



Bu Proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti
tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi
(TR0802.16)

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları **BULAŞICI HASTALIKLAR LABORATUVAR TANI REHBERİ**

CİLT I

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ankara – 2014





Bu Proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti
tarafından finanse edilmektedir

Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi
(TR0802.16)

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

BULAŞICI HASTALIKLAR

LABORATUVAR TANI REHBERİ

Sendromik Tanı Yaklaşımı, Örnek Yönetimi, Test Prosedürleri ve Mikrobiyolojik Tanı/Tanımlama

CİLT I

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ankara – 2014



© T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
“Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”

Bu doküman; Avrupa Birliği tarafından finanse edilen, Dünya Sağlık Örgütü tarafından yürütülen “Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi (TR0802.16)” kapsamında bastırılmıştır. Sözleşme makamı, Merkezi Finans ve İhaleler Birimi’dir. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, bu Projenin yararlanıcısı olup dokümanın hazırlanmasına liderlik etmiştir ve dokümanın tüm hakları T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’na aittir. Kaynak gösterilmeksizin alıntı yapılamaz. Kısmen dahi olsa çoğaltılamaz ve yayımlanamaz. Alıntı yapıldığında kaynak gösterimi “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014” şeklinde olmalıdır. Ücretsizdir. Parayla satılamaz. Dokümanın içeriği hiçbir şekilde Avrupa Birliği’nin görüşlerini yansıtmamaktadır.

ISBN: 978-975-590-489-4

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934

Yayın tarihi: 15.04.2014

Baskı sayısı: 1000

Basım yeri: Ankara

Basım yılı: 2014

Baskı: Aydoğdu Ofset Matbaacılık Ambalaj San ve Tic Ltd Şti

Kapak fotoğrafı: Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı

Arşivi’nden alınmıştır.



Ulusal Mikrobiyoloji Standartları

BULAŞICI HASTALIKLAR

LABORATUVAR TANI REHBERİ

Sendromik Tanı Yaklaşımı, Örnek Yönetimi, Test Prosedürleri ve Mikrobiyolojik Tanı/Tanımlama

CİLT I

T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ankara – 2014

EDİTÖR

EFSUN AKBAŞ
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Danışman, Aydın

YARDIMCI EDİTÖRLER

HAKAN ABACIOĞLU
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Proje Danışmanı,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

SELİN NAR ÖTGÜN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları
Daire Başkanlığı, Ankara

ÖNEMLİ NOT

Bu Rehber

(Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi)
Tanı Standartları Çalışma Grupları tarafından hazırlanmış ve ön düzeltmeleri
yapılarak yayına hazırlanmış bir

TASLAK

dokümandır.

Eş zamanlı olarak THSK web sitesinde (bkz. www.thsk.org.tr) de kullanıma
sunulmuştur. Bu yayınlar yoluyla Rehber ilgili uzmanlık derneklerinin, Meslek
örgütlerinin ve sahadaki kullanıcıların görüşlerine de açılmış bulunmaktadır.
Alınacak geri bildirimlere göre son şeklinin verilmesi ve 2014 yılı sonu itibarıyla
onaylanmış “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları” belgesi olarak yayınlanması
hedeflenmektedir.

Rehber 3 yılda bir güncellenecektir.

YAZARLAR*

ALİ KUDRET ADİLOĞLU

Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

EFSUN AKBAŞ

Dünya Sağlık Örgütü, Proje Danışmanı, Aydın

NURHAN ALBAYRAK

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

AYŞE BAŞAK ALTAŞ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

GÜLAY ARAL AKARSU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Bilim Dalı, Ankara

ERDİNÇ ATABEK

Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

ŞÖHRET AYDEMİR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

ALPAY AZAP

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

ÖZLEM AZAP

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

NİHAL BABALIOĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara

CAHİT BABÜR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

EMRAH BAŞKAYA

Halk Sağlığı Laboratuvarı, İstanbul

MEHMET BAYSALLAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

HÜRREM BODUR

Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

GÜLENDAM BOZDAYI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

BEKİR ÇELEBİ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

GÜLDEN ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul

NEVRESTE ÇELİKBİLEK

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

YASEMİN COŞKUN

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

CANDAN ÇİÇEK

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İzmir

NİLAY ÇÖPLÜ

Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

GÜLNAZ ÇULHA

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, Hatay

DERYA DİRİM ERDOĞAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

FUNDA DOĞRUMAN AL

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ankara

MERT DÖŞKAYA

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

RIZA DURMAZ

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

RAİKA DURUSOY ONMUŞ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD, İzmir

MESTAN EMEK

Halk Sağlığı Laboratuvarı, Antalya

GÜL BAHAR ERDEM

Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara

HAKAN ERDEM

GATA Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

AYNUR EREN TOPKAYA
Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji AD, Tekirdağ

