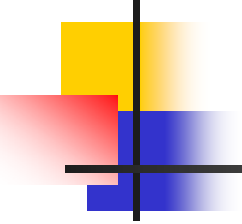




# *Tulareminin* Laboratuvar Tanı Yöntemleri

---

Dr. Fetiye Kolaylı  
KOÜ Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji AD

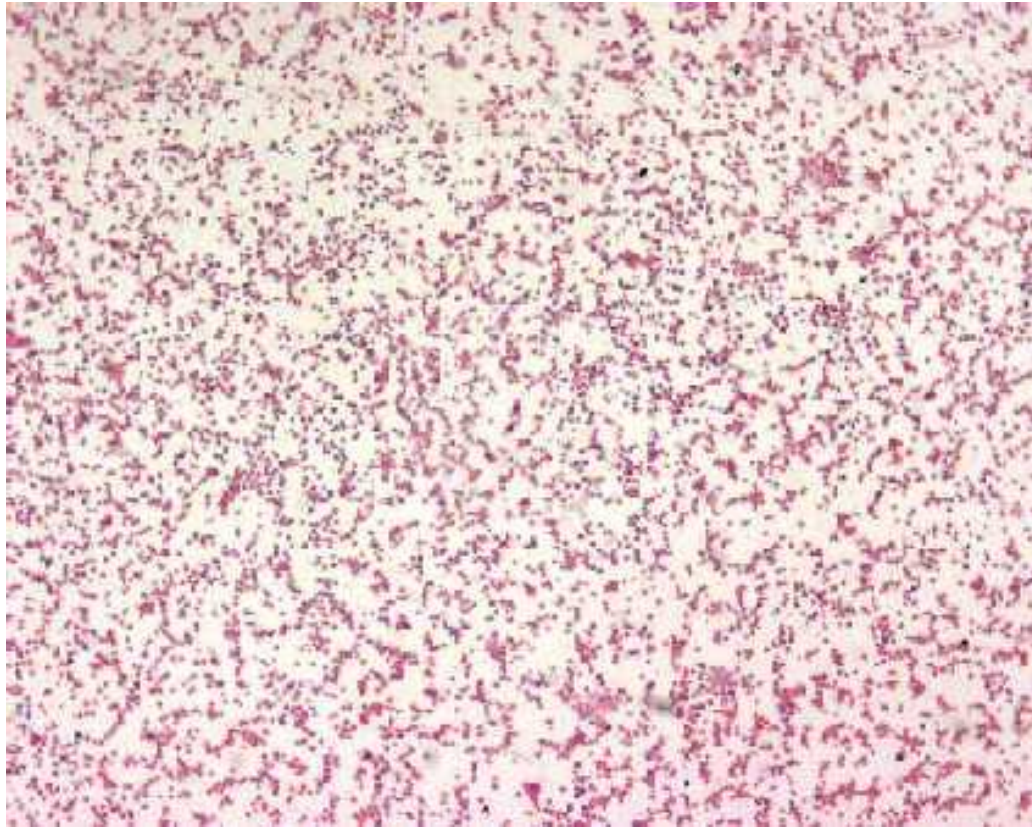
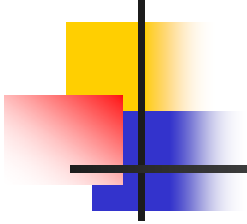
- 
- 
- *F. tularensis*'in tanımlanmasında
    - Direk mikroskopik inceleme
    - Seroloji
    - Bakterinin izolasyonu
    - Moleküler yöntemler kullanılır



# Gram boyama

---

- Gram boyası ile boyanıp direk mikroskopik inceleme tahmini tanı için hızlı bir yöntemdir
  - İnce, pleomorfik, zayıf boyanan, çoğunlukla tek tek görünen, gram negatif bakteri
  - Tanı değeri çok düşüktür





