

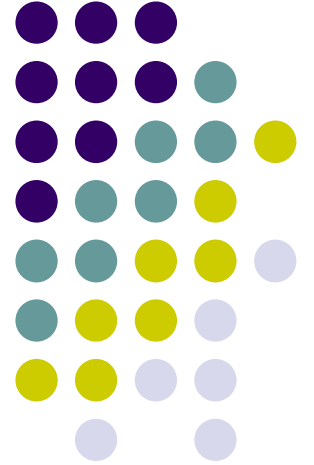
# Tularemi: Laboratuvar tanısı

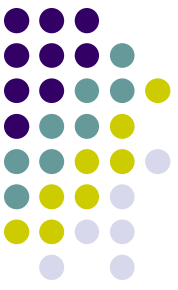
Dr.Vet. Hekim  
**Bekir ÇELEBİ**



Sağlık Bakanlığı  
Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu

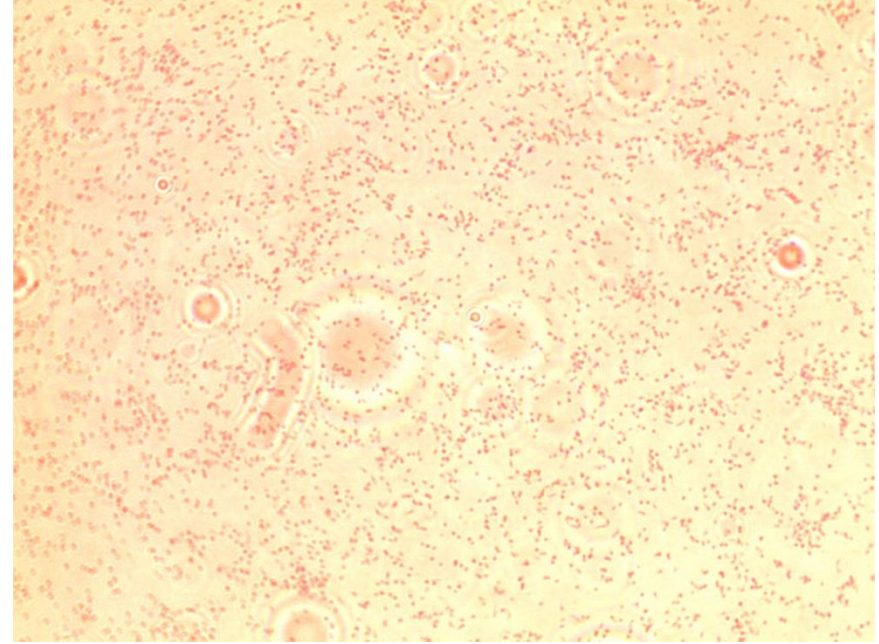
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire  
Başkanlığı

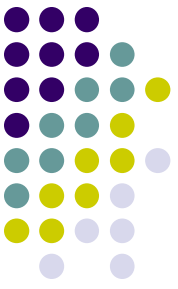




# Francisella tularensis

- 0.2 $\mu$ m X 0.2-0.7  $\mu$ m boyutlarında çok küçük kokoid basillerdir
- İnce bir kapsülü vardır
- Gram negatif ve soluk olarak boyanırlar
- Hareketsiz ve sporsuzdurlar

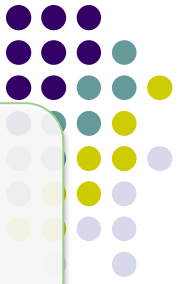




# F. tularensis alt türleri

- *F. tularensis* alttür *tularensis*
- *F. tularensis* alttür *holarctica*
- *F. tularensis* alttür *mediasiatica*
- *F. tularensis* alttür *novicida*

# •Klasik olarak



• Oral Yol

• Deri ve mukozal temas

Oro-farengial

Ülseroglandüler  
Glandüler  
Oküloglandüler

## YENİ SINIFLANDIRMA

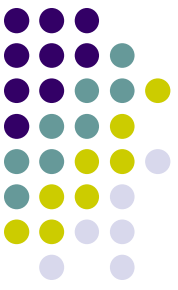
- 1) **Glanduler (Ülseroglandüler, Orofaringeal, Oküloglandüler)**
- 2) **Sistemik (Tifoidal ve respiratuvar)**

Tifoidal

Pnömonik

• Giriş Kapısı?

• Aerosol



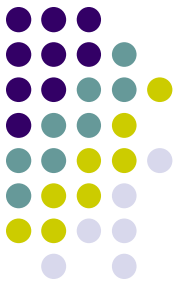
# Klinik Materyaller

## Klinik tabloya göre seçim

- Yara → Kazıntı/sürüntü
- Göz → Konjunktival sürüntü
- Farengeal tutulum → Boğaz sürüntüsü
- Pulmoner tutulum → Balgam, mide yıkama sıvısı, endotrakeal aspirat, bronkoalveoler lavaj
- Karaciđer, dalak, lenf bezi → doku biyopsi materyalleri, iđne aspirasyon örnekleri
- Kan
- Serum (serolojik çalıřmalar için)

# Yara

## (Glandüler/ülsero-Glandüler form)

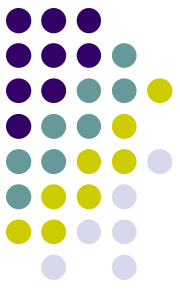


- Ülserin yayılan sınırından
- Kazıntı / sürüntü
- Biyopsi



# Doku

## (Glandüler/ülsero-Glandüler form)



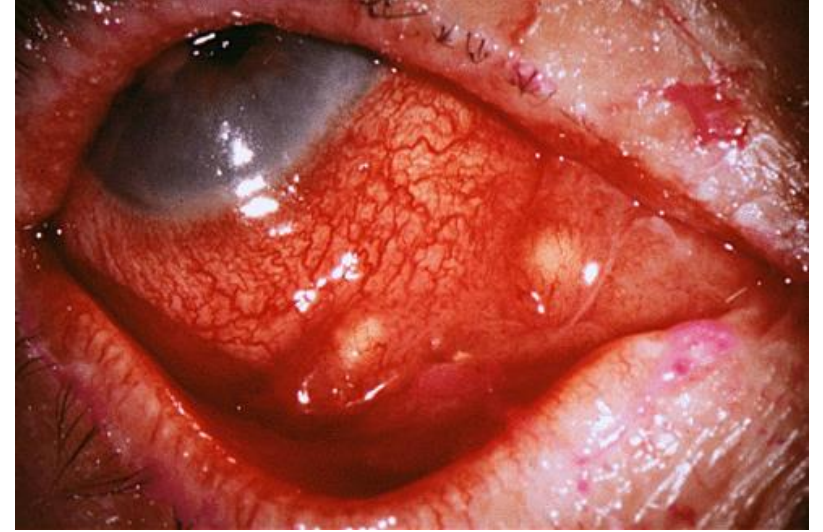
- Cilt dezenfeksiyonunu takiben
- Aspirasyon
- Biyopsi



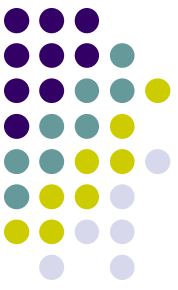
# Göz (Okülo-Glandüler form)



- Alt göz kapağı içinden
- Sürüntü





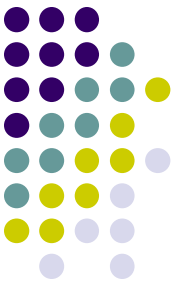


# Boğaz (Oro-farangeal form)

- Farenks veya tonsillalardaki lezyonlardan

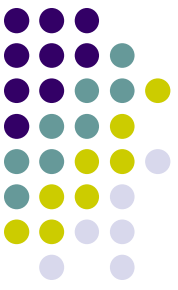
- Sürüntü





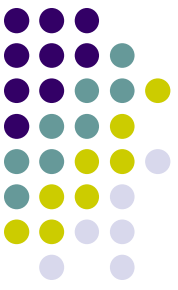
# Çevresel Örnekler

- Klorlanmamış, değişik noktalardan alınmış en az 500 ml su.
- Sođuk zincir şartlarında transfer edilmelidir.



# Laboratuvar Tanı Yöntemleri

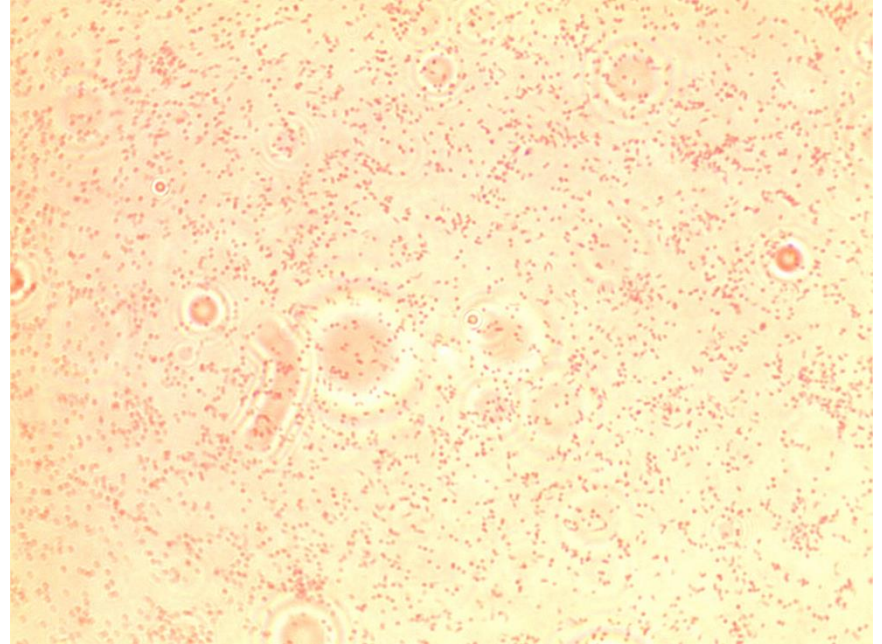
- Etkenin direkt olarak gösterilmesi:  
Mikroskopi ve **DFA**
- **Kültür**
- **Serolojik tanı yöntemleri**
- **Moleküler teknikler ile bakteri DNA'sının gösterilmesi.**

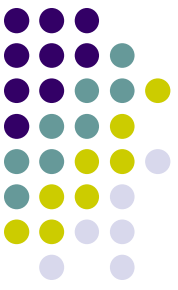


# Etkenin Direkt Olarak Gösterilmesi

- **Mikroskopi**

Klinik örneklere Gram ve Giemsa boyama uygulanabilir. Gram boyalı direkt preparatın tanı değeri çok düşüktür.

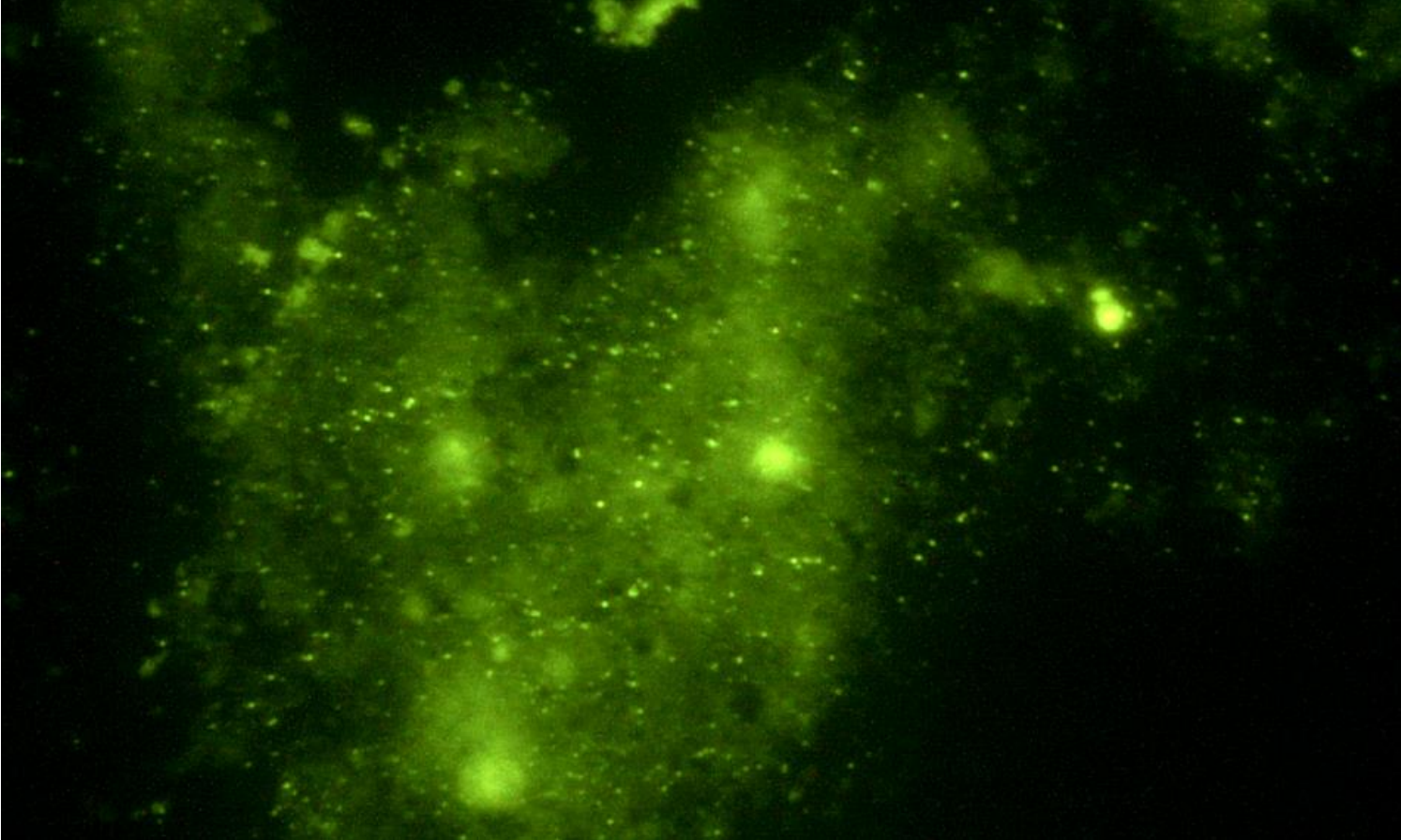
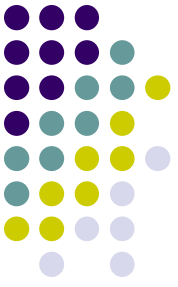