SELDA ERENSOY
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
İzmir

ÖNDER ERGÖNÜL
Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji AD, İstanbul

UFUK ERGÜN
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği,
Ankara

ARİFE ERTÜRK
Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü, Ankara

BERRİN ESEN
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji, Ankara

ALİ GÖKTEPE
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve
Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, Ankara

AYŞEGÜL GÖZALAN
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji, Ankara

ZEYNEP GÜLAY
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İzmir

DİLEK GÜLDEMİR
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

REVAŞİYE GÜLEŞEN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

DENİZ GÜR
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, Ankara

GÜL GÜRSEL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları AD,
Ankara

GÜLŞEN HAŞÇELİK
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, Ankara

UFUK HASDEMİR
Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma
Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul

TONAY İNCEBOZ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD,
İzmir

NİLGÜN KARABIÇAK
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ÜLKÜ KARAMAN
Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji AD,
Ordu

SELMA KARAAHMETOĞLU
Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları
Kliniği, Ankara

ONUR KARATUNA
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İstanbul

ABDULLAH KILIÇ
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Ankara

SELÇUK KILIÇ
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ÖZGÜR KORU
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Ankara

GÜLAY KORUKLUOĞLU
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

ALİ KÖSEKAHYA
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Daire
Başkanlığı

ÖZGÜR KURT
Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İstanbul

BELKIS LEVENT
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

DİLEK MENEMENLİOĞLU
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

KENAN MİDİLLİ
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji AD, İstanbul

ÖZLEM MİMAN
İzmir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD, İzmir

SELİN NAR ÖTGÜN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

MEHMET ALİ ÖKTEM
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İzmir

CÜNEYT ÖZAKIN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Bursa

BANU SANCAK
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, Ankara

ARZU SAYINER
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İzmir

NEVGÜN SEPİN ÖZEN
Halk Sağlığı Laboratuvarı, Antalya

CEMİLE SÖNMEZ
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

SERAP SÜZÜK
Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji
Laboratuvarı, Kırıkkale

HÜSNİYE ŞİMŞEK
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

MEHMET TANYÜKSEL
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Ankara

ANIL TAPISIZ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları AD, Ankara

AYŞEGÜL TAYLAN ÖZKAN
Hitit Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Çorum

MERAL TURAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

NİLDEN TUYGUN
Dr Sami Ulus Kadın Doğum, Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Acil,
Ankara

NİLAY UÇARMAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

SELMA USLUCA
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

YAVUZ UYAR
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji AD, İstanbul

NURVER ÜLGER
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, İstanbul

ZEHRA ÜNAL
Halk Sağlığı Laboratuvarı, İzmir

NİL ÜNAL
Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü, Ankara

CANDAN ÜSTÜN
Bayındır Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

DİLEK YAĞCI ÇAĞLAYIK
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

TÜLAY YALÇINKAYA
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans
Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara

FÜGEN YARKIN
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
AD, Adana

MİHRİBAN YÜCEL
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi
Mikrobiyoloji, Ankara

PINAR ZARAKOLU KÖŞKER
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon
Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD, Ankara

AYŞIN ZEYTİNOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
İzmir

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI ÇEKİRDEK GRUBU*

NURHAN ALBAYRAK
Tüberküloz, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

AYŞE BAŞAK ALTAŞ
Viral Solunum Yolu Patojenleri,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

DİLEK YAĞCI ÇAĞLAYIK
Akut Sendromik Yaklaşım,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

REVASİYE GÜLEŞEN
Bakteriyel Enterik Patojenler,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

NİLGÜN KARABIÇAK
Test Prosedürleri, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

SELÇUK KILIÇ
Bakteriyel Zoonotik
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