# Seroloji

---

- Serolojik testler tularemi tanısında 50 yıldan beri sürekli ve en sık kullanılan metotlardır
- Antikor/antijen aranabilir



# Antikor aranması

---

- Antikor yanıtı, enfeksiyonun başlangıcından iki hafta sonra oluşmakta (%89-95.4)
- Antikorlar 10 yıldan uzun bir süre kalabilirler ve IgA,IgM ve IgG tipi antikorlar belirlenebilir
- Antijen olarak ;
  - FopA, LPS, dış membran karbohidrat-protein fraksiyonu veya inaktive edilmiş tam hücre kullanılır



## Aglütinasyon yöntemleri

---

- Tüp aglütinasyon veya mikroaglütinasyon yöntemi kullanılabilir
- Mikroaglütinasyon testi en sık kullanılan yöntemdir.
- Antijen hazır olarak temin edilebildiği gibi ülkelerin kendi şuşlarından hazırladıkları antijenler de kullanılabilir



## Hastalığı tanımlama kriteri

---

- Tek testte  $\geq 1:160$  serum titresi veya
- Akut ve konvelesan dönemde alınan örneklerde serum titresinin dört kat artışı
- Mikroaglütünasyon testinde  $\geq 1:128$  titre de pozitif olarak kabul edilebilmektedir
- Seroprevalans çalışmalarında  $\geq 1:20$  titre pozitif olarak kabul edilebilmektedir

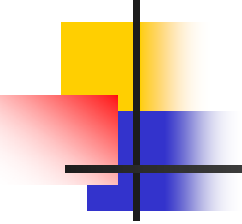




## ELISA

---

- Aglütinasyon testlerine göre duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksektir.
- Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda ELISA testinin Western blot ile kombine edilmesi önerilmektedir
  - Antijen olarak, LPS özütü kullanılır

- 
- 
- Serolojik testlerin avantajı;
    - Uygulamasının kolay olması
    - Semptomların başlangıcından sonra yalancı negatifliğin nadir olması



---

- Dezavantajları;

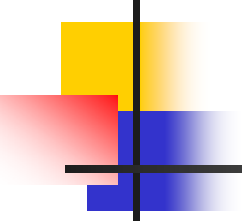
- Enfeksiyonun erken fazında yalancı negatif sonuç verebilir
- Nadir de olsa çapraz-reaksiyon nedeniyle yalancı pozitiflik verebilir
  - Özellikle *Brucella* spp.
- Ayrıca daha önce geçirilmiş tularemi enfeksiyonuna bağlı olarak yalancı pozitif sonuçlar olabilir



# Antijen aranması

---

- Klinik örneklerde bakterinin direk tanısında veya üremiş kültürlerde bakterinin teyid edilmesinde kullanılır
- İnaktive edilmiş tam hücre antijenlerine karşı oluşmuş ve FITC-işaretlenmiş tavşan antikoları kullanılır
- Lam aglütinasyonu da izolatların teyidi için hızlı bir teknik

- 
- 
- Antijen yakalayan ELISA (cELISA) ile antijen aranabilir
  - Formalinle fikse edilmiş dokularda da İmmunhistokimyasal yöntemle antijen aranabilir



---

- Serolojik yöntemler

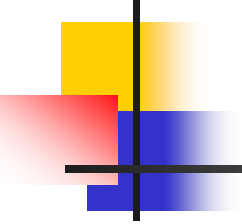
- *F.tularensis*'in her iki alt türünü (tip A ve tip B) saptayabilir



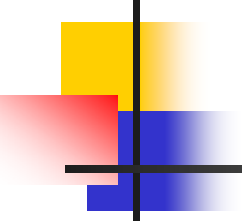
# Bakterinin izolasyonu

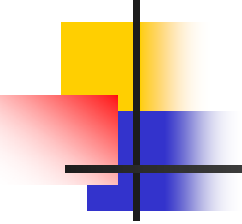
---

- Bakterinin kültürü altın standarttır
  - Enfeksiyonun kesin tanısının konulmasını sağlar
  - Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için
  - Moleküler epidemiyolojinin kaynağını oluşturur
  - Yeni türlerin/alt türlerin keşfini sağlaması