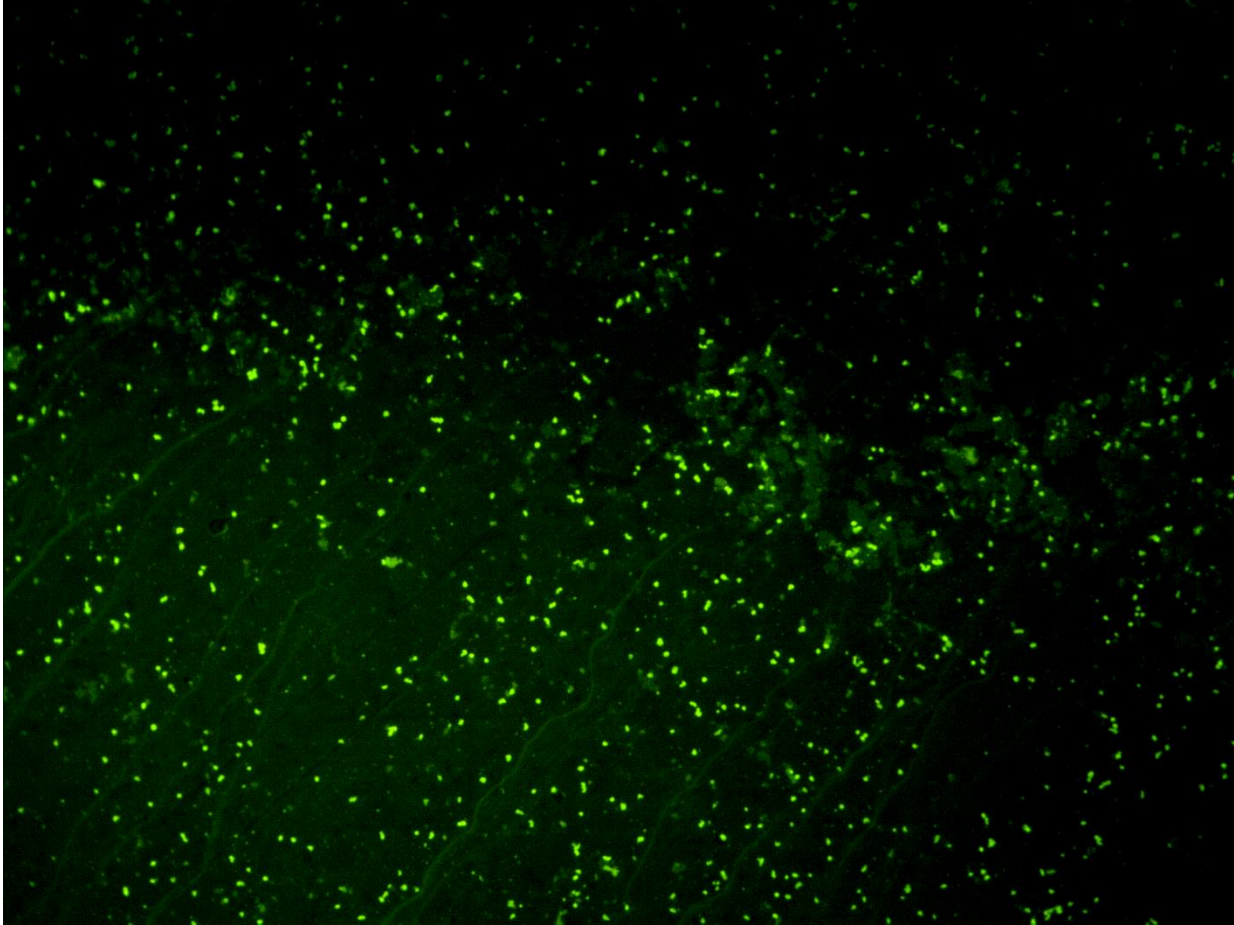
# Etkenin Direkt Olarak Gösterilmesi

- **Direkt Floresan Antikor Testi (DFA)**
  - Biyopsi ve lenf aspiratı gibi klinik örneklerde hızlı tanı amacıyla
  - İzole edilen suşların doğrulanmasında kullanılmaktadır
  - Orta derecede duyarlılığa sahiptir ( $10^6$  bakteri/ml)

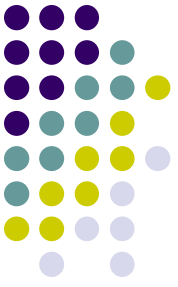
# Lenf Aspiratı DFA



# İzolatlarda doğrulanmasında DFA

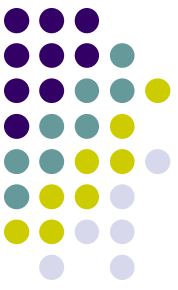


# KÜLTÜR



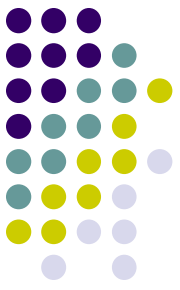
- Altın standart
- Kesin tanını konulmasını sağlar
- Elde edilen izolatlarla, alttürlere ilişkin epidemiyolojik veriler elde edilir.
- Antibiyotik duyarlılığın belirlenmesinde yardımcı olur.
- Yeni alttür veya türlerin belirlenmesine yardımcı olur.





# Etkenin Üretilmesi

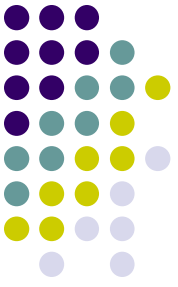
- **Katı besiyerlerinde**
- Sıvı besiyerlerinde
- Achantomoeba kültüründe
- Deneme hayvanlarında



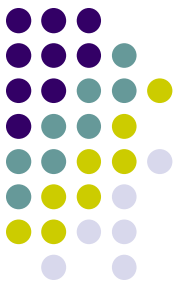
# Katı Besiyerleri

- **Francis Besiyeri** ( %0,1 Sistein, %1 Glikoz, %9 kanlı)
- %0,1 Sistein ilaveli brain heart infüsyon agar (%9 kanlı)
- Floralı bölgelerden alınan örnekler için antibiyotik eklenmiş besiyerleri kullanılmalıdır.

# Kültürde Kullanılan Materyaller

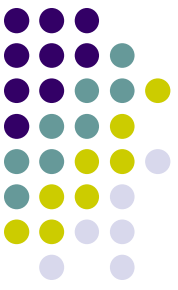


- Boğaz sürüntüsü
- Konjunktival sürüntü
- Lenf aspiratı
- Doku biyopsisi
- İçme suları



# Üreme Şartları

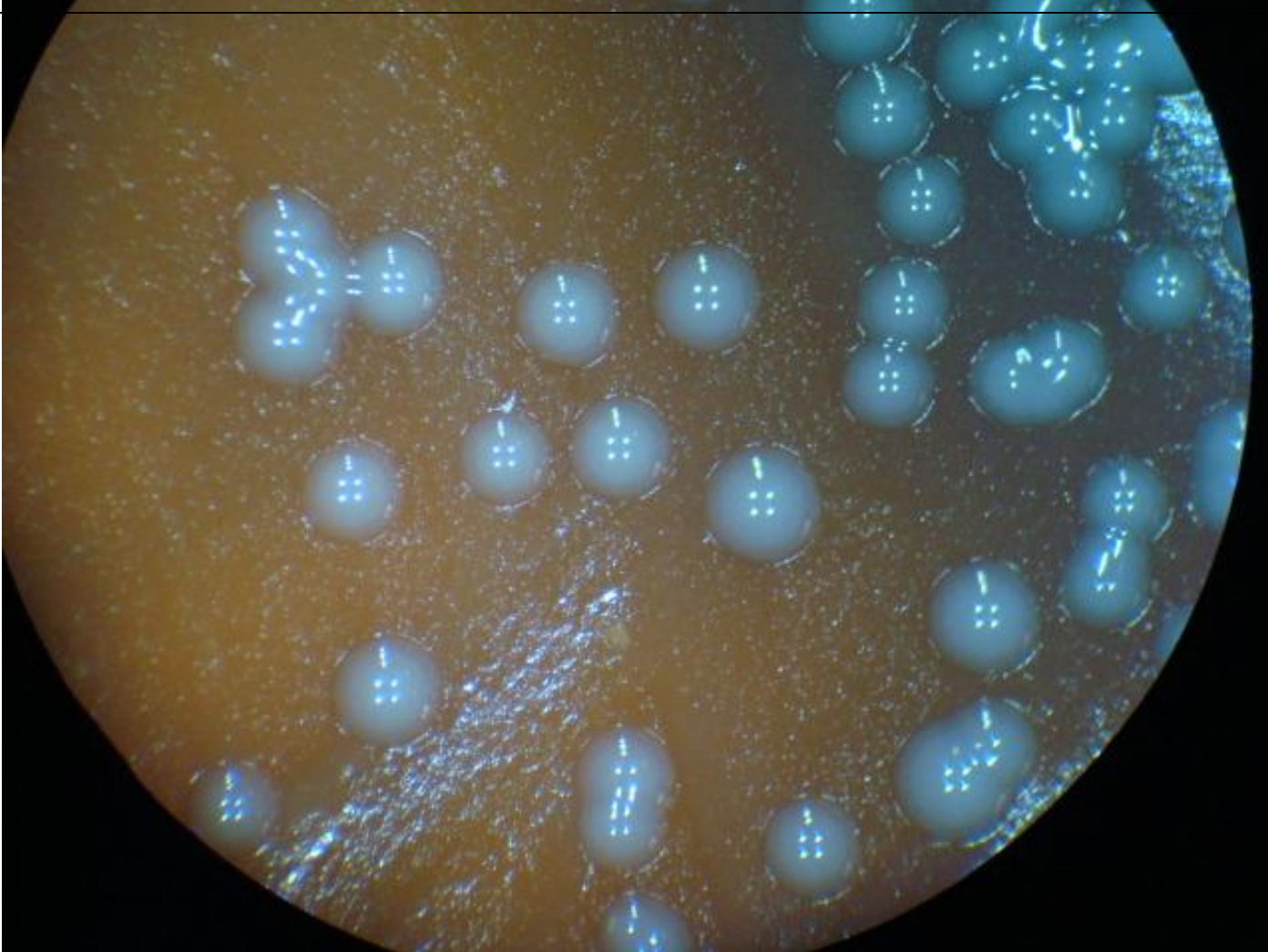
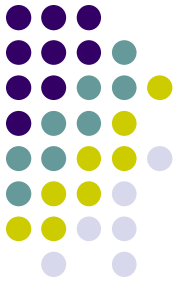
- *F.tularensis* geç ve güç üreyen nazlı bir bakteridir.
- Aerobik bakteridir ama % 5 CO<sub>2</sub> li ortam üremeleri stimüle eder.
- 35- 37°C'de 2-5 günlük inkübasyon sonrası koloni oluştururlar. İnkübasyon 10.güne kadar uzatılmalıdır.



# Koloni morfolojisi

- 1-2 mm çapında
- Beyazdan gri veya mavimsi-gri renkli,
- Opak, düzgün kenarlı ve parlak yüzeyli hafif mukoid görünümlü,
- S tipi koloniler gözlenir.

