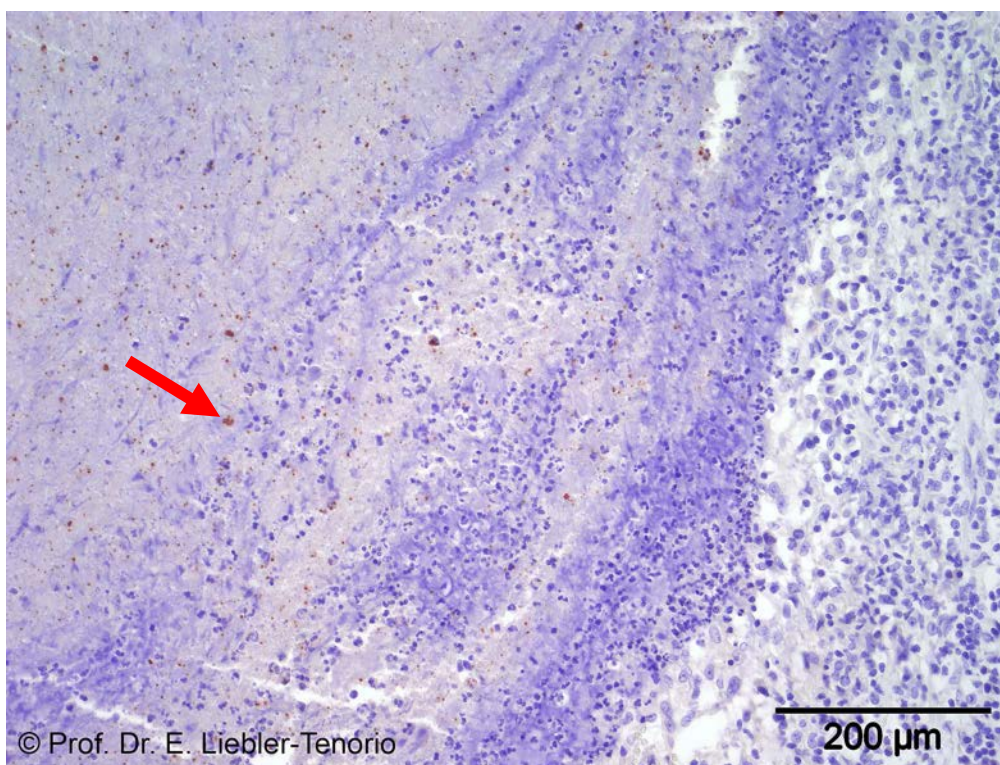


Slika 18. Granulomatozni limfadenitis. Makrofagi i supuracija. HE, obj.x20.



Slika 19. Širenje zapaljenjskog procesa u perinodalno masno tkivo (HE).

8.3. Imunohistohemijska dijagnostika



Slike 20 i 21. Pozitivna imunohistohemijska reakcija na *F. tularensis* (crvena boja specifično obeleženih bakterija je zbog hromogena AEC)

BIOGRAFIJA

Marina Đorđević je rođena u Nišu 9.3.1974. gde je završila osnovnu školu kao i gimnaziju „Svetozar Marković” kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”.

Medicinski fakultet je upisala u Nišu 1992. i završila u roku 1999, sa prosečnom ocenom 9,46 i ocenom iz Infektivnih bolesti 10. Diplomski rad „Helmintjaze“ odbranila je sa ocenom 10 na predmetu Infektivne bolesti. Tokom fakulteta je bila autor više studentskih radova, obavila letnju praksu u Španiji. Nakon završenog fakulteta bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju. Od 2000. god. je u stalnom radnom odnosu na Klinici za zarazne bolesti, Kliničkog centra Niš, primljena od strane Ministarstva zdravlja, u okviru akcije zapošljavanja mladih talenata. Tokom specijalizacije, kao stipendista švajcarsko-američkog udruženja za infektivne bolesti je provela godinu dana na stručnom usavršavanju u Ženevi, 2004/2005, gde je radila kao istraživač na više projekata. Kao nagrađeni autor više poster prezentacija iz oblasti tularemije, boravila je na Konferenciji iz oblasti tularemije u Engleskoj 2003.god, kao i na Američkom kongresu antimikrobne terapije 2005. Specijalistički ispit iz Infektologije položila je na Medicinskom fakultetu u Nišu 2007. Magistarsku tezu iz oblasti Infektologije pod nazivom „Kliničko-epidemiološke karakteristike i značaj imunodijagnostičkih testova kod tularemije“ pod mentorstvom prof.dr V.Kostić uspešno je odbranila 2008. godine.

