

# KOLERA

## Mikrobiyolojik Tanı

Zeynep ŞENSES  
Yrd. Doç. Dr. Dz. Tbp. Bnb.  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.

# Kolerada kesin tanı bakteriyolojiktir

**Epidemi**

**ilk olgu tanısı**



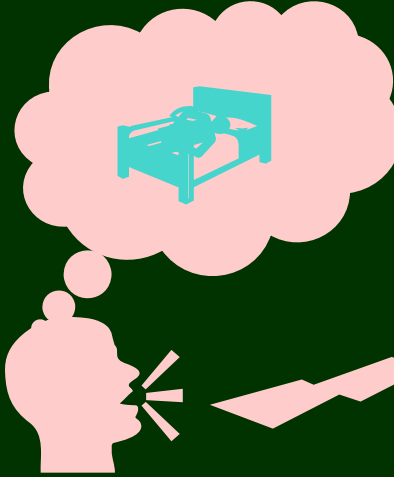
**-**  
**kolera**



**Ülke / Dünya  
tedirginlik**



**Sosyal  
Ekonomik  
Idari  
sakıncalar**



**+**

**kolera değil**



**Epidemi  
tanımı  
önlemler  
gecikir**





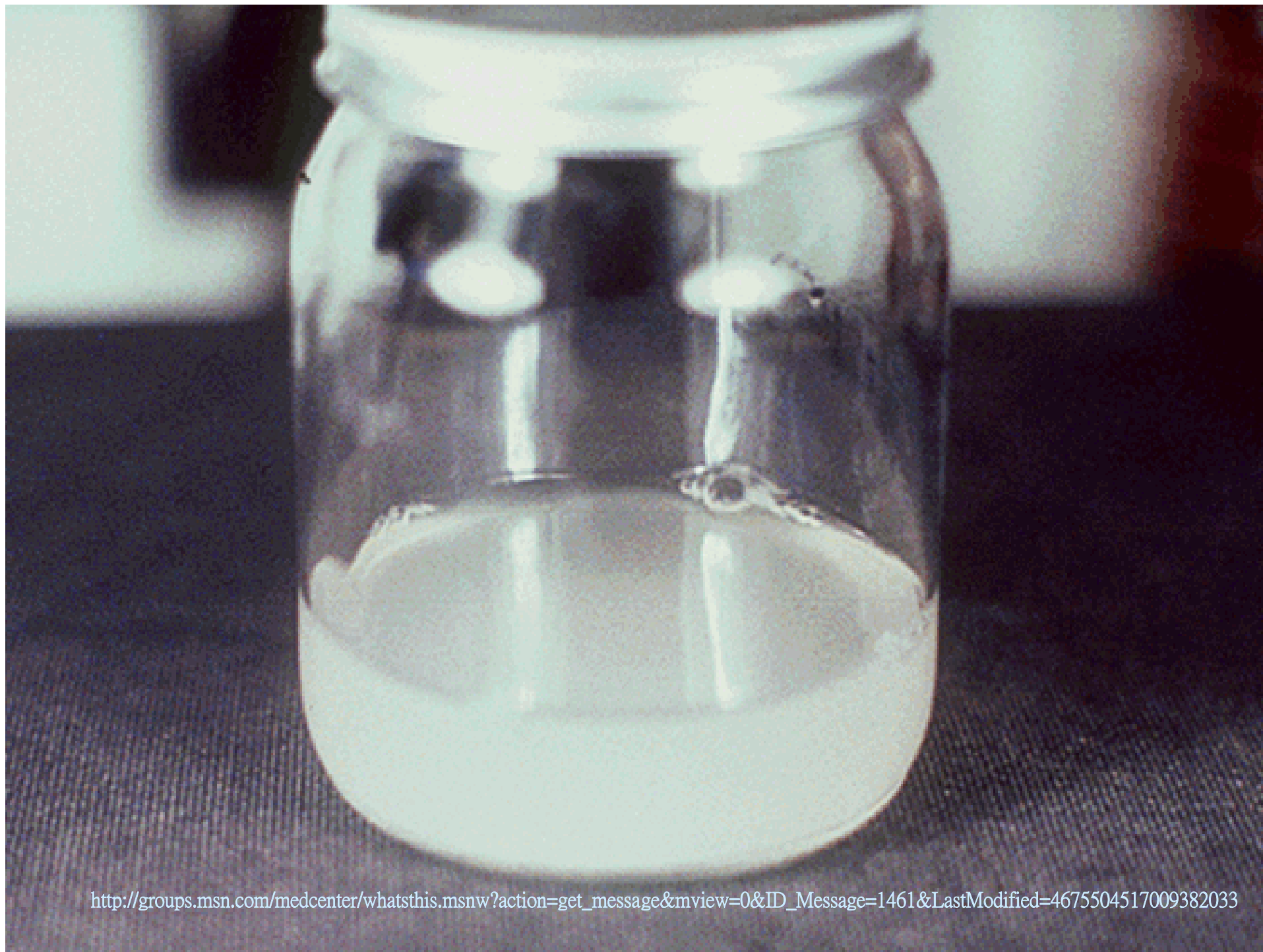
# **Kolera Epidemisinde Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü**

**Etkenin ilk izolasyon / identifikasyonu**

**ADT paternlerinin belirlenmesi**

**ADT paternlerinin deęişimlerin izlenmesi**

**Epideminin süresi/coğrafik yayılımının belirlenmesi**



[http://groups.msn.com/medcenter/whatsthis.msnw?action=get\\_message&mview=0&ID\\_Message=1461&LastModified=4675504517009382033](http://groups.msn.com/medcenter/whatsthis.msnw?action=get_message&mview=0&ID_Message=1461&LastModified=4675504517009382033)

# *Vibrionaceae* *ailesi*

- *Vibrio* (>35 tür)
- *Aeromonas* (4 tür)
- *Plesiomonas* (1 tür)
- *Photobacterium* (3 tür)

The background of the slide is a dark teal color with a pattern of light teal, irregular, wavy lines that resemble topographic contour lines. On the far left, there is a vertical strip of a different map, showing a more detailed topographic view with various shades of green, brown, and white, including what appears to be a road network and a river.