# Koloni Mikroskobunda Görünüm





Sağlık Bakanlığı  
Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu



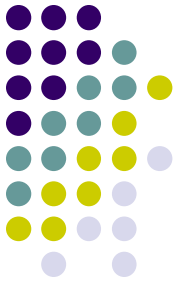
# Lenf Aspiratından İzolasyon





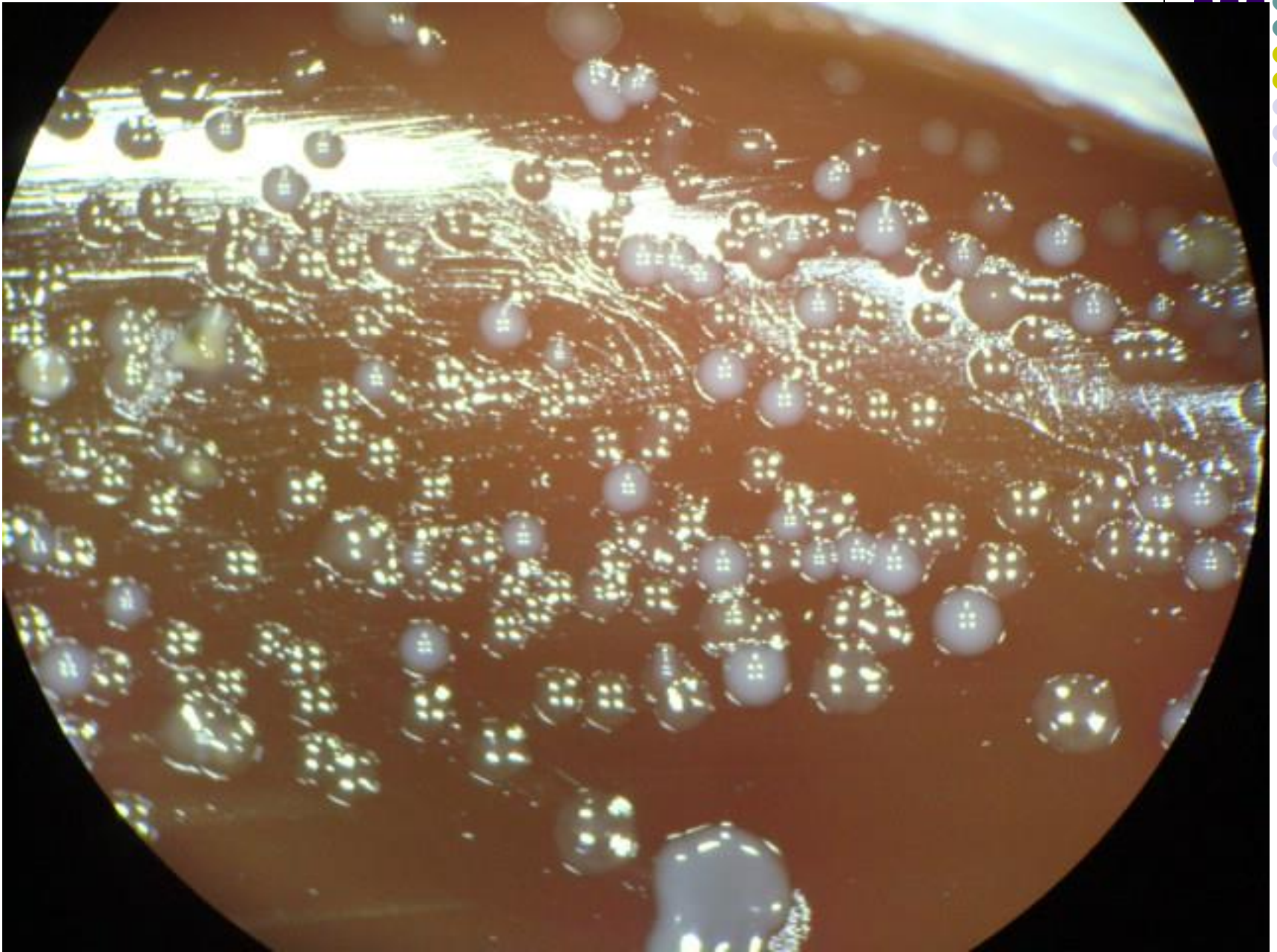
Sağlık Bakanlığı  
Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu

# Boğaz Kültüründen İzolasyon



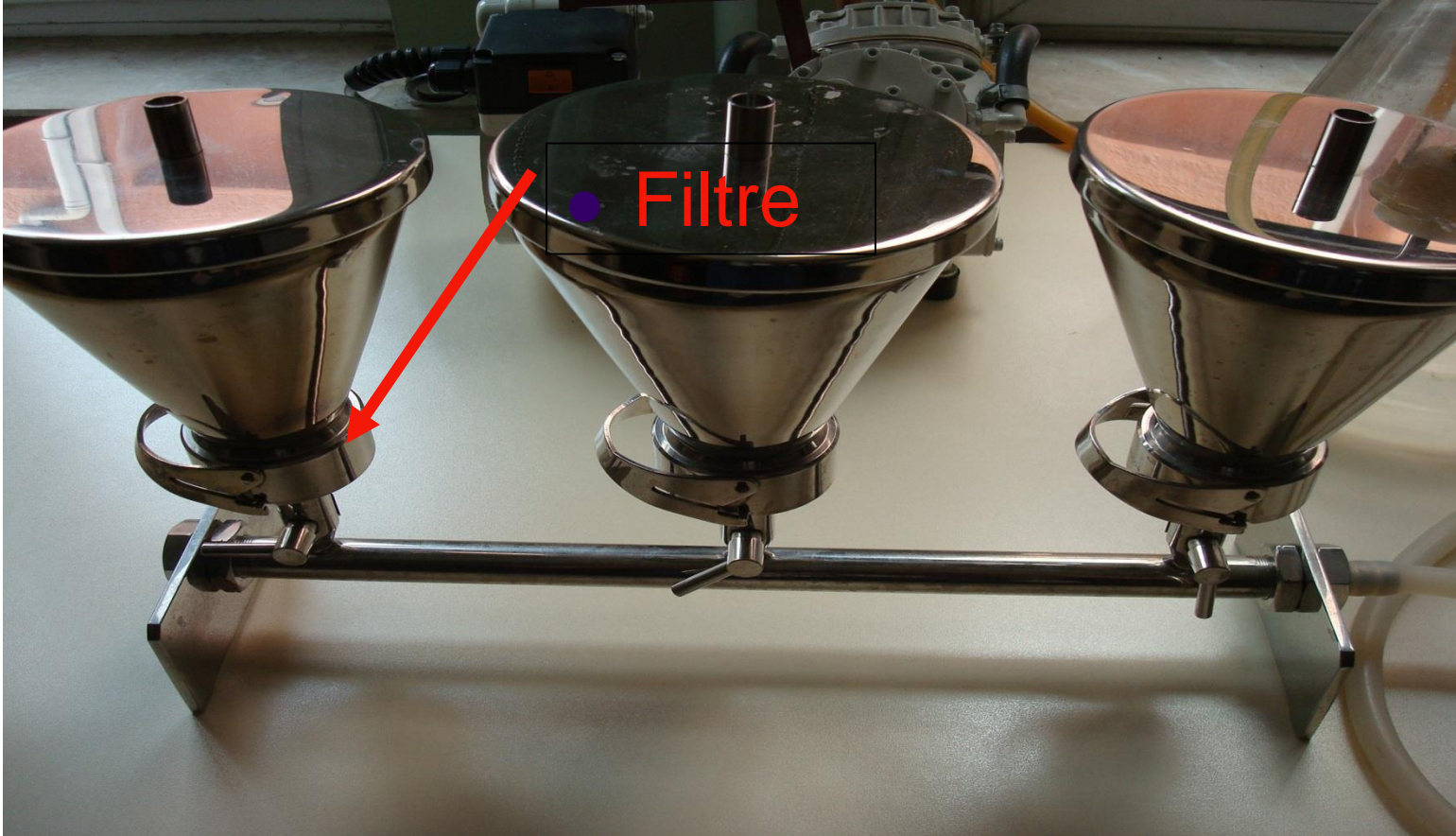


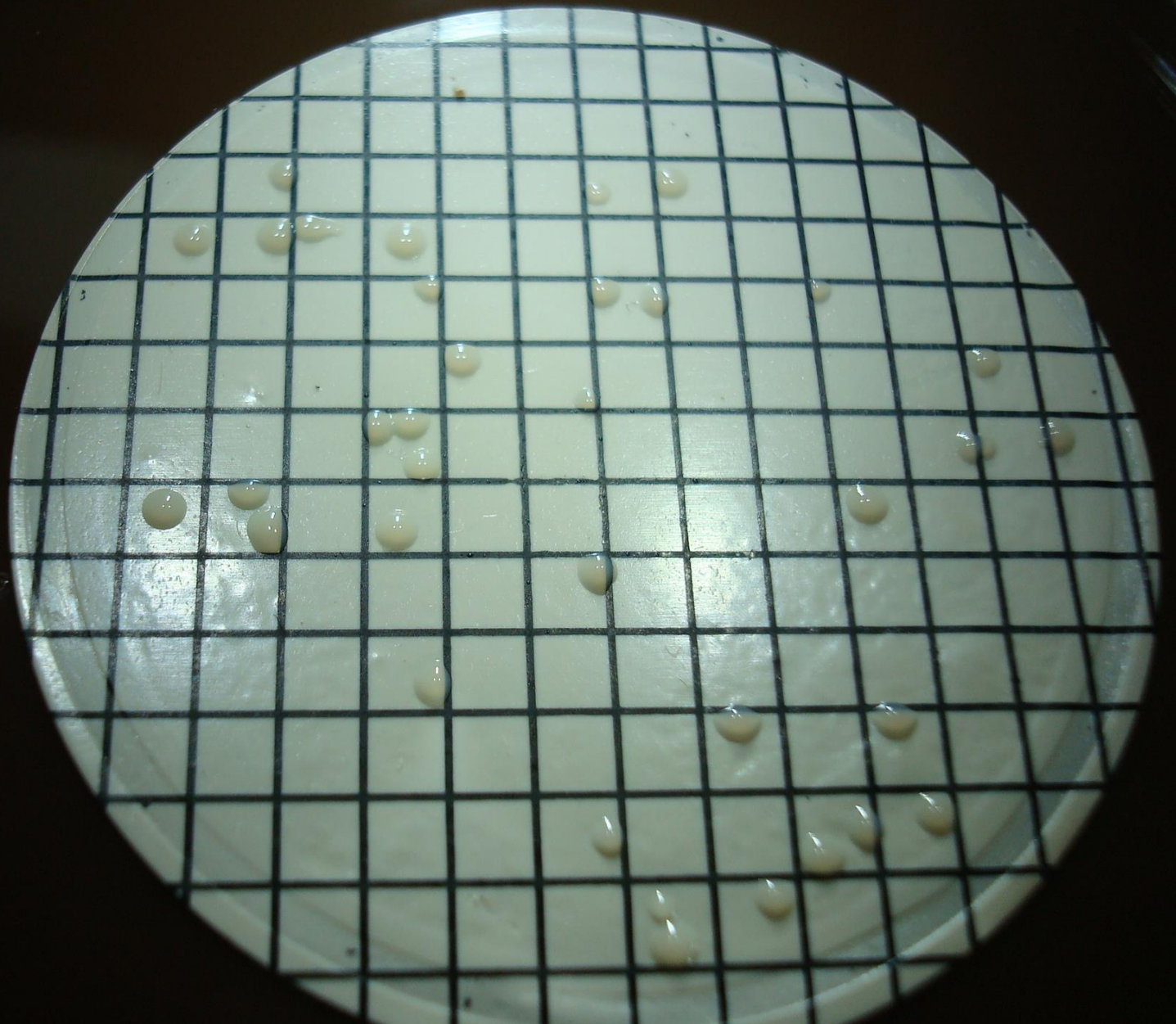


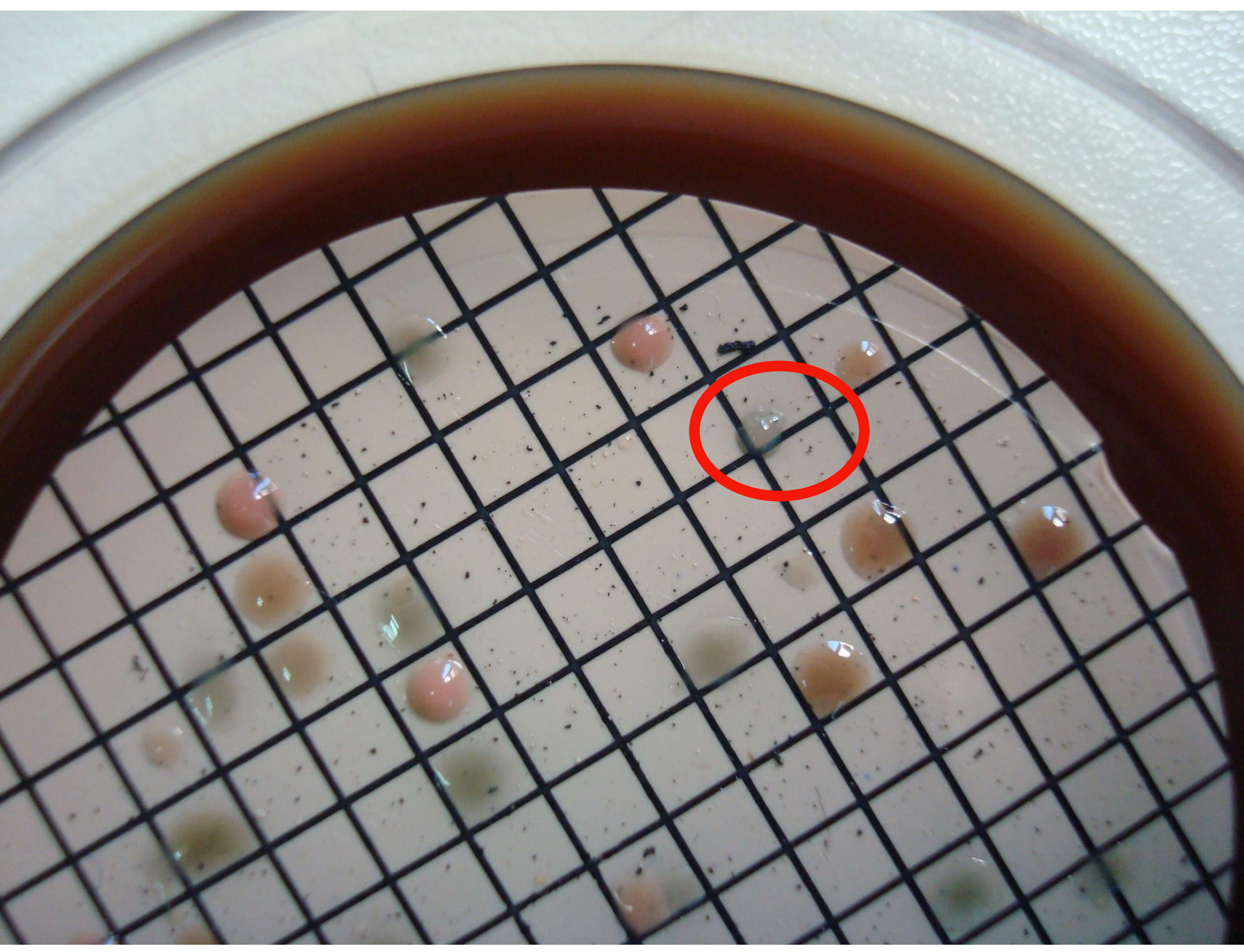


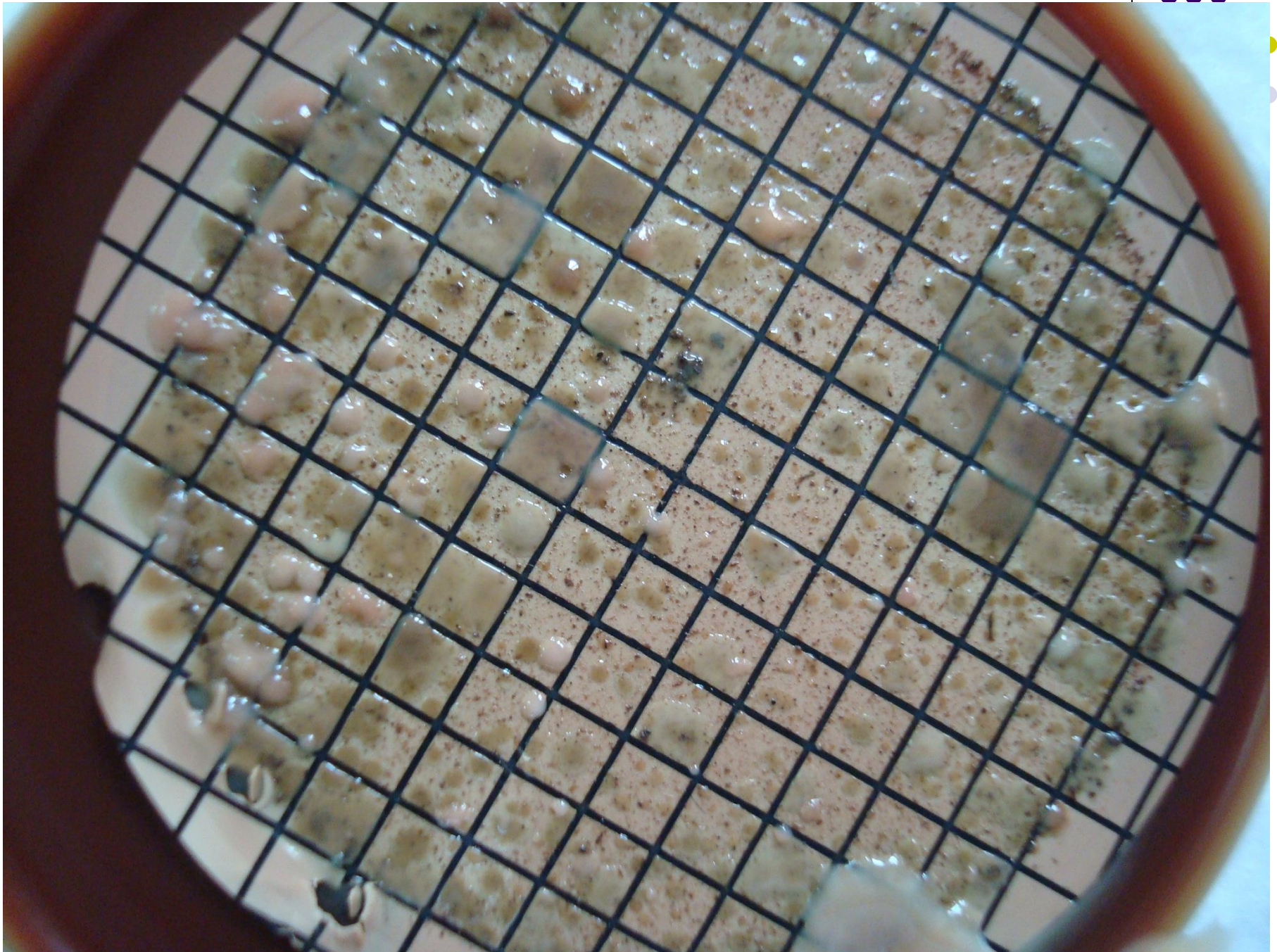
# Çevresel örneklerden

- Su filtrasyon yöntemi ile filtre kültür

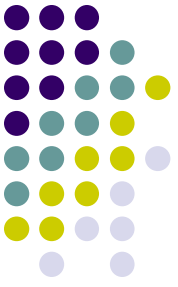






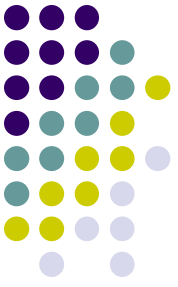


# İzolatin Doğrulanması



- *F.tularensis* antiserumu ile lam  
aglütinasyon
- DFA
- PCR

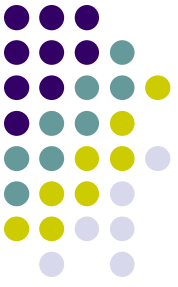
# SEROLOJİ



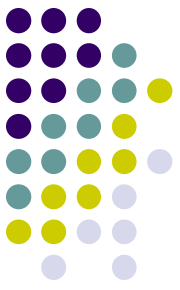
- Serolojik testler en sık kullanılan tanı yöntemidir
- Tularemide antikorlar genellikle ikinci haftadan sonra pozitifleşir ve 4-5. haftalarda en yüksek düzeye ulaşır ve yıllarca düşük titrede pozitif olarak kalırlar.



# SEROLOJİK YÖNTEMLER



- **Aglütinasyon yöntemleri**
- **ELISA**
- **IFA**
- **Western Blot**



# Mikroaglutinasyon (MA) Testi

- Uygun *epidemiyolojik* ve klinik belirti ve bulguların varlığında



- **Tek serum örneğinde**

- Tüp Aglutinasyon ile  $\geq 1:160$
- MA  $\geq 1:160$

- Akut ve konvelasan

örneklerde  $\geq 4$  kat titre artışı

*kesin* tanı kriteri

- Antikor yanıtı antibiyotik tedavisinden **etkilenmez...**

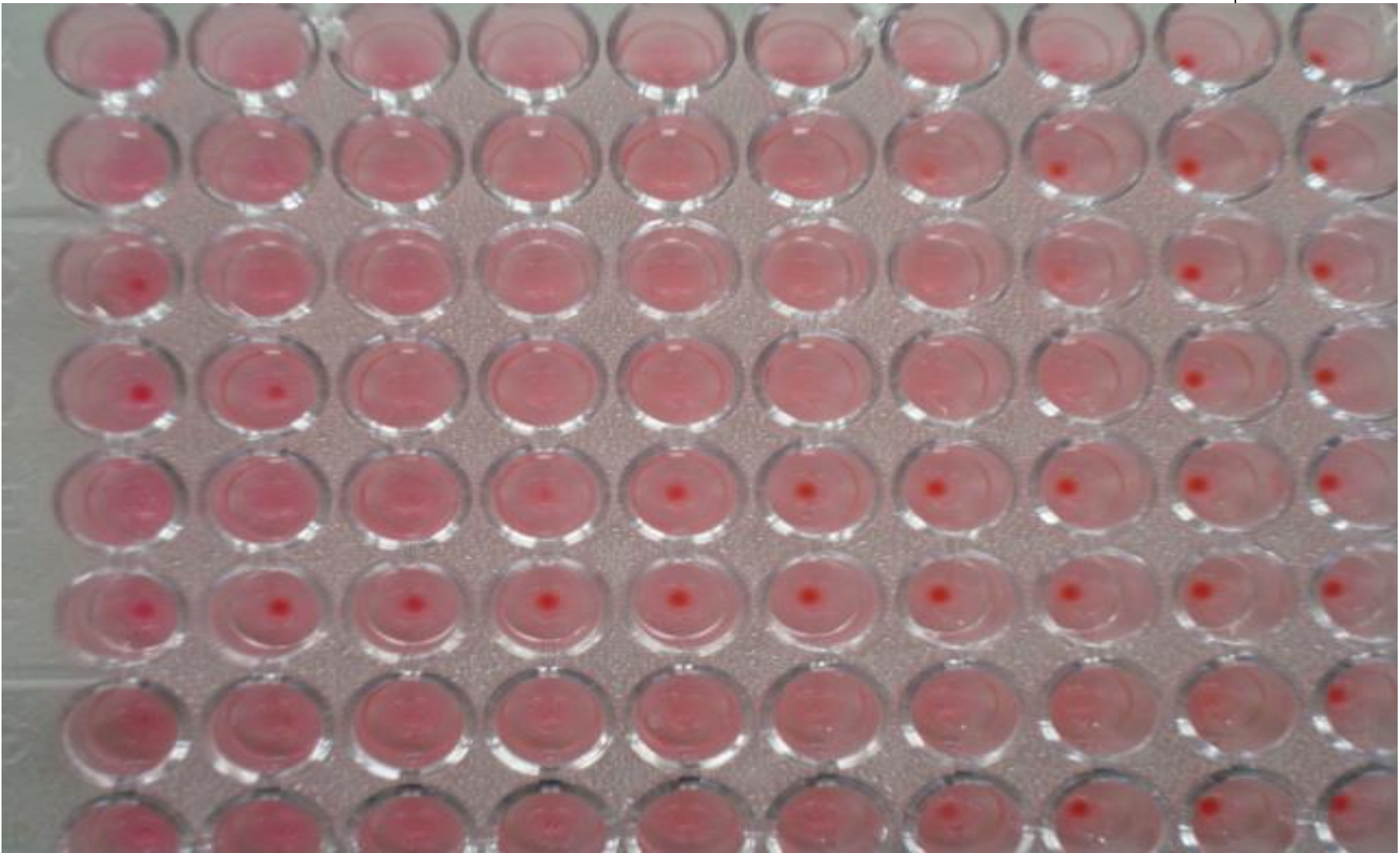
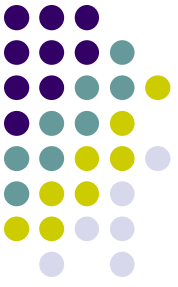
- Tedaviden sonra **yıllarca** düşük titrelerde

- (1/20-1/80 gibi) Antikor varlığı saptanır.