Autor je i koautor u preko 40 stručnih radova, objavljenim u domaćim i stranim časopisima i prezentovanim na domaćim i međunarodnim skupovima.

Tečno govori engleski i francuski jezik.

Radno iskustvo

Od 2000. god. je u stalnom radnom odnosu na Klinici za zarazne bolesti, Kliničkog centra Niš. Od 2007. god. radi kao specijalista infektolog. i stručni saradnik-volonter na predmetu Infektivne bolesti. Godine 2012. izabrana je za kliničkog asistenta na predmetu Infektologija.

Rukovođenje i/ili učešće u naučnim projektima

2004/2005, učestvovala je u više naučnih projekata na Univerzitetској bolnici u Ženevi, pod mentorstvom prof.dr Jorge Garbino:

- Azithromycin in prevention of pneumonia in ventilated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*,
- Micafungin versus Caspofungin in the treatment of invasive candidiasis or candidemia, Swiss candidemia surveillance in University Hospital of Geneva,
- Posaconazole in the treatment of invasive mycosis,
- Ceftobiprole versus Linezolid + Ceftazidime in the treatment of nosocomial pneumonia,
- Ceftobiprole versus Vancomycin in the treatment of complicated infections of the skin and soft tissue.

Spisak objavljenih radova

Radovi u časopisima međunarodnog značaja (M23, M24, M21)

1. **Djordjevic-Spasic M**, Potkonjak A, Kostic V, Lako B, Spasic Z. Oropharyngeal tularemia in father and son after consumption of under-cooked rabbit meat. *Scand J Infect Dis*. 2011; 43(11-12): 977-81. (M23, IF=1,722, Sci, Scie)
2. **Djordjevic-Spasic M**, Potkonjak A, Nozic D, Pavlovic M, Canak G, Doder R, Stevancevic O, Lako B. The first case report of serologically confirmed cat scratch disease of a boy in Serbia. *Healthmed* 2011; 5(6): 2121-25. (M23, IF=0,435, Scie)
3. Uçkay I, Ferry T, Stern R, Ambrosioni J, Gamulin A, Andrey D, **Djordjevic M**, Bernard L, Hoffmeyer P, Lew D. Use of serum antistreptolysin O titers in the microbial diagnosis of orthopedic infections. *Int J Infect Dis* 2009;13:421-4. (M23, IF=2,167, Scie)
4. Vauthey L, Uçkay I, Abrassart S, Bernard L, Assal M, Ferry T, **Djordjevic M**, Roussos C, Vaudaux P. Vancomycin-induced DRESS syndrome in a female patient. *Pharmacology* 2008;82(2):138-41. (M23, IF=1,824, Sci, Scie)
5. Uçkay I, Rohner P, Bolivar I, Ninet B, **Djordjevic M**, Nobre V, Garzoni C, Schrenzel J. *Streptococcus sinensis* Endocarditis outside Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2007;13(8):1250-2. (M21, IF=5,775, Sci, Scie)

Radovi u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51)

6. Vrbíć M, Dinić M, Jovanović M, Ranković A, Popović-Dragonjić L, **Djordjević-Spasić M**. *Listeria monocytogenes* meningitis in an immunocompetent 18-year-old patient as a possible diagnostic and therapeutical problem. *Vojnosanit Pregl*. 2013; 70(10): 976-8.
7. Kostić V, **Đorđević M**, Popović L, Kostić M, Đorđević J, Govedarović N. Efficacy of antiviral therapy in patients with hemophilia and hepatitis C virus infection. *Med Pregl* 2009;62(3-4):129-32. (M51, Medline)

Radovi objavljeni u naučnim časopisima nacionalnog značaja (M50)

8. **Đorđević M**, Krstić M, Lako B, Petrović M, Đukić B. Prikaz retke forme bruceloze. *Acta Medica Medianae* 2004; 43(2): 69-72. (M52)
9. Kostić V, **Đorđević M**, Popović L. Hronična bubrežna insuficijencija udružena sa virusima hepatitisa B i C kao terapijski problem. *Acta medica medianae* 2008; 47(3): 5-7. (M52)
10. Kostić V, Trifunović G, **Đorđević M**, Jovanović B, Đorđević J, Radović J. Hepatitis toxica-prikaz bolesnika. *Acta Medica Medianae* 2009; 48(2):49-51.(M52)