# ÖRNEKLEME

# Örnek



Dışkı



Rektal sürüntü



Kusmuk

# Örneklerin Toplanması

## Dışkı örneği;

- hastalığın ilk 24 saatinde, atb verilmeden alınmalı
- alınamıyorsa rektumdan sonda ile alınmalı
- 1 – 2 gr kadar alınmalı
- idrar ile kontamine edilmemeli
- sürgü / oturaktan alınmamalı

## Rektal sürüntü;

- hastalığın akut döneminde anlamlı olabilir
- tedavi gören / taşıyıcı olan hastalarda yetersiz

**! Farklı günlerde, birden fazla örnek alınmalı**



# Örneklerin Taşınması

- ❖ Mümkünse hemen izolasyon by'ne ekilmeli

- ❖ Alkali ortamda taşınmalı

[APS, Cary-Blair, tripticase-taurocholate-tellurit (Venkatraman-Ramakrishnan)]

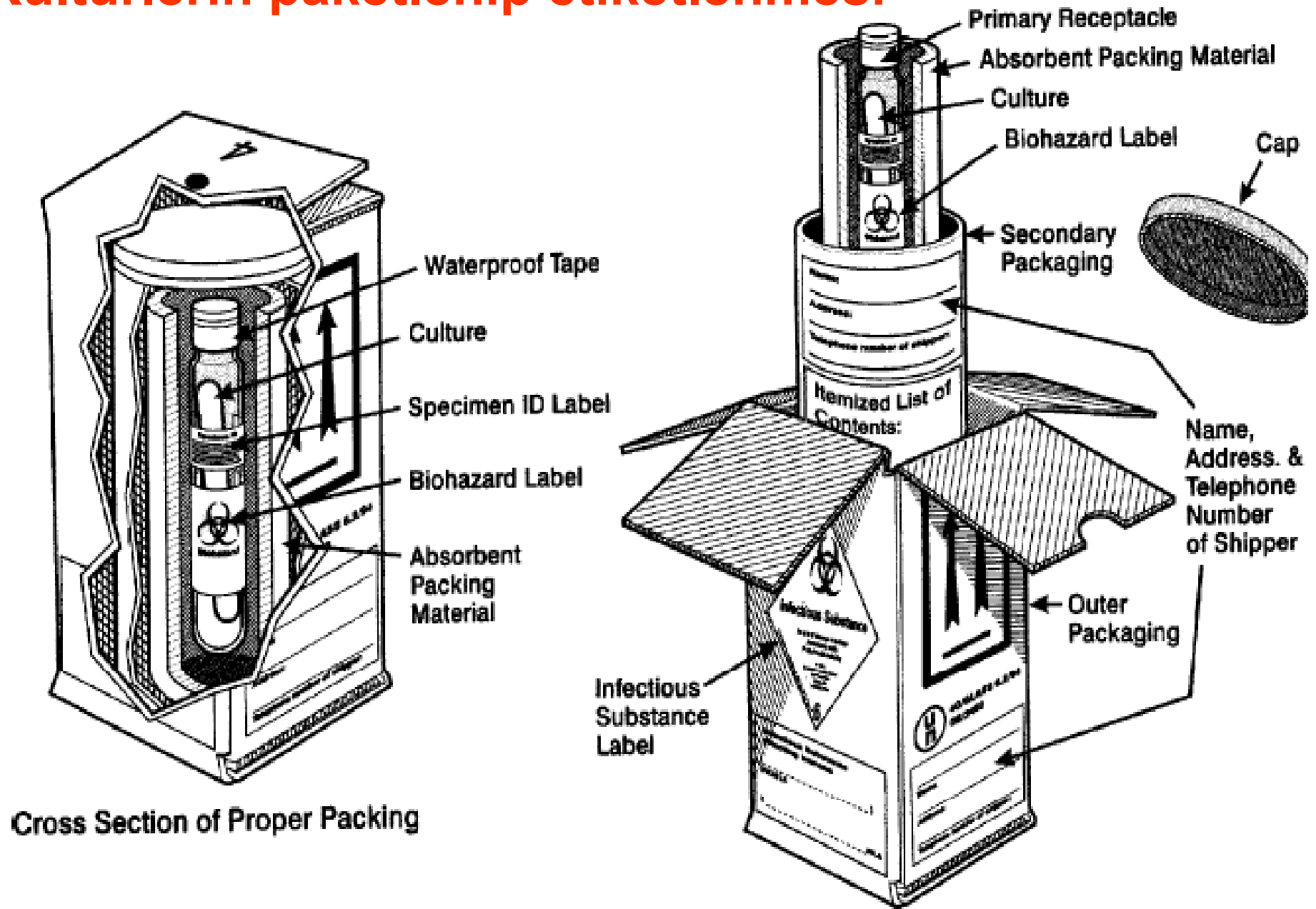
- ❖ Kuruması önlenmeli

- ❖ Steril kurutma / filtre kağıdı, gazlı beze emdirilip sızdırmaz plastik torbalarda taşınmalı (5 hf canlı)