GÜLAY KORUKLUOĞLU
Viral Enterik patojenler ve
Döküntülü Hastalıklar,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

BELKIS LEVENT
Bakteriyel Enterik Patojenler,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

DİLEK MENEMENLİOĞLU
Viral Hemorajik Ateşler,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

AYŞEGÜL TAYLAN ÖZKAN
Parazitoloji, Hitit Üniversitesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
Çorum

SELİN NAR ÖTGÜN
Bakteriyel Solunum Yolu
Patojenleri, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

CEMİLE SÖNMEZ
Bakteriyel Cinsel Yolla Bulaşan
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

MERAL TURAN
Bakteriyel Solunum Yolu
Patojenleri, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

HÜSNİYE ŞİMŞEK
Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri,
MRLDB, Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu, Ankara

NİLAY UÇARMAN
Tüberküloz, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

SELMA USLUCA
Parazitoloji, MRLDB, Türkiye Halk
Sağlığı Kurumu, Ankara

TÜLAY YALÇINKAYA
Viral Cinsel Yolla Bulaşan
Enfeksiyonlar, MRLDB, Türkiye
Halk Sağlığı Kurumu, Ankara

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

PROJE DANIŞMANLARI

VARALAKSHMI ELANGO
Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Proje Danışmanı

HAKAN ABACIOĞLU
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Proje Danışmanı

EFSUN AKBAŞ
Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Danışman

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU YAYIN KOMİSYONU

HASAN IRMAK
Tüketici ve Çalışan Güvenliği Başkan Yardımcısı

MUSTAFA BAHADIR SUCAKLI
Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanı

NAZAN YARDIM
Obezite, Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Daire Başkanı

KANUNİ KEKLİK
Toplum Sağlığı Hizmetleri Daire Başkanı

TEŞEKKÜR

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu bu Rehberin hazırlanmasında görev alan ve emeği geçen herkese teşekkür eder.

İçindekiler

CİLT I

Kısaltmalar
Önsöz
Giriş
BAKTERİYOLOJİ

CİLT II

ENFEKSİYÖZ MADDE TAŞIMA REHBERİ
TEST PROSEDÜRLERİ
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ (UAMDS)

CİLT III

PARAZİTOLOJİ
VİROLOJİ
SENDROMİK TANI YAKLAŞIMI

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

CİLT I

BAKTERİYOLOJİ

Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

Solunum yolu patojenleri

- B-MT-01 Boğmaca
- B-MT-02 Difteri
- B-MT-03 *Neisseria meningitidis* enfeksiyonları
- B-MT-04 *Haemophilus influenzae* invaziv enfeksiyonları
- B-MT-05 *Streptococcus pneumoniae* invaziv enfeksiyonları
- B-MT-06 Lejyoner hastalığı

Enterik patojenler

- B-MT-08 *Salmonella* enfeksiyonları
- B-MT-09 *Shigella* enfeksiyonları
- B-MT-10 *Campylobacter* enfeksiyonları
- B-MT-11 EHEC enfeksiyonları
- B-MT-12 Kolera
- B-MT-13 Yersiniyoz
- B-MT-14 Listeriyoz
- B-MT-15 Botulismus

Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar (CYBE)

- B-MT-16 *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonları
- B-MT-17 Gonore
- B-MT-18 Sifiliz

Zoonozlar

- B-MT-19 Bruselloz
- B-MT-20 Şarbon
- B-MT-21 Tularemi
- B-MT-22 Q ateşi
- B-MT-23 Leptospiroz
- B-MT-24 Lyme hastalığı
- B-MT-25 Epidemik tifüs
- B-MT-26 Veba

CİLT II

ENFEKSİYÖZ MADDE TAŞIMA REHBERİ

GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

TEST PROSEDÜRLERİ

B-TP-01	Suğ saklama prosedürü	B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/ dihidrolaz testleri
B-TP-02	Bile-eskülin hidrolizi	B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler's) boyama
B-TP-03	Gram boyama	B-TP-15	Nitrat / Nitrit redüksiyonu testleri
B-TP-04	Hareket testi	B-TP-16	Oksidaz testi
B-TP-05	Hippurat hidrolizi	B-TP-17	ONPG testi
B-TP-06	IMVIC testleri	B-TP-18	Optokin duyarlılığı
B-TP-07	İndoksil asetat testi	B-TP-19	PYR testi
B-TP-08	Karanlık alan mikroskopisi	B-TP-20	Safrada erime testi
B-TP-09	Karbonhidrat fermentasyon/oksidasyonu	B-TP-21	Tuz tolerans testi (%6.5 NaCl'de üreme)
B-TP-10	Katalaz testi	B-TP-22	Üreaz testi
B-TP-11	KIA/TSI testleri	B-TP-23	X, V ve XV faktör gereksinimi
B-TP-12	Koagülaz testi		