Zbornici međunarodnih naučnih skupova (M30)

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M34) i celini (M33)

-
11. **Dorđević M**, Krstić M, Mitrović G. Brucellosis. Case report. Proceedings of the Fifth Epizootiological Days with International Participation; 2003 April 2-5; Subotica, Serbia and Montenegro. Abstract book, p.208-13. (M33)
 12. Petrović M, **Dorđević M**. Epizootiological- epidemiological manifestations of brucellosis in Nis's and the South-Moravian Region from 1991 to 2002. Proceedings of the Fifth Epizootiological Days with International Participation; 2003 April 2-5; Subotica, Serbia and Montenegro. Abstract book, p.202-7. (M33)
 13. **Dorđević M**, Krstić M. Osteoarticular complication of brucellosis. Case report. Proceedings of 2nd Macedonian Congress of Infectious Diseases with International Participation; 2003 May 20-24; Ohrid, Republic of Macedonia. Abstract book, p.45.(M34)
 14. **Djordjevic M**, Lako B, Ristanovic E. The Significance of serological tests in diagnosis and following up of neurobrucellosis. Proceedings of Brucellosis 2003 International Research Conference; 2003 Sept; Pamplona, Spain. Abstract book, p. 104. (M34)
 15. **Djordjevic M**, Lako B, Djukic B. Chronic complications of brucellosis. Proceedings of Brucellosis 2003. International Research Conference; 2003 Sept; Pamplona, Spain. Abstract book, p.105. (M34)
 16. **Djordjevic M**, Kostic V, Lako B, Ristanovic E. Epidemiological situation and clinical manifestations of human tularemia in the southeastern Serbia in 2003. Proceedings of the Fourth International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. Abstract book, p.P40. (M34)
 17. **Djordjevic M**, Lako B, Ristanovic E. Diagnostic dilemma of tularemia. Case report. Proceedings of the Fourth International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. Abstract book, p.P54. (M34)
 18. **Djordjevic M**, Krstic M. Ulceroglandular form of tularemia. Case report. Proceedings of the Fourth International Conference on Tularemia; 2003 Sept 15-18; Bath, UK. Abstract book, p.P 36.(M34)
 19. **Djordjevic M**, Rankovic Z. Therapy problems in a patient with tularemia and IgA nephropathy. Proceedings of 5th European Congress of Chemotherapy and Infection; 2003 Oct 17-20; Rhodes, Greece. Abstract book, p.87. (M34)
 20. **Djordjevic M**, Garbino J, Uckay I, Garzoni C, Kostic V, Lako B, Tasic D. An abrupt onset of tularemia among children from Kosovo. Proceedings of the 15th ECCMID; 2005 Apr 2-4; Copenhagen, Denmark. Clin Microb Inf 2005; 11 Suppl 2. p 399. (M34)
 21. **Djordjevic M**, Uckay I, Garzoni C, Lew D, Garbino J. Pulmonary infection by Nocardia abscessus. Proceedings of the 3rd International conference on the biology of Nocardia; 2005 July 05-07; Lyon, France. (M34)
 22. **Djordjevic M**, Garbino J, Uckay I, Kostic V, Tasic D. Pathohistological examinations of lymph nodes tularemia caused by Francisella tularensis biovar palearctica. Proceedings of the 45th ICAAC Annual Meeting; 2005 Dec 16-19; Washington DC, USA. Abstract book. p 138.(M34)
 23. Uckay I, Garbino J, Matulionyte R, **Djordjevic M**, Rohner P, Khachatourian G, Pittet D. Postoperative infection of a prosthetic aortic valve by Mycobacterium chelonae.