- ❖ Örnek etiketi (numara, hasta adı, tarih) hazırlanmalı



# Kültürlerin paketlenip etiketlenmesi

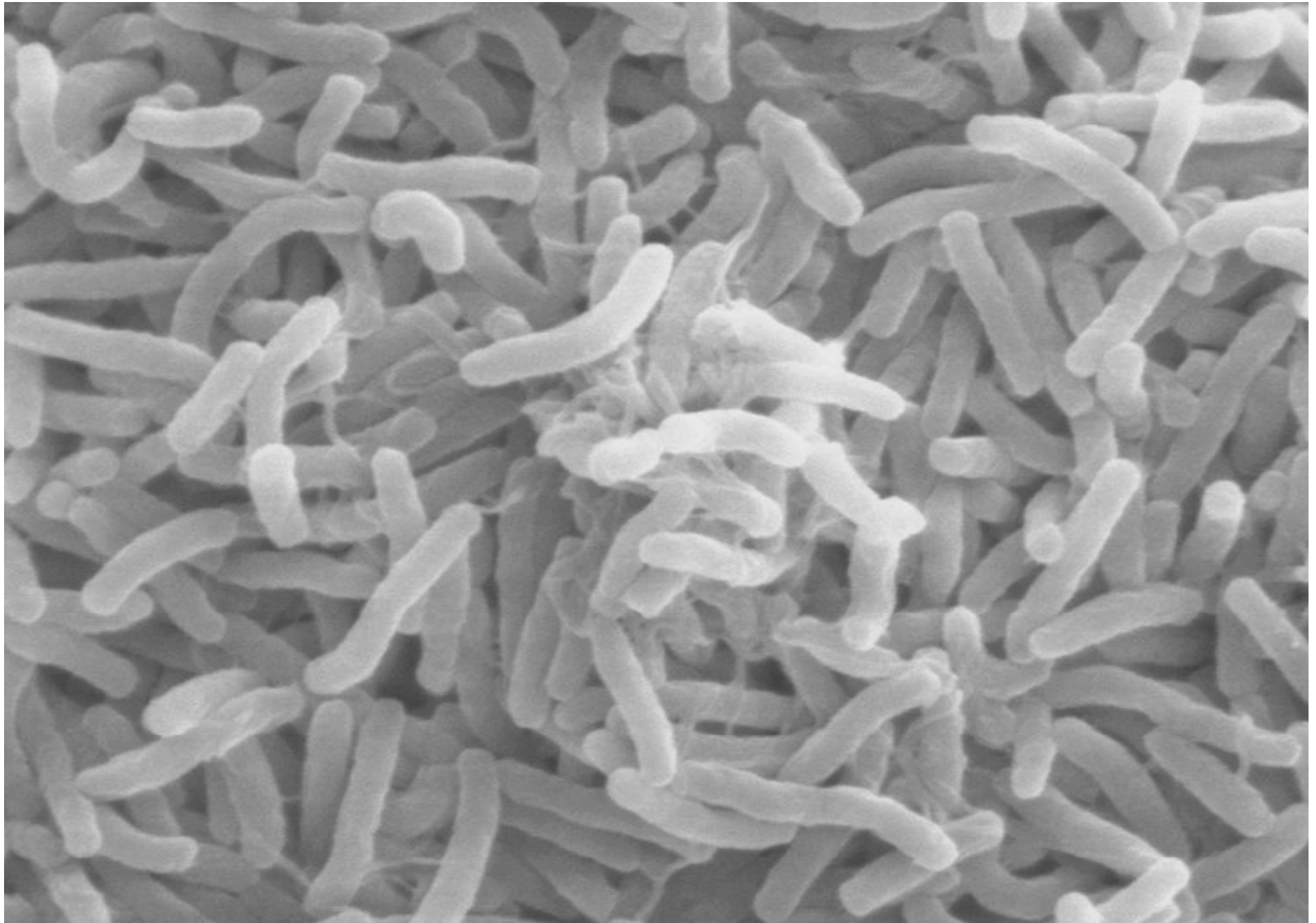


# Örneğin Saklanması

- İdeal olan örneğin 1 – 2 saat içinde pasajlanmasıdır
- Hemen pasajlanmayacaksa  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır
- Örnek taşıma besiyerine alınmışsa oda ısısında taşınabilir

- 
- ✿ Eğri bir basil (virgöl) / (tam kıvrık, düz)
  - ✿ Hilal / S / spiral dizilebilir, kısa zincir yapabilirler
  - ✿ Uzun süreli inkübasyon → Sferoplast
  - ✿ İnce, 1–4 X 0.3–0.6  $\mu\text{m}$
  - ✿ Bir uçta tek flagellası var (çılgın hareket, dönme)
  - ✿ KAM: sağa-sola-yukarı, zikzak (sinek uçuşması)
  - ✿ Sporsuz ve kapsülsüz

[http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Vibrio\\_cholerae.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Vibrio_cholerae.jpg)



[http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:Cholera\\_bacteria\\_SEM.jpg](http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:Cholera_bacteria_SEM.jpg)