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ (UAMDS)

AMD-TB-01	AMD testi hangi durumlarda yapılmalı, örnek yönetimi ve kavramlar
AMD-TB-02	Kullanılan standartlar ve farkları (CLSI, EUCAST)
AMD-TB-03	Antibiyogram yorumlama kriterleri ve kısıtlı bildirim kuralları

Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

AMD-MT-01	<i>Staphylococcus aureus</i> ve AMD testleri
AMD-MT-02	<i>Enterococcus faecalis/faecium</i> ve AMD testleri
AMD-MT-03	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ve AMD testleri
AMD-MT-04	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i> ve AMD testleri
AMD-MT-05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve AMD testleri
AMD-MT-06	<i>Acinetobacter baumannii</i> ve AMD testleri

Test Prosedürleri

AMD-TP-01	AMD testlerinde kullanılan besiyerlerinin hazırlanması
AMD-TP-02	McFarland opasite standardı hazırlanması
AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi
AMD-TP-04	MIK saptama yöntemleri

CİLT III

PARAZİTOLOJİ

Örnek yönetimi

- P-ÖY-01 Dışkı örneklerinin parazitolojik incelemesi
 P-ÖY-02 Diğer intestinal örneklerin parazitolojik incelemesi
 P-ÖY-03 Kan ve kemik iliği örneklerinin parazitolojik incelemesi

Mikrobiyolojik tanı/tanımlama

- P-MT-01 Amibiyaz (*Entamoeba histolytica* enfeksiyonları)
 P-MT-02 *Giardia intestinalis*
 P-MT-03 *Cryptosporidium* türleri
 P-MT-04 Kala azar
 P-MT-05 Şark çıbanı
 P-MT-06 Sıtma
 P-MT-07 Ekinokokkoz (kistik, alveolar)
 P-MT-08 Toksoplazmoz
 P-MT-09 Trişinoz
 P-MT-10 Şistozomiyaz (üriner)

Test prosedürleri

- P-TP-01 Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre)
 P-TP-02 Dışkı örneklerinin direkt mikroskopisi
 P-TP-03 Dışkı örneklerinin çoklaştıırma yöntemleri
 P-TP-04 Trikom boyama
 P-TP-05 Modifiye Kinyoun asit-fast boyama
 P-TP-06 Giemsa boyama
 P-TP-07 Kalın damla ve ince yayma

VİROLOJİ

- V-MT-01 Viral hepatitler
 V-MT-02 HIV enfeksiyonu
 V-MT-03 Norovirus enfeksiyonu
 V-MT-04 Rotavirus enfeksiyonu
 V-MT-05 Poliomyelit
 V-MT-06 Kabakulak
 V-MT-07 Kızamıkçık ve konjenital kızamıkçık
 V-MT-08 Kızamık ve SSPE
 V-MT-09 Suçiçeği
 V-MT-10 İnfluenza ve avian influenza
 V-MT-11 Viral hemorajik ateşler
 V-MT-12 Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA)
 V-MT-13 Hantavirus enfeksiyonları
 V-MT-14 Sarı humma
 V-MT-15 Batı Nil Virusu enfeksiyonu
 V-MT-16 Chikungunya ateşi
 V-MT-17 Kene kaynaklı ensefalitin (TBE)
 V-MT-18 Akut solunum yetmezliği sendromu (SARS)
 V-MT-20 Kuduz

SENDROMİK TANI YAKLAŞIMI

- SY-01 Akut ishal
 SY-02 Akut hemorajik ateş
 SY-03 Akut nörolojik sendrom
 SY-04 Akut respiratuvar sendrom
 SY-05 Akut sarılıklar