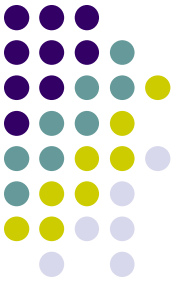


Sağlık Bakanlığı  
Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu

# MAT

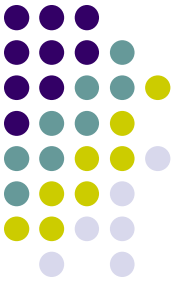


# Moleküler Tanı (PCR)

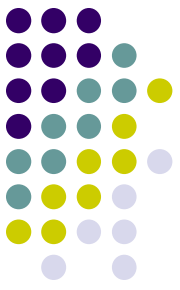


- Kullanılan materyaller
  - İzolatlar
  - Lenf aspiratı veya sürüntüsü
  - Biyopsi veya otopsi materyali

# Moleküler Tanı

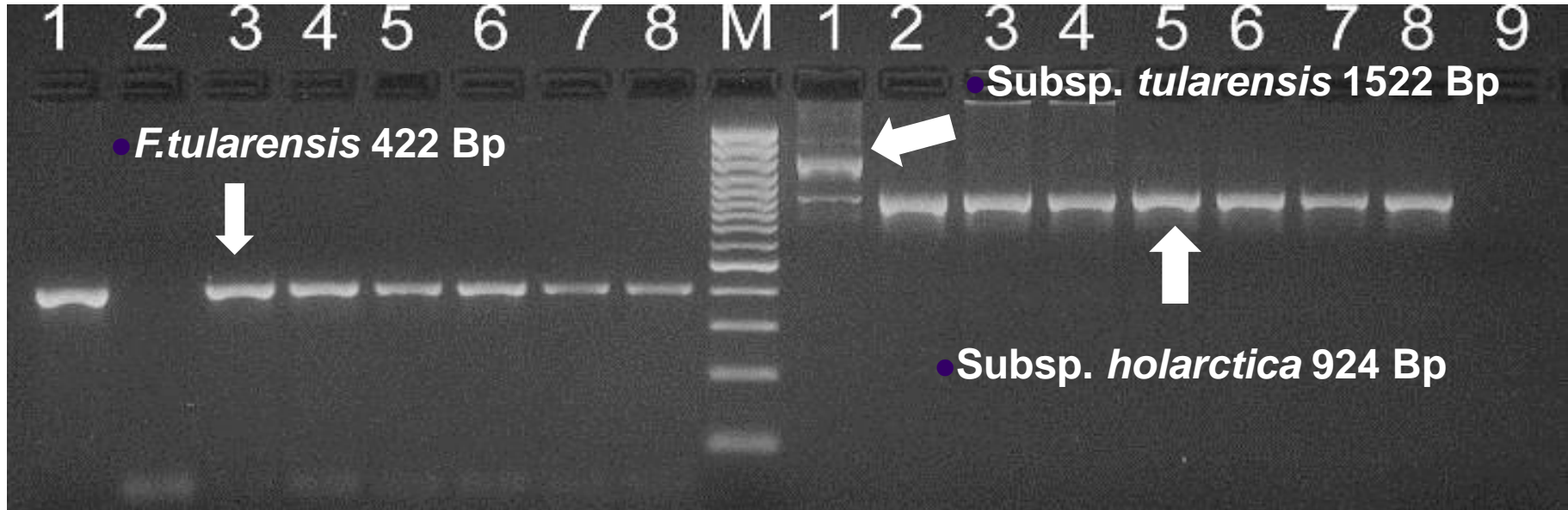


- Bakteri DNA'sını saptamaya yönelik testler
  - **Konvasiyonel PCR**
  - **Real-time PCR**
  - *Tul 4* geni genus düzeyindeki tanımlama için oldukça iyi bir hedef bölgedir.

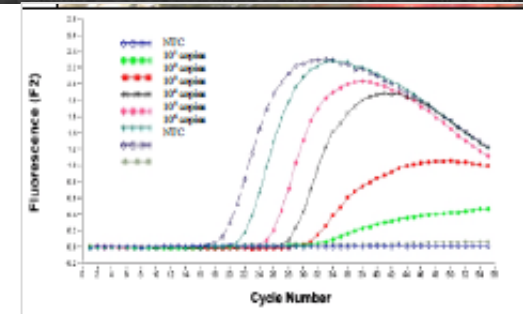


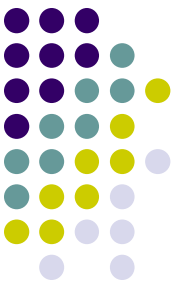
# Moleküler Tanı

- Lenf aspiratı, boğaz sürüntüsü, Biyopsi veya otopsi materyali



- *FopA* gene- Light Cycler 480

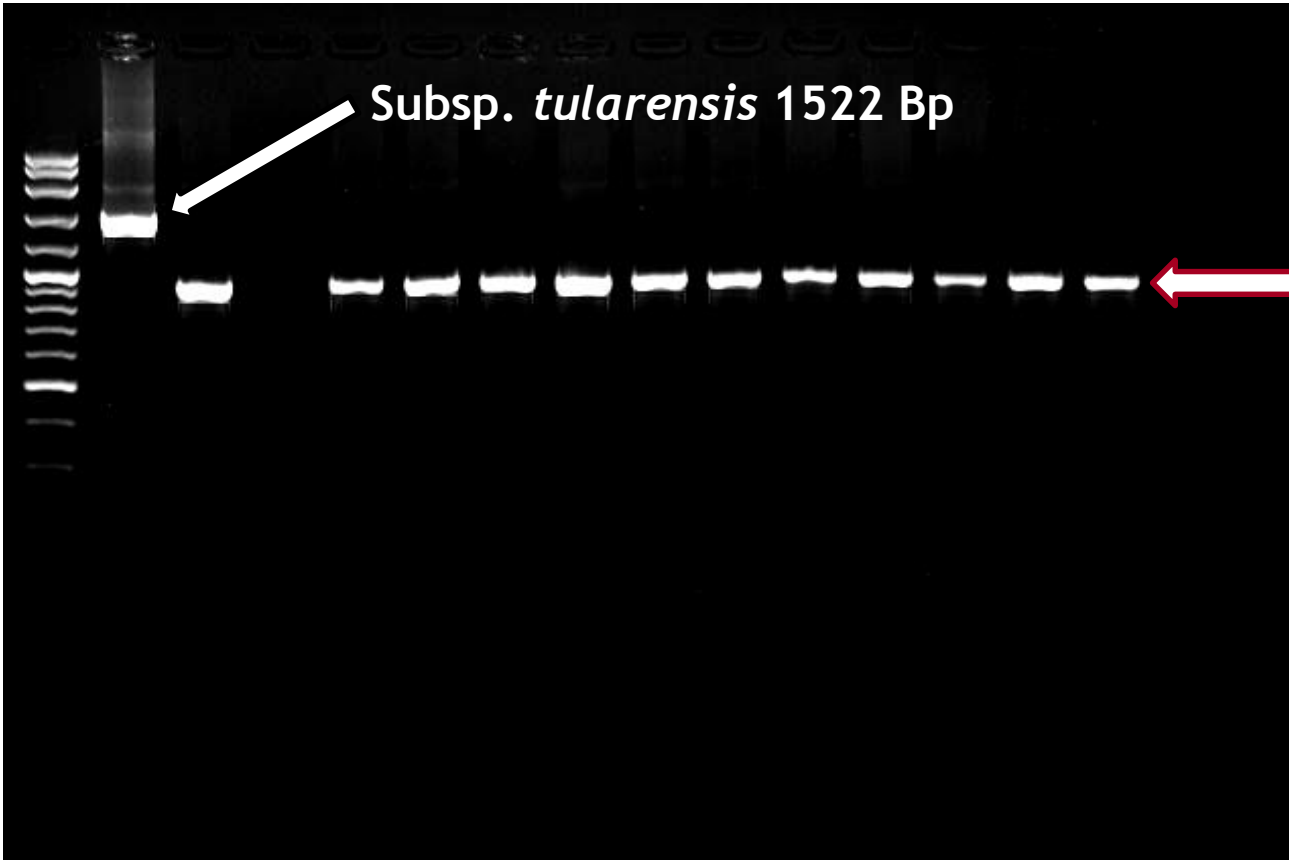
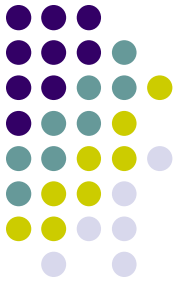




# PCR ile Alt Türlerin Ayrımı

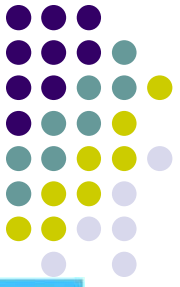
- *F. tularensis*'in alt türlerinin klinik özellikleri ve mortalite oranları farklı olması, biyoterör etkeni olma potansiyeli nedeniyle alttür ayırımı önemlidir.
- Alt türlerin ayrımında PCR ile **RD1** gen bölgesindeki değişikliklere bakılır.