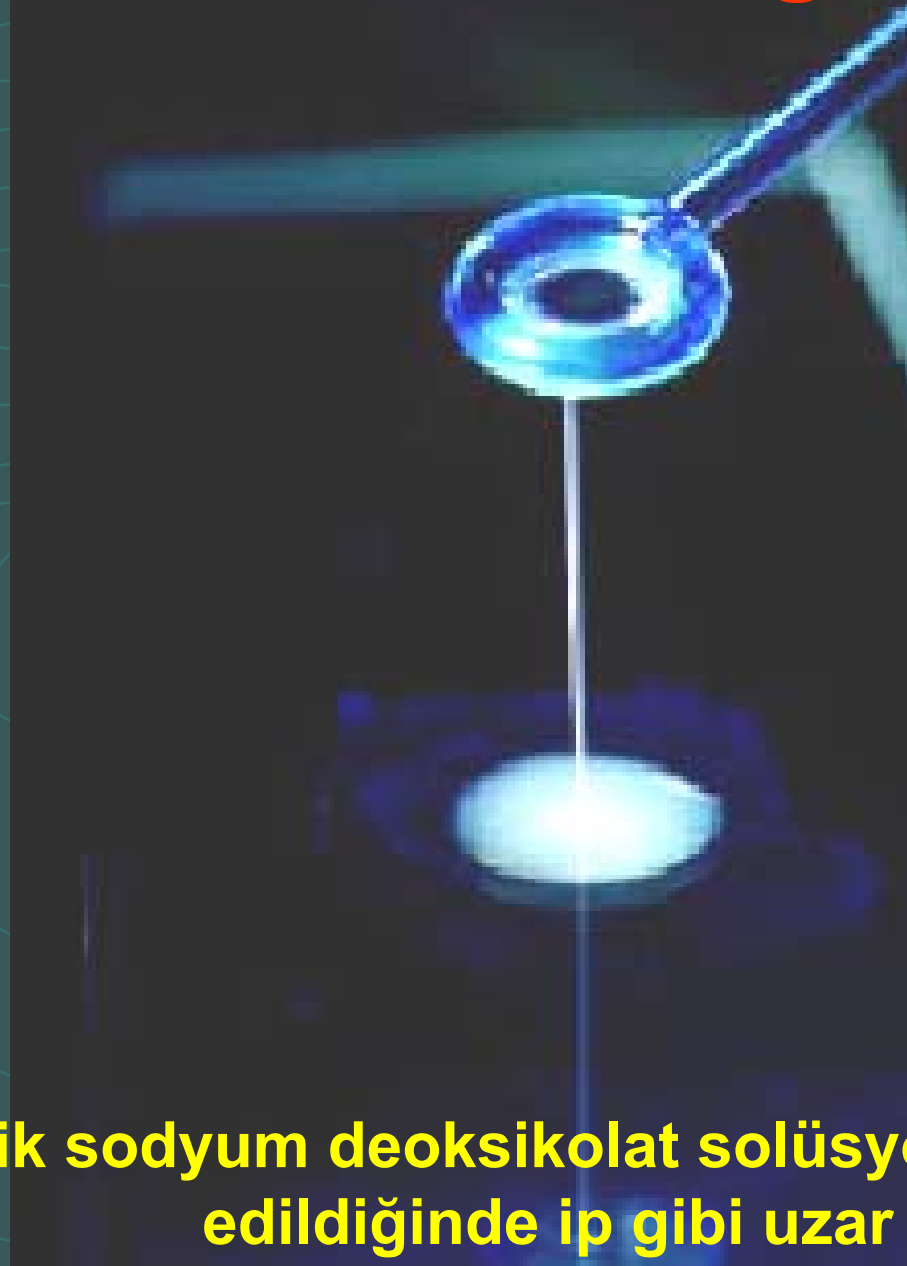
# Üreme Özellikleri

- **Aerop / fakültatif anaerop**
- **Üreme ısısı 22 – 40°C (opt.: 37°C)**
- **Oksidatif / fermantatif metabolizma**
- **pH: 6.8 – 10.2 (opt: 7.4 – 9.6)'da ürer**
- **Üreme ortamında % 2 – 3 NaCl ister**
- **String testi pozitifdir**

# İpliklenme (String) Testi

- Selektif olmayan besiyerinde üretilmiş bakteri kolonisi %0.5'lik Sodium deoxycholate solüsyonu içinde süspanse edildiğinde bakteri kolonisi iplik gibi uzar
- *V.cholerae* pozitif  
*Aeromonas* türleri negatif  
Diğer *Vibrio* türleri pozitif / zayıf +
- Pozitif kontrol: *V.cholerae* O1
- Negatif kontrol: *E.coli*

# İpliklenme String Testi



**Koloni 0.5'lik sodyum deoksikolat solüsyonunda süspanse edildiğinde ip gibi uzar**



Oksidaz +

*N,N,N,N*-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride + Distile su



## **Aeromonas ve diğer *Vibrio* türlerinden farkı**

- **Arginin dihidrolaz negatiftir**

## ***Enterobacteriaceae* bakterilerinden farkı**

- **Asitlere duyarlı**
- **Safralı, alkali, %6 NaCl'de ürer**
- **Oksidaz (+)**

## **Nonfermentatif bakterilerden farkı**

- **Glikozdan asit oluşturur**

# Serolojik Özellikleri

- O somatik antijenleri ile serogruplama yapılır
- O1 ve O139 toksijenik serogruplardır  
(Epidemik kolera, Pandemik kolera)
- O2–O138 toksijenik olmayan serogruplardır  
(Sporadik ishal)

## • *Vibrio cholerae* O1 biyotipleri

*Vibrio cholerae* biyotip cholerae (klasik kolera etkeni)

*Vibrio cholerae* biyotip El Tor

# Duyarlılık

- ❖ Spor yapmaz
- ❖ Isı / dezenfektan / asit / kuruluğa çok duyarlıdır
- ❖ 55°C'de 15 dak, % 0.5'lik fenolde 1-2 dak ölür
- ❖ Lamda kuru halde 3 saat canlı kalabilir
- ❖ Dışkıda normal ısıda / asit ortamda 1-2 gün canlı
- ❖ Soğuğa oldukça dirençlidir, liyofilize edilebilir







[http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC420/lecture\\_notes/vibrio/em.html](http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC420/lecture_notes/vibrio/em.html)



# Tanımlama



# Gerekli Malzemeler

## A. Besiyeri

Taşıma Besiyeri  
Cary Blair

Zenginleştirme Besiyeri  
Alkali peptonlu su (APS)

Primer İnokülasyon Besiyeri  
MacConkey agar  
TCBS  
BSA  
Mansur besiyeri  
Alkiş besiyeri  
Özsan besiyeri

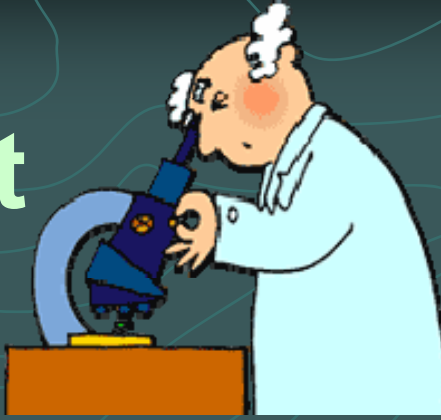
## B. Ayıraçlar

Oksidaz  
*V.cholerae* O1, O139 antiserumu



**Direkt**

**Mikroskobi**



**Örnek direkt incelenebilir**

**APS'da 37°C'de 4-6 saat inkübe edilmiş  
örnekler incelenebilir**

***V.cholerae*'nin tipik hareketi ve bu hareketi  
antiserum ile kaybetmesi mikroskopta  
gözlenebilir**

# Kültür

## Primer inokülasyon

Safra, safra tuzları, tellürite dirençli

• TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose)