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Kısaltmalar ve Tanımlar

ABD / Amerika Birleşik Devletleri

aerosol / belirli bir kuvvet etkisi altında sıvıların (veya katıların) ortam atmosferine damlacıklar halinde dağılması veya saçılması. Laboratuvar da pek çok işlem sırasında açığa çıkabilen ve mikroorganizmaları da içeren enfeksiyöz aerosoller laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar için önemli tehlike kaynaklarından biridir. pipetaj, çalkalama, sert yüzeylere düşme, dökülme-saçılma, özeyi alevde yakma, özenin besiyerinde soğutulması, santrifüj, vorteks, liyofilize ampullerin açılması, pipetteki son damlanın üflenmesi aerosol üreten işlemler arasında sayılabilir.

AIDS / acquired immune deficiency syndrom

aliko / (i) kısım, (ii) bir çözeltinin toplam miktarının bir bölümü, (iii) bir bütünün temsili bir parçası (kütle veya volüm olarak)

AMD / antimikrobiyal duyarlılık

ARB / aside-rezistan bakteri

ATCC / American Type Culture Collections

BAL / bronkoalveolar lavaj

BGD / biyogüvenlik düzeyi. mikroorganizmaların risk sınıflaması temelinde dört laboratuvar biyogüvenlik düzeyi tanımlanmıştır; ajanların bulaşma, yayılma potansiyeli ve patojenlik arttıkça laboratuvar korunma düzeyi BGD1'den BGD4'e doğru artar. klinik mikrobiyolojide karşılaşılan ajanların büyük kısmı BGD2 laboratuvar şartlarının sağlanmasını gerektirmektedir.

BGK / biyogüvenlik kabini

bildirim / sağlık otoritesinin resmi iletişim kanalları ile vakalar veya salgınlardan haberdar edilmesi işlemi.

bildirimi zorunlu hastalık / yasal bir gereklilik ile uygun yetkide bir mercie (yerel veya merkezi sağlık otoritesi) rapor edilmesi zorunlu olan hastalık.

BOS / beyin-omurilik sıvısı

buffy-coat / santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katman

bulaş / doğrudan veya dolaylı olarak bir enfeksiyöz ajanın herhangi bir mekanizma ile başka bir konağa ulaşması.

bulaşıcı hastalık / bir mikroorganizma veya onun toksik ürünlerine bağlı olarak ortaya çıkan hastalıktır. etkenin, bir enfekte kişiden, hayvandan veya rezervuardan; hayvan konak, vektör veya cansız çevre aracılığıyla, doğrudan veya dolaylı olarak bir duyarlı konağa geçişiyle oluşur.

buyyon / sıvı besiyeri

CDC / Center for Disease Control and Prevention (Atlanta)

cfu / colony forming unit

CYBE / cinsel yolla bulaşan enfeksiyon

DFA / direkt floresan antikor (testi)

dk / dakika

DNA / deoksiribonükleik asit

DSÖ / Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

duyarlı kişi / bir birey veya hayvanın bir mikroorganizma ile enfeksiyon gelişimine açık olması (kural değilse de, genellikle mikroorganizmaya karşı spesifik koruyucu antikorların olmayışı konağın duyarlılığı için bir gösterge olarak değerlendirilir).

EDTA / etilen diamin tetra asetik asit

EIA / enzyme immuno assay (ELISA ile aynı anlamda)

ELISA / enzyme linked immunosorbent assay

eliminasyon / bir enfeksiyon etkeni yeryüzünden yok edilemese bile neden olduğu hastalığın görülmemesinin sağlanması.

EMB / Eozine-Methylene-Blue (Agar)

endemik / bir enfeksiyon etkeninin veya hastalığın belirli bir coğrafyada veya toplulukta sürekli görülmesi durumu. hastalığın o bölgede veya grupta alışılmış bir prevalansının olması da aynı mesajı verir.

enfeksiyon / bir organizmanın bir konakçıda (insan, hayvan, artropod) yerleşmesi, çoğalması ve genellikle bir immün yanıt oluşturmalarını tanımlar. klinik bir hastalık tablosuna neden olabilir veya olmayabilir.