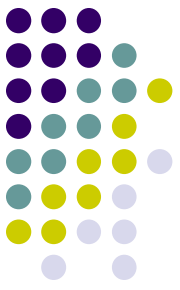
# RD1 Bölgesi PCR ile Alttür Ayrımı





# İki Tularemi Tanı Referans Merkezi

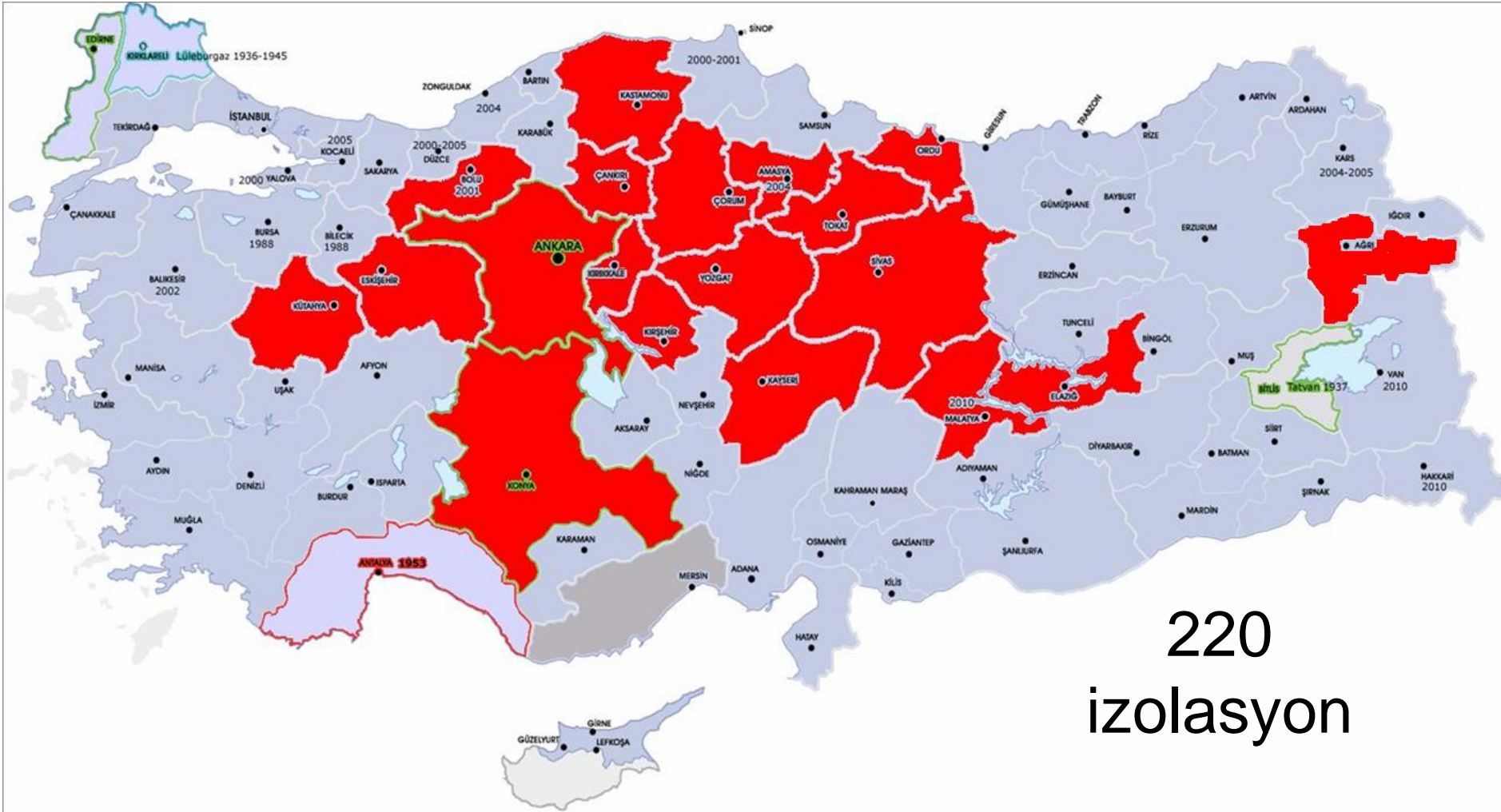




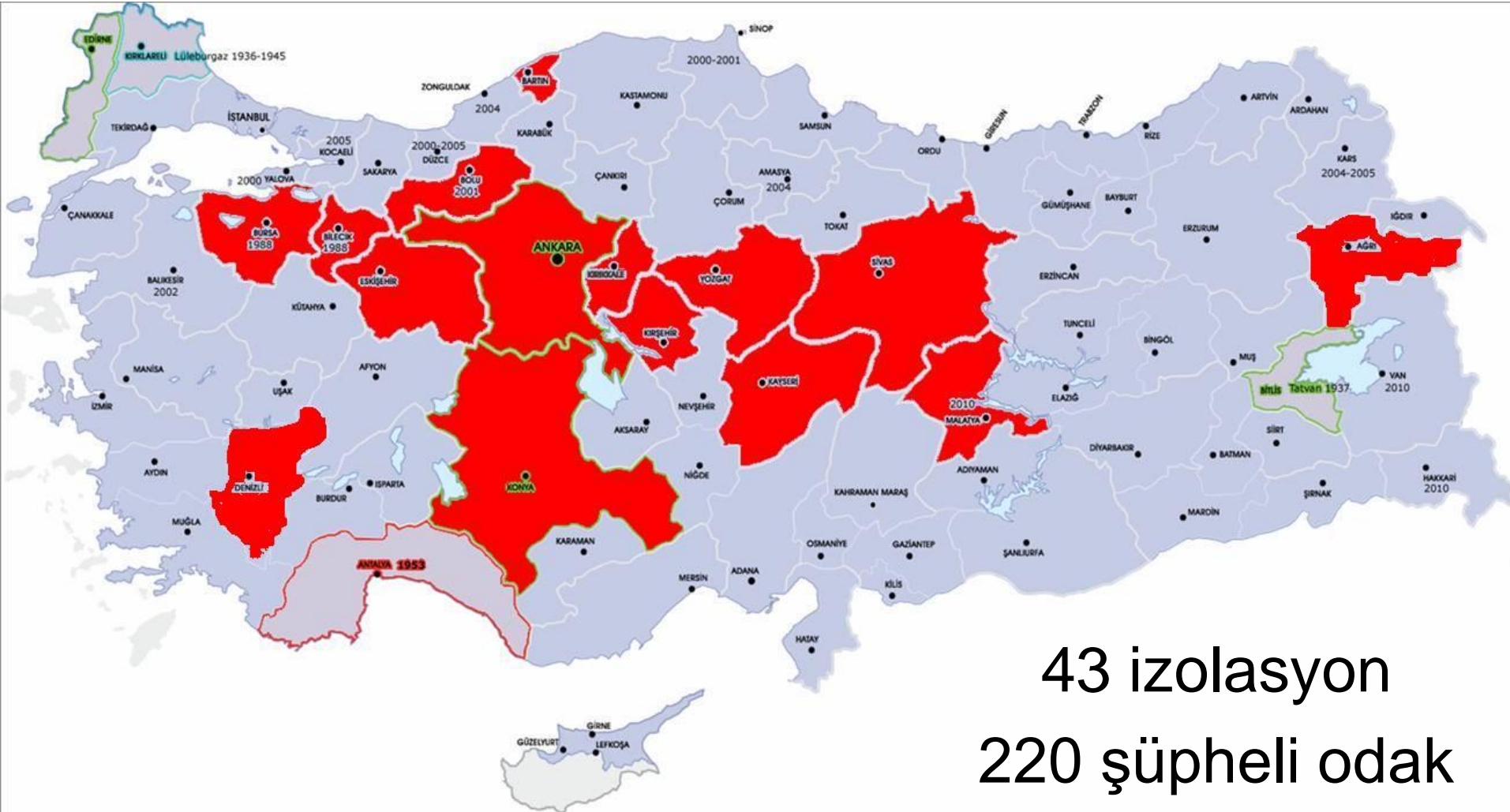
# Kültür Analizleri 2009-2014

- İzolasyon yapılan klinik örnekler
    - Lenf aspiratından: **61**
    - Boğaz sürüntüsünden :**135**
    - Lenf +Boğaz :**15**
    - Göz Konjunktival sürüntüsünden: **6**
    - Kan kültürü: **2**
    - El yara sürüntüsü: **1**
  - İçme sularından: 43 odaktan izolasyon
  - Ölü Rodent ( *Microtus guentheri* ) :1 izolat
- 220

# İnsan Klinik Örneklerinden İzolasyon Yapılan İller

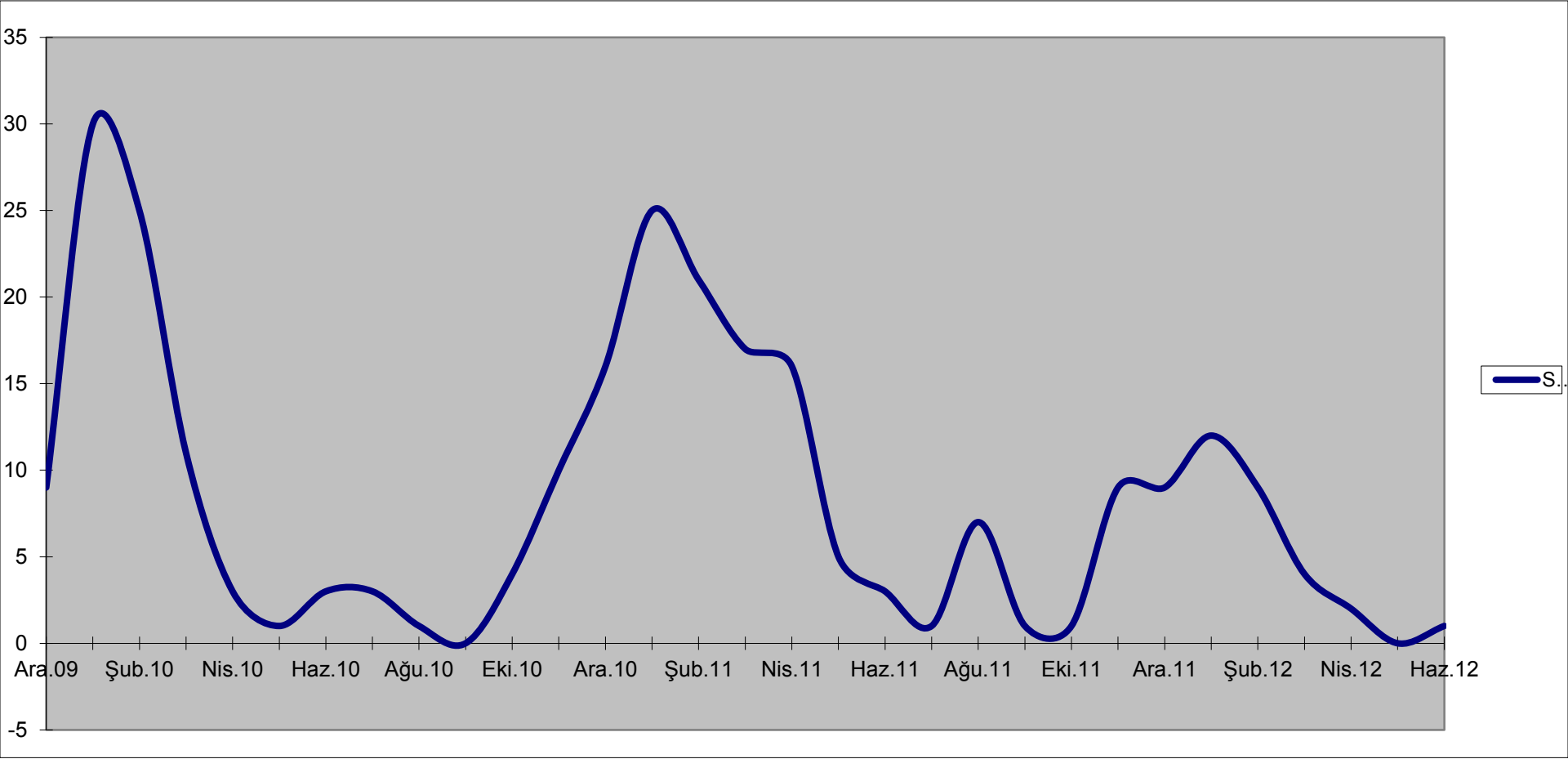
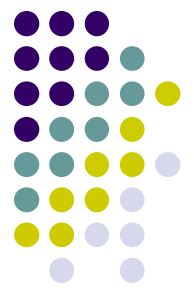


# Su Örneklerinden İzolasyon Yapılan İller

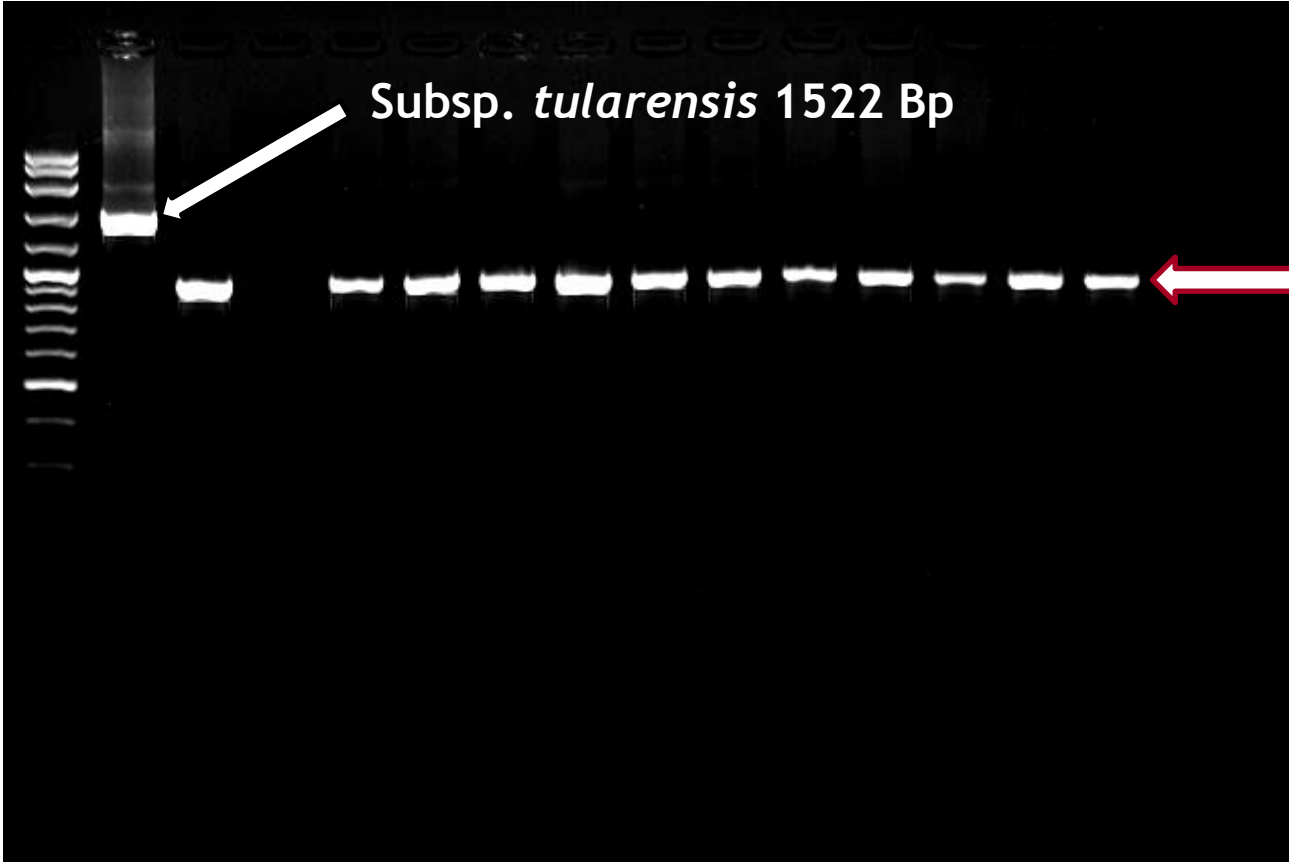
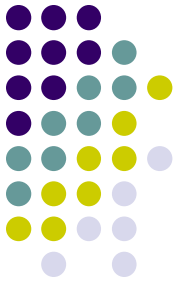




# İzolasyonların Aylara Göre Grafiği (2010-2012)



# RD1 Bölgesi PCR ile Alttür Ayrımı

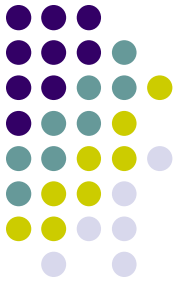


**Subsp. *holarctica*  
924 Bp**

**Subsp. *mediasiatica* 1453 bp**

**Subsp. *holarctica* biovar *japonica* 1135 bp**

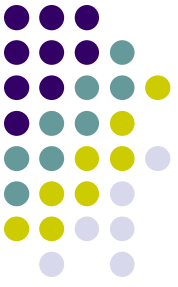
# İzolatlardan Alt Türleri (2009-2014)