• TTGA (Tellurite-Taurocholate-Gelatin Agar)

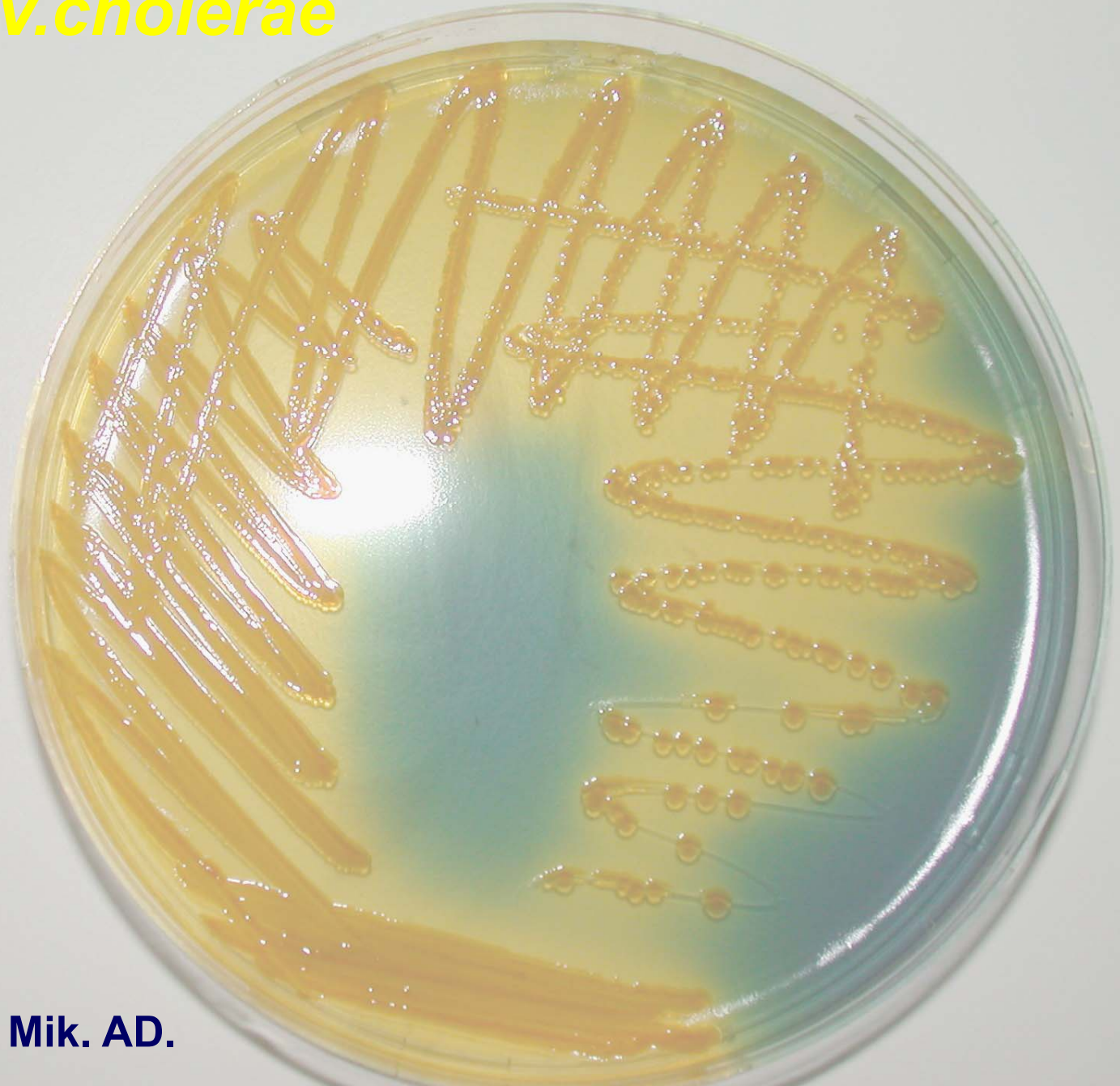
• BSA (Bile Salt Agar)

• Mansur besiyeri

• Alkış besiyeri

• Özsan besiyeri

# TCBS'de *V.cholerae*



GATA Mik. ve Kl. Mik. AD.