- 
- 
- Sıvı besiyerlerinde üretme
  - Katı besiyerlerinde üretme
  - Achantomoeba kültürü
  - Fareye inokülasyon



- 
- 
- *F.tularensis* fakültatif intraselüler
  - Zorunlu aerobik bakteri
  - 35- 37°C'de 2-5 günlük inkübasyon sonrası koloni oluştururlar.
  - Artmış CO<sub>2</sub> konsantrasyonu bakterinin üremesini stimüle eder.

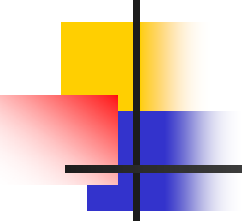
- 
- 
- *F. tularensis* alttür *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* için sülfidril bileşiklerine ihtiyaç duyar
  - *F.tularensis* subsp. *novicida* ve *F. philomiragia* daha kolay üreyen bakteriler olup koyun kanlı agar gibi genel üretim besiyerlerinde üretilebilirler.



---

- *F.tularensis*

- primer ülserlerden
- lenf nodu aspiratları ve biyopsilerinden
- balgam
- kemik iliđi ve karaciğer, dalak gibi doku biyopsilerinden üretilmesi mümkündür.

- 
- 
- Örnekler işlenene kadar 4-8°C'de saklanabilir
  - Transport için aktif kömürlü Amies taşıma besiyeri önerilmekte
  - -80°C'de dondurularak transfer bakterinin kültürde üretilme şansını artırmakta



# *F. tularensis*'in Sıvı Besiyerlerinde Üretilmesi

---

- *F. tularensis* üretilmesinde sıvı besiyerleri optimum üreme ortamları olarak kullanılmaz.
- Sıvı besiyeri olarak
  - Brain heart infusion (BHI)
  - Trypticase soy broth (TSB)
  - Tiyoglukolat sıvı besiyerleri kullanılabilir.
- Sistein gibi sülfat bakımından zengin kaynakların ilave edilmesi gerekmektedir.



# Katı besiyerlerinde üretilmesi

---

- Geleneksel olarak sistein-glukoz kanlı agar (Francis besiyeri) kullanılır
- %9 ısıtılmış koyun kanı ilaveli cystein heart agar (CHAB)
- Sistein ilaveli zenginleştirilmiş çukulatamsı agar (ÇA),
- Buffered charcoal yeast extract (BCYE)
- %1 hemoglobin, %1 İsoVitaleX ilaveli GC agar base II
- Thioglycollate- glucose blood agar (TGBA) gibi besi yerleri de izolasyon için kullanılmaktadır

- CHAB en sık kullanılan besiyerlerinden biridir.
- Floral bölgeden alınan örneklerin antibiyotikli CHAB (CHAB-A) besiyerine ekilmesi önerilmektedir
  - *7,5 µg/ml kolitsin,*
  - *2.5 µg/ml amfoterisin,*
  - *0.5 µg/ml linkomisin ,*
  - *4.0 µg/ml trimetoprim,*
  - *10 µg/ml ampisilin*