Proceedings of the 45th ICAAC Annual Meeting; 2005 Dec 16-19; Washington DC, USA. Abstract book. p 644.(M34)

24. **Djordjevic M**, Uçkay I, Garzoni C, Rohner P, Garbino J. Three cases of pituitary abscesses. Clinical features, treatment and review. Proceedings of the 12th ISID; 2006 June 16-19; Lisbon, Portugal. Int J Infect Dis 2006; 10 Suppl 1. p.S169. (M34)
25. **Djordjevic M**, Uçkay I. Recurrent Skin Infection of Imipenem-resistant *Nocardia brasiliensis* in a immuno-compromized host. Proceedings of the 12th ISID; 2006 June 16-19; Lisbon, Portugal. Int J Infect Dis 2006; 10 Suppl. p.S169. (M34)
26. Uçkay I, **Djordjevic M**, Garbino J. Successful liver transplantation in a patient despite serologic evidence of acute toxoplasmosis. Proceedings of the 12th ISID; 2006 June 16-19; Lisbon, Portugal. Int J Infect Dis 2006; 10 Suppl 1. p.S287. (M34)
27. Uçkay I, Hugonnet T, **Djordjevic M**, Bessire N, Sax H, Garzoni C et al. Age limits do not replace serological tests for immune status against measles. Proceedings of the 12th ISID; 2006 June 16-19; Lisbon, Portugal. Int J Infect Dis 2006; 10 Suppl 1. p.S53. (M34)
28. Velickovic Z, Kostic V, Spasic M, Kocic B, **Djordjevic M**. Clinical and laboratory characteristics of tularemia. Proceedings of the 3rd Macedonian Congress of Preventive Medicine-with International Participation; 2006 Oct 04-07; Ohrid, Republic of Macedonia. Abstract book, p.84.(M34)
29. Kostić V, Krstić M, **Đorđević M**, Veličković Z. Tularemia as an actual problem. Proceedings of the 3rd Congress of Infectologists of Bosnia and Herzegovina with International Participation; 2006 Nov 02-05; Banja Luka, Bosna i Hercegovina. Abstract book, p 5. (M34)
30. **Đorđević M**, Govedarović N, Đorđević I, Ranković Z. Produženo febrilno stanje izazvano gljivičnim apscesima u jetri kod bolesnika sa akutnom mijeloidnom leukemijom - prikaz bolesnika. Proceedings of the First Serbian Congress of Infectology with International Participation; 2007 Oct 04-07; Tara, Srbija. Abstract book, p 14. (M34).
31. Kostić V, **Đorđević M**, Popović L, Kostić E, Đorđević J. Assesment of chronic hepatitis C therapy efficacy in hemophilic and non-hemophilic patients. Proceedings of VIII congress of gastroenterology and hepatology with international participation; 2008 Sept 24-27; Ohrid. Abstract book, p.71. (M34)
32. **Đorđević-Spasić M**, Kostić V, Krstić M, Lako B. Therapy approach and problems in treatment of tularemic patients in Serbia. Proceedings of the Sixth International Conference on Tularemia; 2009 Sept 13-16; Berlin, Germany. Poster presentation.(M34)

Predavanja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M32)

33. Kostić V, **Đorđević M**, Jovanović M, Kostić S. Characteristics of hepatitis C viral infection at patients with chronic renal failure. Proceedings of 36th Scientific Congress Days of Preventive Medicine with International Participation; 2002 Sept 24-26; Nis, Serbia and Montenegro. Abstract book, p.117. (M32)
34. **Đorđević M**, Đorđević I, Kostić V, Jovanović B. Ehinokokoza nadlaktice sa komplikacijama u vidu fistulizacije, frakture, sekundarne infekcije i refistulizacije. Proceedings of the First Serbian Congress of Infectology with International Participation; 2007 Oct 04-07; Tara, Srbija. Abstract book, p.59. (M32)



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Имунодијагностичке и молекуларне методе

у процени ефикасности терапије оболелих од туларемије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 17.03.2014.

Аутор дисертације: Марина М. Ђорђевић - Спасић

Потпис докторанда:

Марина Ђорђевић - Спасић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Марина М. Ђорђевић-Спасић

Студијски програм: Медицина

Наслов рада: Имунодијагностичке и молекуларне методе
у процени ефикасности терапије оболелих од туларемије

Ментор: проф. др Велимир Т. Костић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 17.03.2014.

Аутор дисертације: Марина М. Ђорђевић - Спасић

Потпис докторанда:

Марина Ђорђевић - Спасић



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Имунодијагностичке и молекуларне методе

у процени ефикасности терапије оболелих од туларемије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 17.03.2014.

Аутор дисертације: Марина М. Ђорђевић - Спасић

Потпис докторанда:

Марина Ђорђевић - Спасић