# Özel Olmayan Besiyerleri

**Kanlı Agar**

**MacConkey agar**

**Çikolatamsı agar**

**Mueller Hington agar**

**EMB agar**

**SS agar**

**Simon sitrat**

**KIA**

**TSI**





**EMB**



**Mueller  
Hinton**



**GATA Mik. ve Kl. Mik. AD.**



**Kanlı  
agar**



# Kültürlerin Değerlendirilmesi

TCBS → *V.cholerae* düzgün, sarı

*V.parahaemolyticus* mavi-yeşil, mukoid

*Proteus spp.*, *Enterococcus spp.* küçük, sarı

*Pseudomonas* ve *Aeromonas* mavi

BSA → küçük, yarısaydam, kabarık

TTGA → ortası siyah, çevresi bulutlu

Alkış besiyeri (kırmızı) → sarı

**TCBS agar**  
**sükroz negatif koloniler**

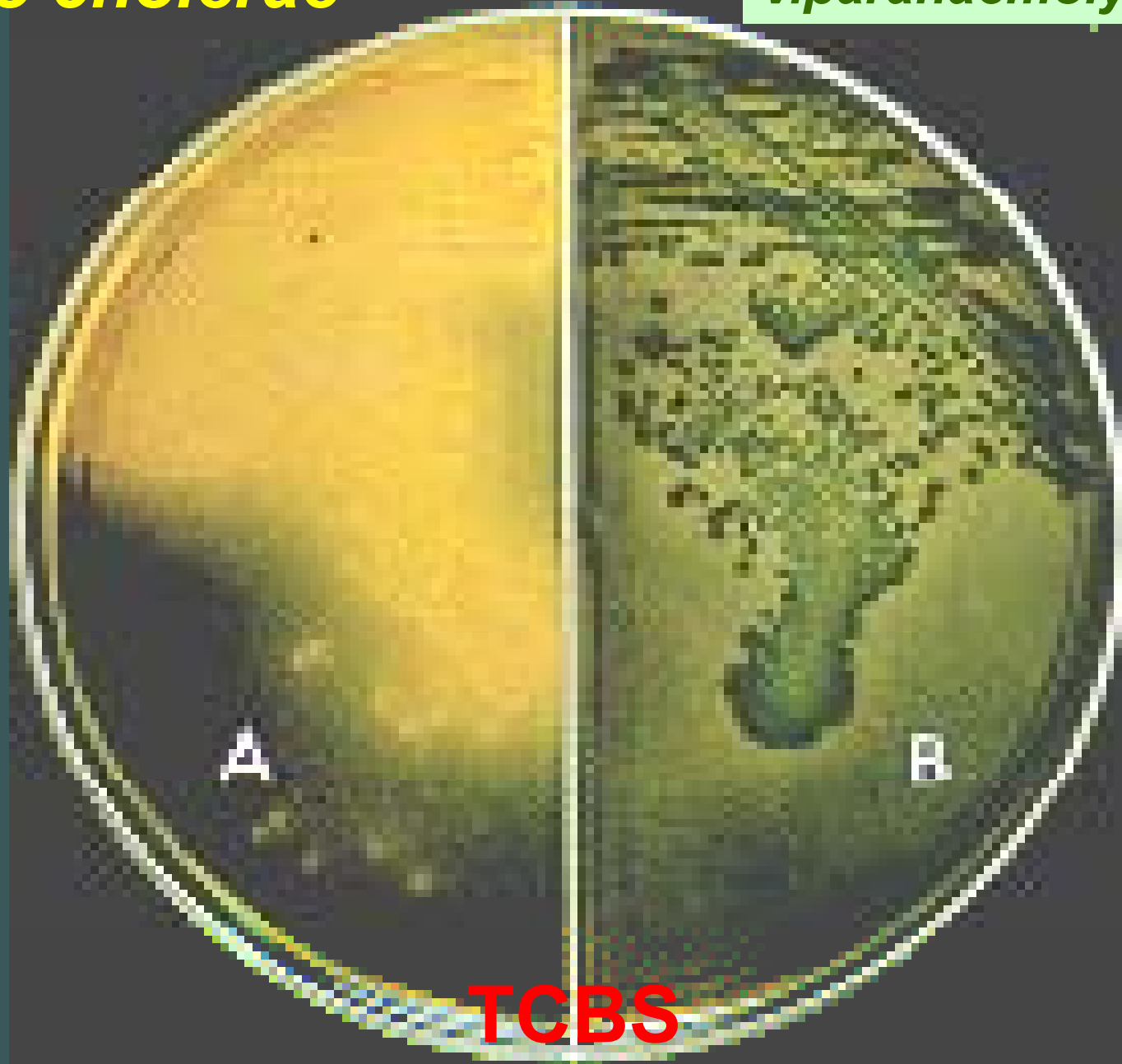






***Vibrio cholerae***

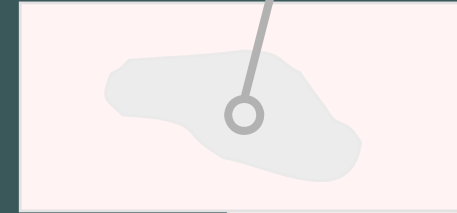
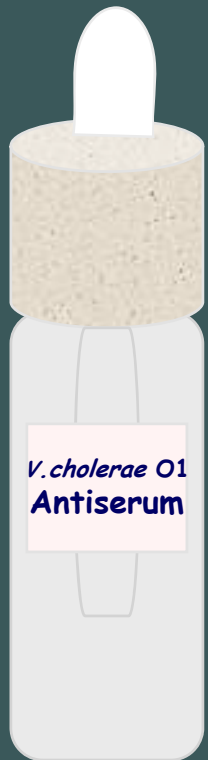
***V. parahaemolyticus***



**TCBS**

# Serolojik İdentifikasyon

- *V.cholerae* O1 ve O139 antiserumları kullanılır
- Genel üretim besiyerinde üretilmiş şüpheli bakteri kolonileri antiserumlarla lam üzerinde karşılaştırılır



# Serolojik İdentifikasyon

- Önce O1, aglütinasyon vermez ise O139 antiserumu ile karşılaştırılır
- Ogawa ve Inaba antiserumları da identifikasyonda yardımcıdır, her ikisi ile aglütinasyon veriyorsa Hikojima serotipi söz konusudur
- NAG Vibrio'ları (Non Aglütinabl)

# ***V.cholerae* O1 Serogrubunun Serotipleri**

| <b>Serotip</b>         | <b>Taşıdıkları O Ag</b> |
|------------------------|-------------------------|
| <b><i>Ogawa</i></b>    | <b>A, B</b>             |
| <b><i>İnaba</i></b>    | <b>A, C</b>             |
| <b><i>Hikojima</i></b> | <b>A,B,C</b>            |



# Biyotiplerin Belirlenmesi

| Test                                  | Klasik biyotip | Biyotip El Tor |
|---------------------------------------|----------------|----------------|
| String testi                          | +              | +              |
| Kanatlı eritrositlerini aglütine etme | -              | +              |
| Voges-Proskauer testi                 | -              | +              |
| CAMP testi                            | -              | +              |
| Polimiksin B (50 Ü/disk) duyarlılığı  | +              | -              |
| Faj IV ile lizis                      | +              | -              |
| Faj V ile lizis                       | -              | +              |