ENIVD / European Network for Diagnostics of "Imported" Viral Diseases (http://www.enivd.de/ENIVD_P.HTM)

epidemi (salgın) / bir hastalığın veya sağlıkla ilişkili spesifik bir durumun belirli bir coğrafyada veya toplulukta beklenenden daha fazla sayıda görülmesi. salgın, bazı kaynaklarda, kısa zamanda hızla yayılan enfeksiyon anlamında da kullanılmaktadır.

eradikasyon / hastalığın etkeni ile birlikte yeryüzünden yok edilmesidir.

ETA / endotrakeal aspirasyon (sıvısı)

FITC / fluorescein isothiocyanate (floresan boya)

genişletilmiş bağışıklama programı (GBP) / difteri, boğmaca, tetanos, tüberküloz, kızamık ve çocuk felci standart bağışıklama programının maternal tetanos önleme ve yenidoğan hepatit B aşılamaları ile birlikte uygulamaya konan son durumu.

gerçek-zamanlı / 'real-time' (PCR)

HAV / hepatit A virüsü

HBV / hepatit B virüs
HCV / hepatit C virüsü
HDV / hepatit D virüs
HEV / hepatit E virüs
HIV / human immunodeficiency virüs
IFA / indirekt floresan antikor (testi)
IgA / immünglobulin A
IgG / immünglobulin G
IgM / immünglobulin M
IHA / indirekt hemaglutinasyon (testi)
IMViC / indol testi, metil kırmızısı testi, Voges-Proskauer ve sitrat testlerinin oluşturduğu ve bakteri tanımlamasında kullanılan bir biyokimyasal test paketini formüle eder. aradaki küçük "i" harfi ses uyumunu sağlamak üzere kullanılır.
ihbar / bazı bildirimi zorunlu hastalıklarda vaka veya salgın söz konusu olduğunda tanı koyan sağlık kurumundan yerel sağlık otoritesine durumun en kısa zamanda iletilmesi.
ilk tanımlama / mikroorganizmaların kültür vasatlarında üremelerini takiben bir test veya test grubu uygulanarak yapılan tanımlama (primer identifikasyon).
indeks vaka / bir toplulukta (aile, okul, bir coğrafi bölgede yaşayanlar gibi..) bir hastalığın topluma yayılmasına yol açan ilk vaka (diğerleri için enfeksiyon kaynağı olabileceğinden dolayı önemlidir).
insidans / belirli bir toplulukta belirli bir süre içinde bir hastalığa ait yeni vaka sayısının o toplumda risk altında bulunan nüfusa bölünmesi ile elde edilen hız (salgın incelemelerinde *atak hızı* olarak kullanılır).
invaziv / derin doku ve organlara ilerleyen ya da ilerleme yeteneğine sahip olan (mikroorganizma)
invaziv metot / örnek almak veya benzeri bir nedenle derin doku ve organlara ulaşmak için bir enstrüman (enjektör, endoskopi borusu, tüp vb) kullanıldığı metot
invazyon / derin doku ve organlara ilerleme
in-vitro / laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda
in-vivo / canlı ortamda ya da yaşayan koşullarda
KKD / kişisel koruyucu donanım. laboratuvar işlemleri sırasında enfeksiyöz materyale maruziyetten korunmak için personelin giymesi veya takması gereken önlük, eldiven gibi kıyafet/donanım.
koloni / bir bakteriden köken alan bakteri topluluğu.
kuru buz / kuru buz, karbondioksitin (CO₂) katı halidir. renksiz, tatsız ve kokusuzdur; -79°C sıcaklığa sahiptir. sıvı CO₂'den elde edilir, yüksek basınç altında saklanabilir. kuru buz mühürlü taşıyıcı kutularla satılır. kutu açıldıktan sonra, kalıplar 4-7 gün içinde tüketilmelidir. ortam ısı ile teması halinde sıvı faza geçmeden buharlaşır (süblimleşme). kuru buz, tamamen buharlaşana kadar geçen süre boyunca (~5 gün) materyalin donmuş olarak korunması için efektif ortam

sağlar. kuru buzda taşınması gereken enfeksiyöz materyalin nasıl paketleneneğine dair yeterli bilgi için ilgili rehbera bakılmalıdır (UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

kümelenme / hastalıkların belirli bir yer veya grupta beklenenden daha yüksek sayıda ortaya çıkması

laboratuvara dayalı sürveyans / belirli bir organizmanın laboratuvarında izolasyonu veya tanımlanması verisini başlangıç noktası olarak alan sürveyans (örn. salmonelloz sürveyansı..)