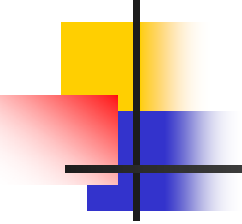


# Fare inokülasyonu

---

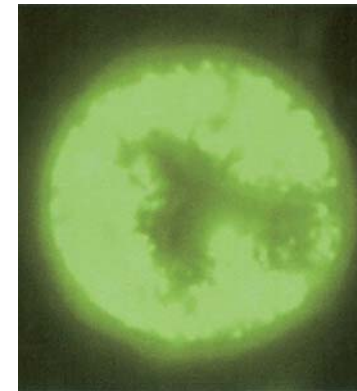
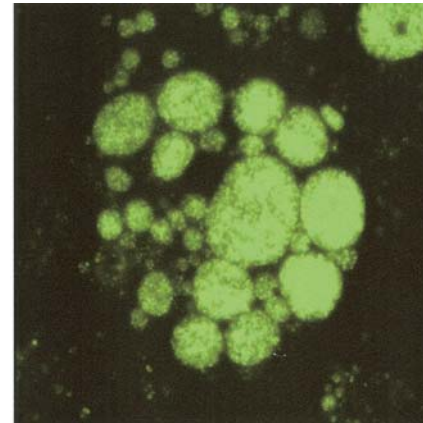
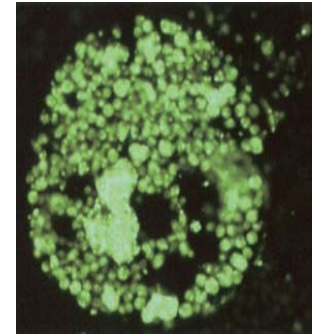
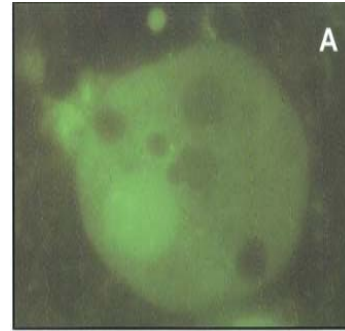
- Kontamine örneklerden /kontamine kültürlerden bakterinin izolasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılan metotlardan biridir
- Örnekler serum fizyolojik içinde sulandırılarak fareye karnın alt bölgesinden subkutan enjekte edilir



- 
- 
- Fareler 2-3 günden sonra hastalanırlar
  - Ölmeden hemen önce kurban edilerek
    - Karaciğer
    - Dalak gibi dokuları çıkarılarak besi yerlerine ekilir

# Achantamoeba kültürü

- *Achantamoeba castellani* serbest yaşayan bir amip
- *F. tularensis* amip içersinde üreyebilmekte

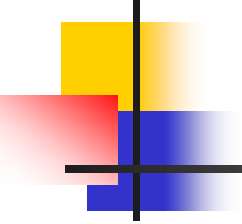




# Moleküler Yöntemler

---

- *F. tularensis*'in belirlenmesinde çeşitli PZR yöntemleri geliştirilmiştir.
  - Klasik PZR
  - RT-PZR
  - Bakterinin tanımlanmasında *tu14*, *fopA*, *23kDa gen*, *ISFtu2* hedef genleri seçilmiştir.

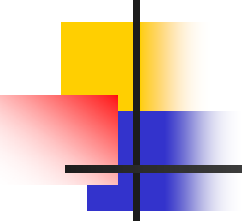
- 
- 
- Özellikle RT TaqMan-PZR yöntemi ile
    - Klinik örneklerden (boğaz sürüntüsü, ülseratif lezyonlar, pü, lenf nodu aspiratları gibi)
    - Çevresel örneklerden (su, çamur, kene gibi) bakteriyi belirlemek mümkün olmaktadır



# Diğer metotlar

---

- İmmunkromotografik metod
  - *F.tularensis* LVS'nun LPS'e spesifik oluşturulan MAb'lar nitroselüloz membrana aktarılmakta.
  - Üzerine 200mikrolitre antijen ilave edilmekte
  - Üzerine anti-*F.tularansis* tavşan serumu ilave edilmekte
  - $10^{6-7}$  bakteri/ml belirleyebilmekte

- 
- 
- Son alıřmalar ise ;
  - Ülsereoglandular tularemili hastalarda Affymetrix microarray ile 14,500 gen araştırılmış
  - Tulareminin erken fazında yedi genin belirleyici özelliğinin olduğu tanımlanmış
  - Fakat bu konuda çok daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği bildirilmekte