- **264 izolat:**
  - *F.tularensis* subsp. *holarctica*: 263
  - *F.tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica*: 1
  
- **517 lenf Aspiratı:**
  - *F.tularensis* subsp. *holarctica*: 505
  - *F.tularensis* subsp. *holarctica* biovar *japonica*: 12



# SEROLOJİ (2009-2014)



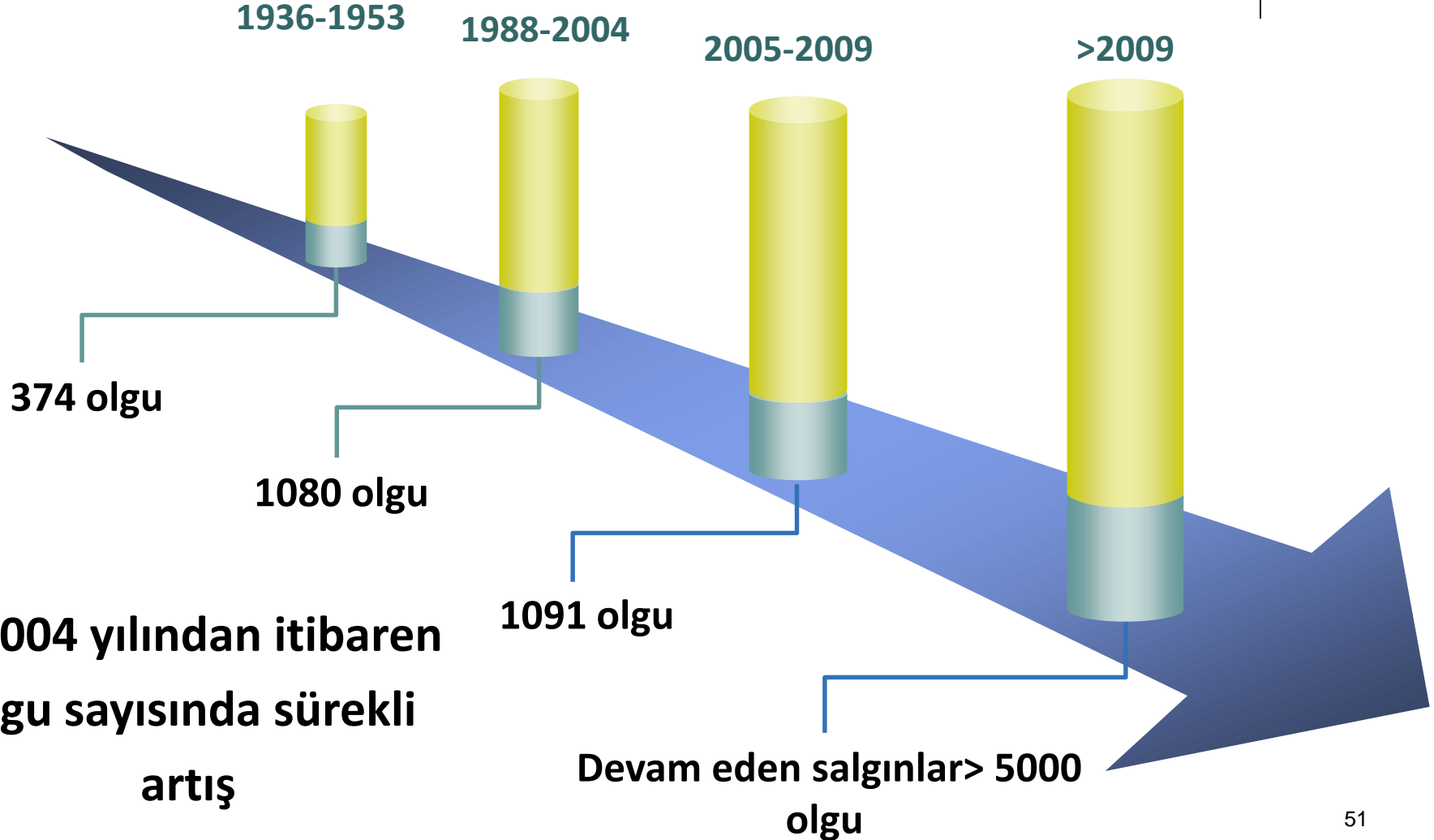
- Gönderilen serum örneđi: 23405

NEGATİF: 17476

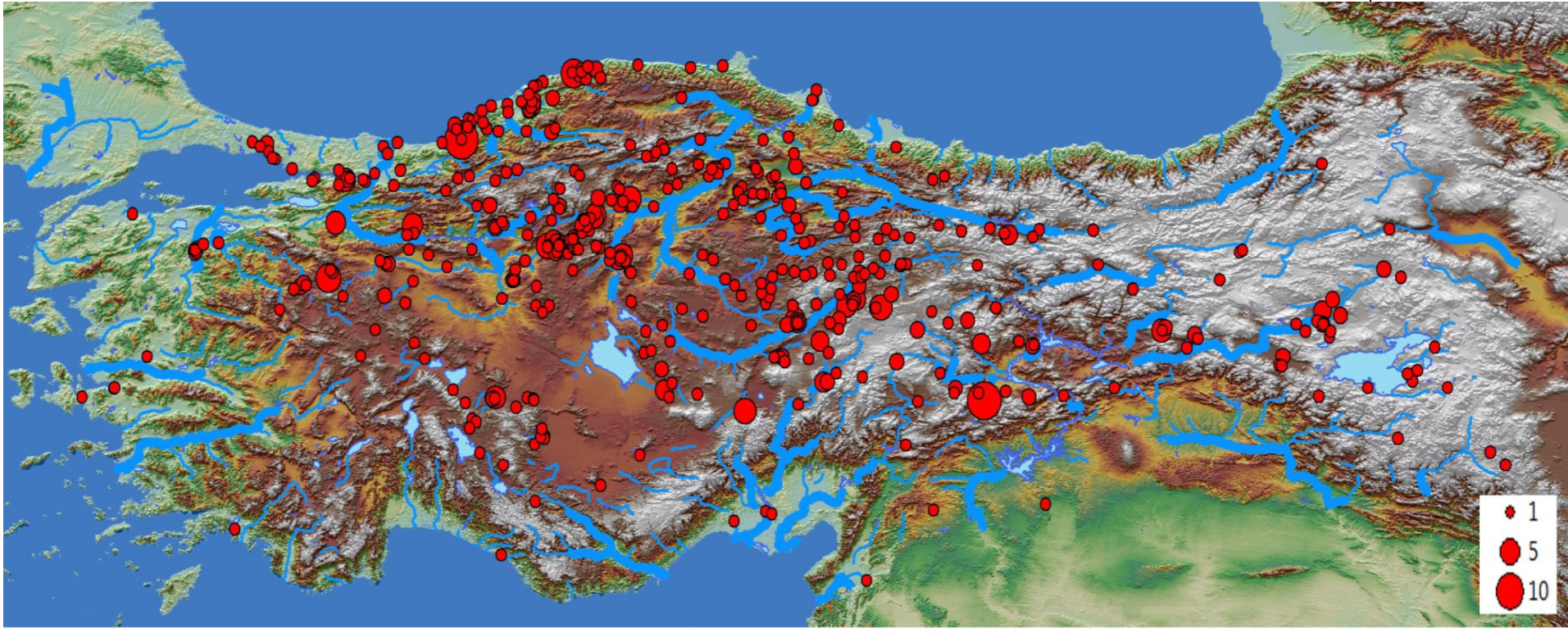
POZİTİF: 5929



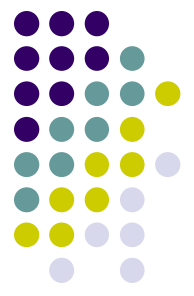
# Tularemi Olguları (1936-2013)



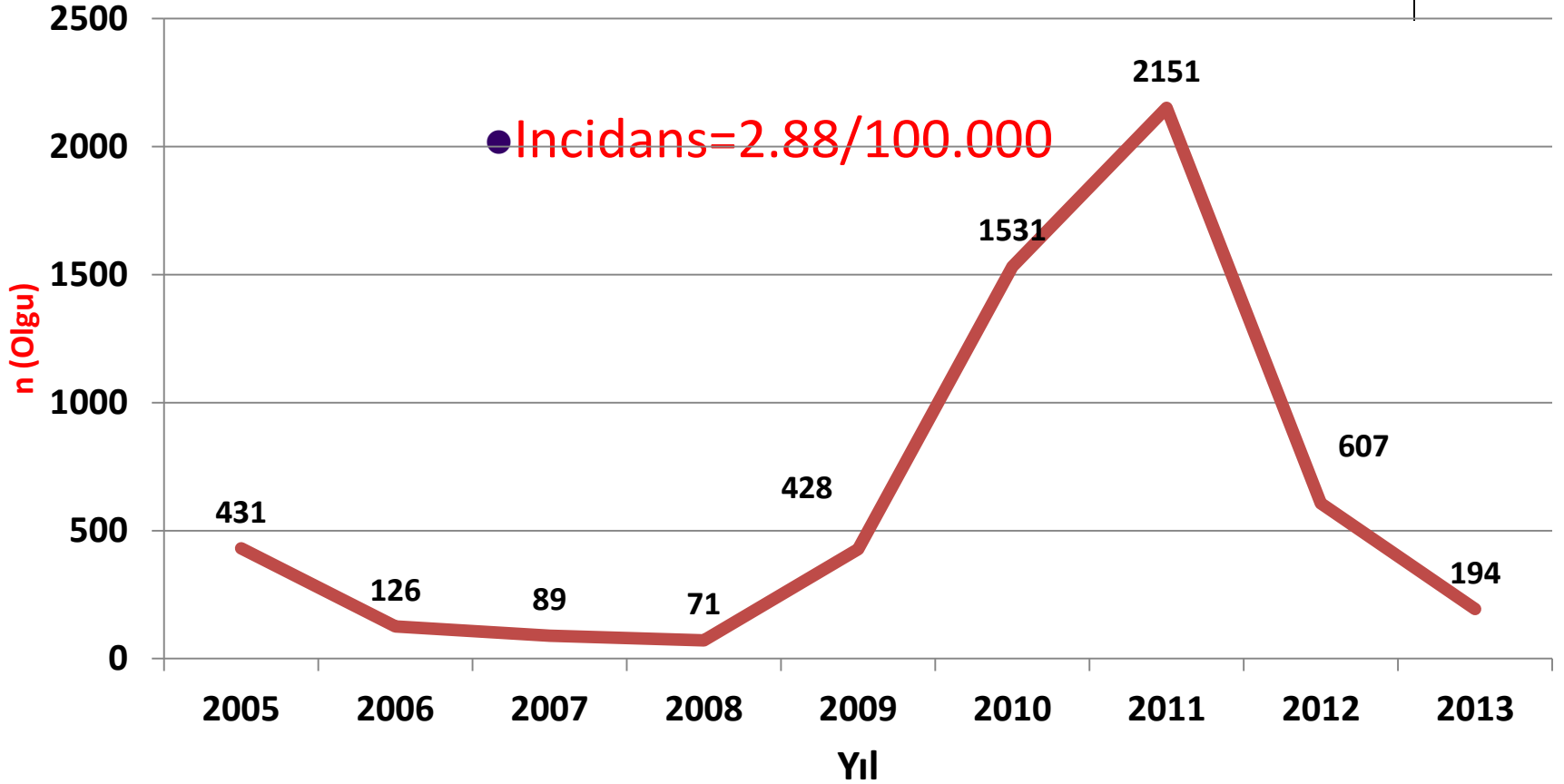
# Tularemi Olgularının Dağılımı. Bir Ön çalışma (n=607, 2012)