# ***Vibrio cholerae* Mikrobiyolojik Tanısında İzlenecek Yol**



# Antibiyotik Duyarlılık Testi

O1/O139 duyarlılık durumunu belirlemek için yapılır

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI )

Disk difüzyon yöntemi

• Mueller-Hinton agarda

• Ampisilin

• Trimetoprim-sulfametoksazol

• Kloramfenikol

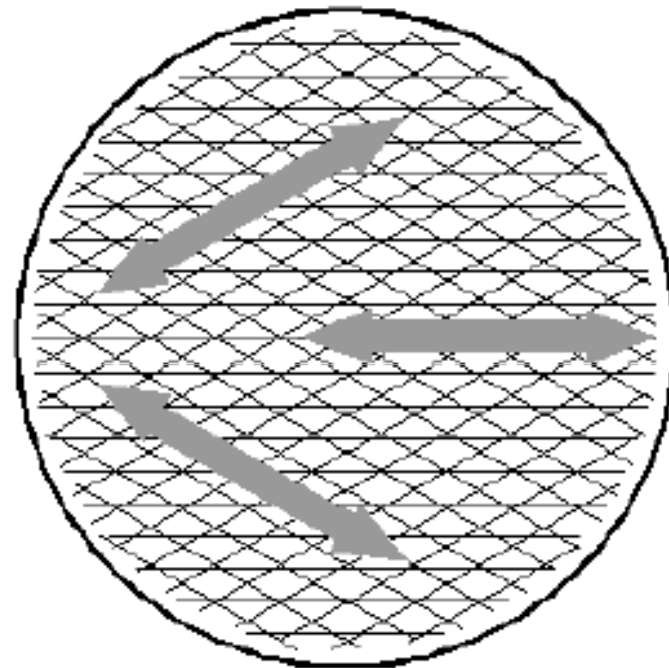
• Tetrasiklin

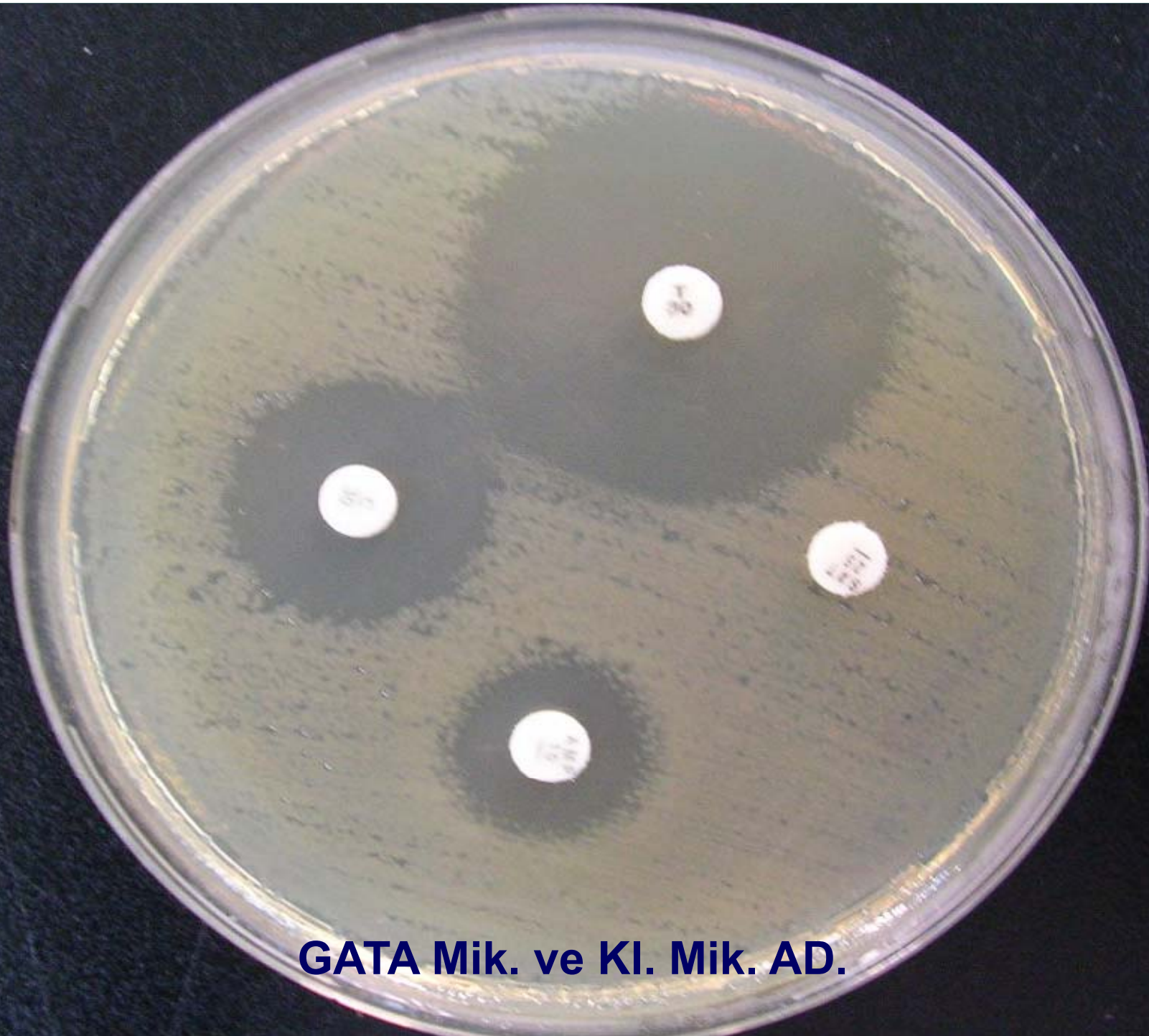
test edilir

• Kontrol suşu; *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılır



0,5 McFarland





**GATA Mik. ve KI. Mik. AD.**



**Antibiyotik duyarlılık paternlerinin doğrulanması ve  
epidemiyolojik araştırmalar için;**

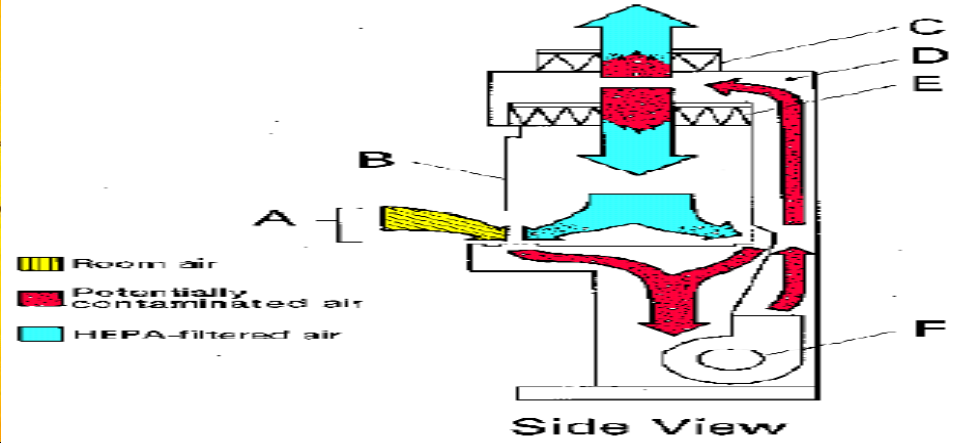
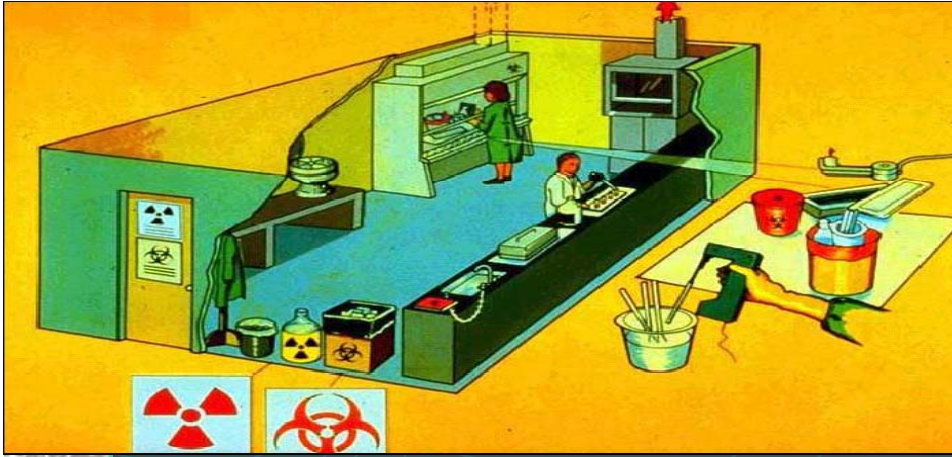
**Polymerase Chain Reaction (PCR)  
Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)  
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)  
Ribotiplendirme ile subtipleme**

**yapılabilir**



# Kalite Kontrol

**Kullanılan tüm besiyerleri  
antiserumlar ve laboratuvar  
aletlerinin mutlaka kalite kontrolü  
yapılmalıdır**



# Biyogüvenlik

- BSL 2 güvenlik
- Eller mutlaka yıkanmalı
- Taşıma / saklamada sızdırma önlenmeli
- İşlemi tamamlanan örnekler;
  - Otoklavlanmalı
  - 6 saat %1'lik kalsiyum/sodyum hipoklorit uygulanmalı



# Dezenfeksiyon

❖ Fenol bileşikleri

❖ Klor tablet / sodyum hipoklorit (günlük haz.)

**%1'lik solüsyon;**

çalışma bankoları, musluk başlıkları, diğer aletler

**%10'luk solüsyon;**

yoğun olarak infekte materyalle temas eden yüzeyler