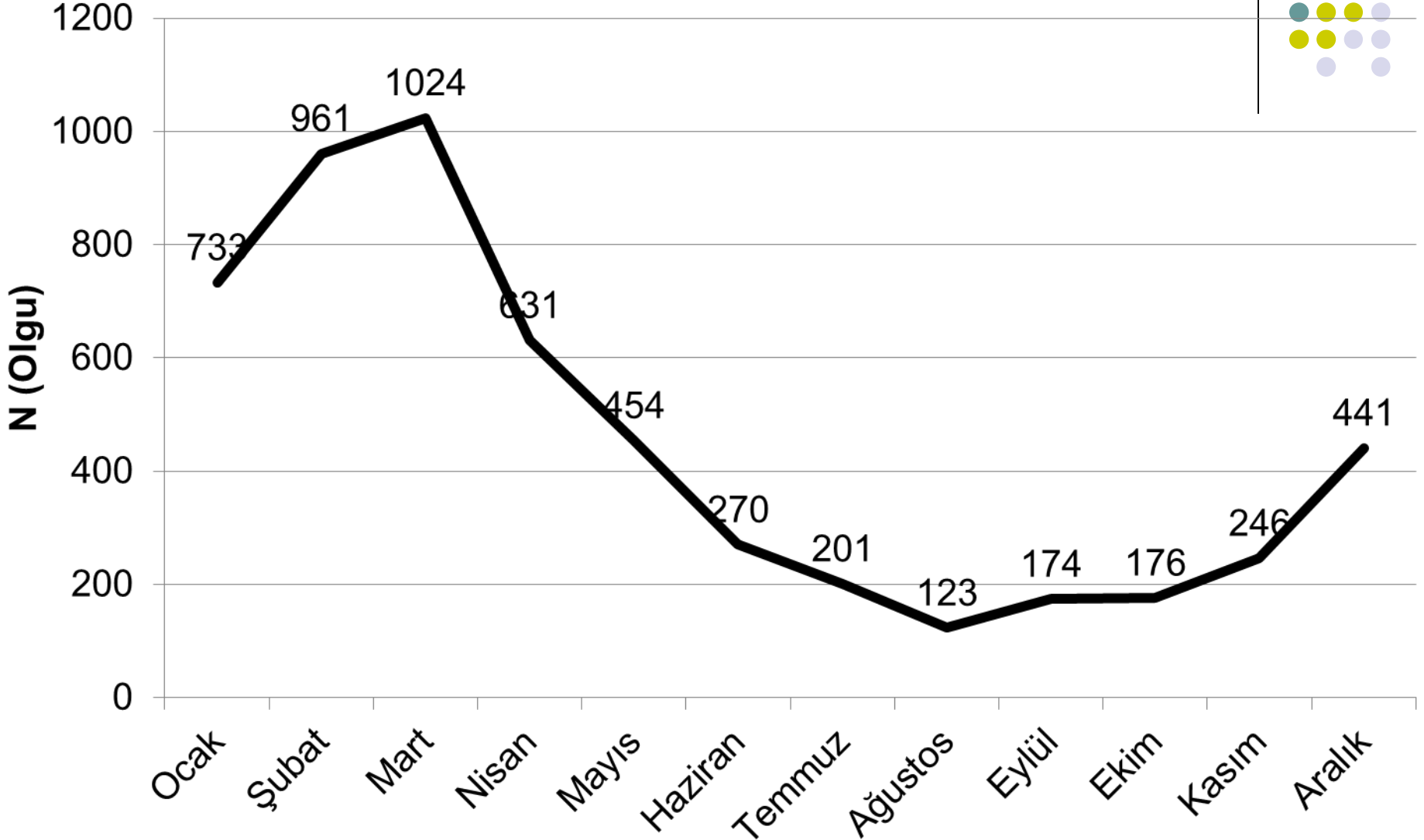
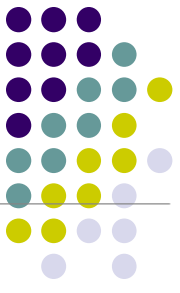
Tularemi nehir ve göller boyunca görülmekte...



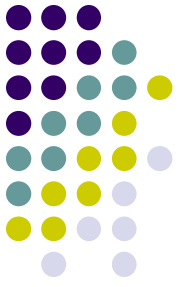
## Tularemi Olgu sayıları (2005- 2014)



# Mevsimsel Dağılım (2005-2012)

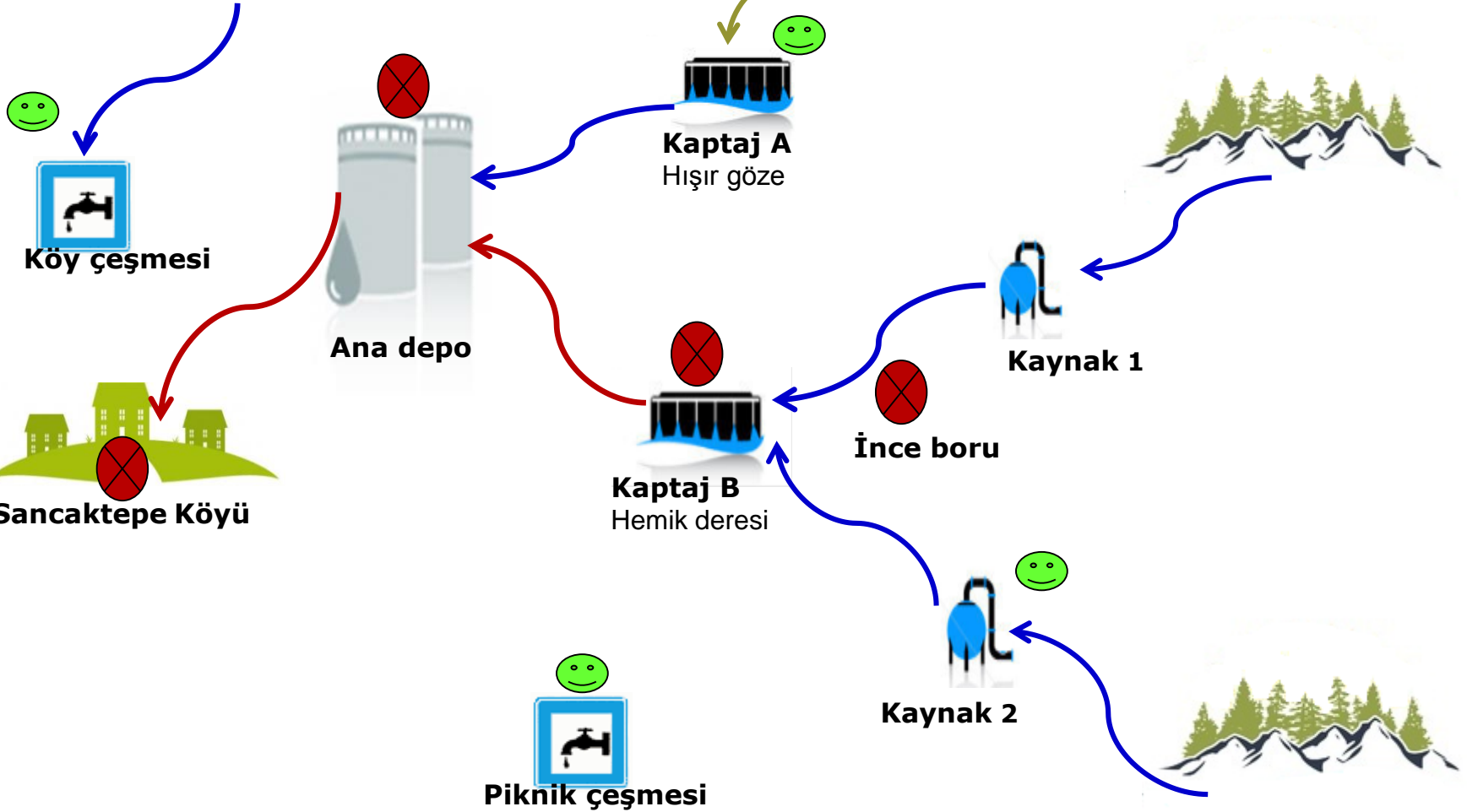
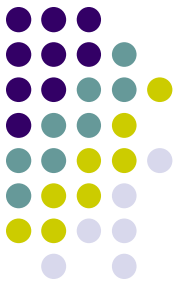


# Bayburt Salgını



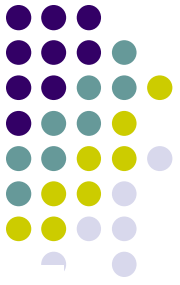
- **Seroloji**
  - 131 örnek MAT çalışıldı
  - 47 pozitif
  
- **Çevresel Örnek: Su Kültürü**
  - 28 Ağustos: 9 noktadan örnek
    - 5 nokta *F.tularensis*: NEGATİF
    - 4 Nokta değerlendirilemedi
  - 3 Eylül: 10 noktadan örnek
    - 6 nokta *F.tularensis* : NEGATİF
    - 4 Nokta değerlendirilemedi

# Sancaktepe Köyü 28 Ağustos su örnekleri





# Sancaktepe Köyü 3 Eylül su örnekleri



Kaptaj A



Kaynak 1



Kaynak 3



Kaynak 2



Ana depo

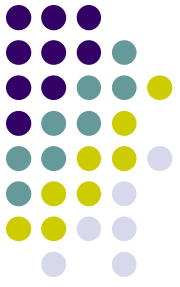


Sancaktepe Köyü

Kaptaj B



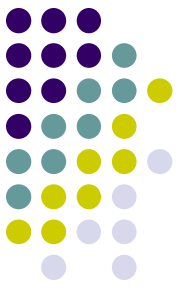
# Bayburt İçme Sularından İzolasyon Yapılamaması nedenleri



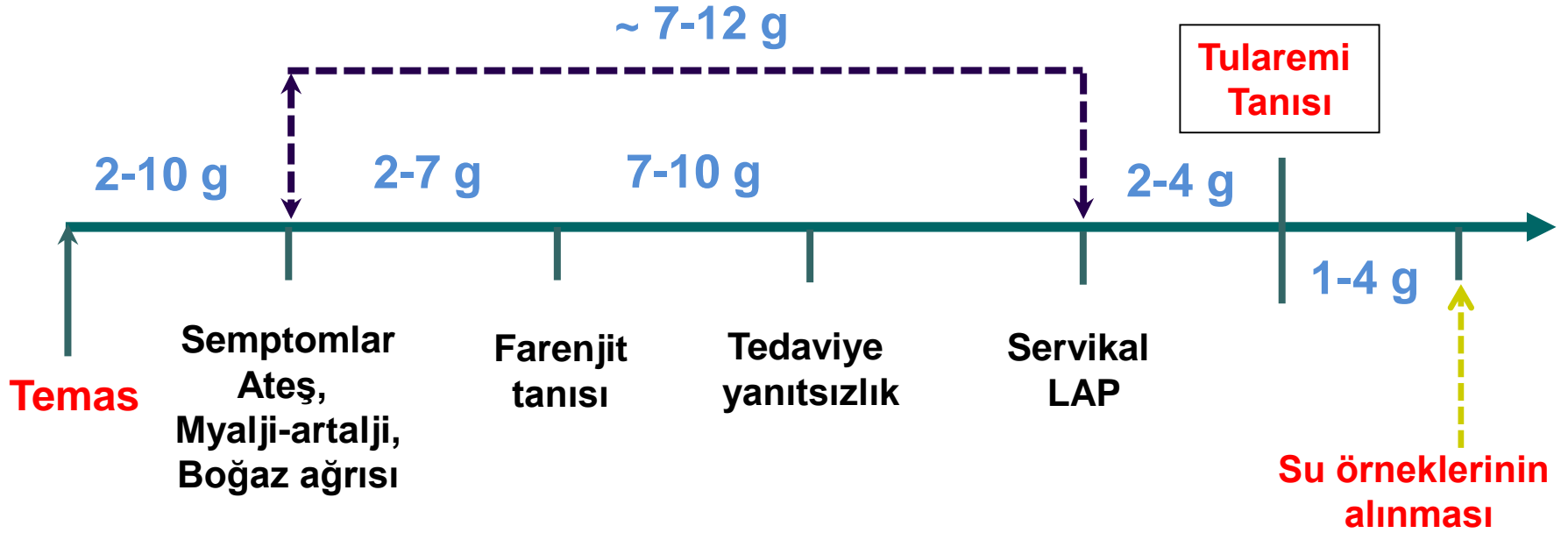
- Salgın başlangıcı muhtemel Temmuz başı
- Sulardan örnek alınma tarihi 28 Ağustos.
- Yaz döneminde bakterinin canlı kalma süresi kısalmalıdır
- Aşırı kirliliğe bağlı etkenin diğer bakterilerden dolayı üreme fırsatı bulmayabilir.



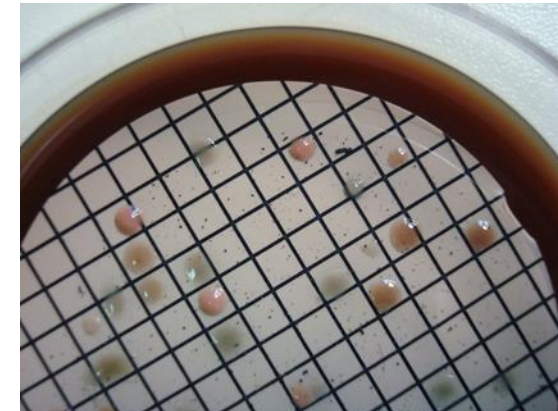
# Neden Sulardan İzolasyon Oranı Düşük?



## • Tularemi Temas-Tanı Zaman Çizelgesi



**Su örneklerinin alınma zamanı;**  
ilk olguların tanısının konulmasını takiben 1-4 gün sonra  
Genel olarak 'Temastan sonra en erken 13 günde'  
Bugüne kadar en erken 4. gün (Yozgat)





**Sağlık Bakanlığı**

**Türkiye Halk Sağlığı  
Kurumu**

**TEŞEKKÜRLER**