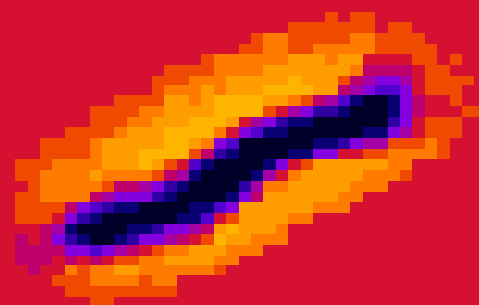


**Epidemi etkeninin identifikasyonu ve kontrolünde mikrobiyoloji laboratuvarı önemli bir rol alır**



**mikrobiyolog epidemi kontrol komitesinin ayrılmaz bir parçasıdır**





@James A. Sullivan

# Kaynaklar

- World Health Organization. Manual for the laboratory investigations of acute enteric infections. Geneva: World Health Organization, 1987; publication no. WHO/CDD/83.3 rev 1.
- McLaughlin JC. *Vibrio*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover FC, ed. Manual of clinical microbiology. Washington, DC: ASM Press;1995:465-476.
- Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholerae*. Atlanta, Georgia: CDC; 1994.
- Kay, BA, Bopp CA, Wells JG. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. In: Wachsmuth IK, Blake PA, and Olsvik O., ed. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Washington, DC: ASM Press; 1994: 3-26. Worksheet *Isolation and Identification of Vibrio cholerae Serogroups O1 and O139*
- [http://groups.msn.com/medcenter/whatsthis.msnw?action=get\\_message&mview=0&ID\\_Message=1461&LastModified=4675504517009382033](http://groups.msn.com/medcenter/whatsthis.msnw?action=get_message&mview=0&ID_Message=1461&LastModified=4675504517009382033)
- <http://w3.whosea.org/microbio/ch10.htm>
- <http://textbookofbacteriology.net/cholera.html>

*SIZE DAİMA  
İÇECEK TEMİZ SU  
SOLUYACAK TEMİZ HAVA,  
VE  
YAŞAYACAK TEMİZ TOPRAK  
DİLİYORUM*



**Teşekkürler**

IMESHOTS