LP / lomber ponksiyon

morbidite hızı / her yüz bin popülasyonda, bir hastalığın etkilediği birey sayısı

mortalite hızı / her yüz bin popülasyonda, bir hastalıktan ölen birey sayısı

MRDLB / Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı (THSK'nın)

NAAT / nükleik asit amplifikasyon testleri

nested / yuvalama (PCR işleminde)

normal flora / deri, ağız- burun mukozası gibi vücut bölgelerinde normalde bulunan mikroorganizma topluluğu.

nozokomiyal enfeksiyon (hastane-kaynaklı enfeksiyon) / bir hastane ya da tıbbi kuruma başvuru sırasında herhangi bir enfeksiyon belirtisi yokken veya hastalığın inkübasyon süresi içinde olmadığı bilinen bir bireyde hastaneye yatıştan sonra ortaya çıkan enfeksiyon.

OS / oda sıcaklığı

pasaj / saf kültür elde etmek veya diğer amaçlar için bir mikroorganizma kolonisinin ürettiği besiyerinden alınarak yeni bir besiyerine ekilmesi (subculture)

patojenite / bir enfeksiyöz ajanın duyarlı bir konakta hastalık oluşturma yeteneği (*bazı patojen olmayan ajanlar da immün sistemi yetersiz bir konakta patojenik hale gelebilir*)

PCR / polimerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)

PNL / polimorf nüveli lökosit

prevalans / belirli bir popülasyonda, yeni ve eski vaka ayırımı yapmaksızın, bir hastalık için hasta bireylerin tümünün, o toplumda risk altında bulunan nüfusa bölünmesi ile elde edilen hız.

real time PCR / gerçek-zamanlı PCR (rPCR)

referans laboratuvar / bir enfeksiyon etkeninin araştırılmasında tanıya yardımcı tüm teknikleri kullanabilen, söz konusu etken ile ilgili uzun dönemli bilgi ve deneyime sahip, gerektiğinde aynı çalışmaları yürüten uluslararası laboratuvarlarla işbirliği yapan, gerektiğinde epidemiyolojik araştırmalar için ulusal sağlık otoritesine (sağlık bakanlığı) uygun teknikler ile veri sağlayan, ulusal laboratuvar.

rezervuar / bir enfeksiyöz ajanın normal olarak bulunabileceği ve çoğalabileceği (ve diğer konaklar için enfeksiyon kaynağı olabilecek) kişi, hayvan, toprak veya çevredir.

RNA / ribonükleik asit

RT-PCR / revers transkriptaz PCR

rutin sürveyans / bir hastalığı veya sağlık olayını

izlemek için ihtiyaç duyulan bilginin düzenli ve sistematik olarak toplanmasıdır.

sa / saat

sendrom / her birinin tek başına bulunmasına kıyasla daha çok sıklıkla bir arada bulunması ile tanıya götüren semptomlar ve/veya bulgular kompleksi

sendromik bildirim / sürveyans altındaki bir sağlık olayının, spesifik bir hastalık tanımına göre değil, sendrom temelinde yapılmış bir vaka tanımına göre bildirilmesi (ör., akut hemorajik ateş sendromu, üretral akıntı sendromu, genital ülser sendromu...)

sentinel sürveyans / bir hastalık için olguların erken saptanması veya eğilimler hakkında gösterge sayılabilecek bilgiye ulaşılmasında; verilerin - toplumun kalan kısmındaki duruma işaret edecek şekilde- bir temsili nüfustan toplandığı sürveyans tipi (ör., influenza virüs yapısının takip edilmesi veya aşının doğru antijenleri içerip içermediğinin kontrol edilmesinde influenza için bir kaç ildeki hastanelerin kullanılması ile yapılan sürveyans)

SF / serum fizyolojik

sn / saniye

soğuk zincir / biyolojik bir maddenin bir yerden başka bir yere gönderilmesi, taşınması ve geçici süre ile saklanması esnasında tüm aşamalarda aksi belirtilmedikçe 2°-8°C (buzdolabı/buzluk ısı koşulları) ısı aralığı içinde tutulması

SPS / sodyum polyanetol sülfonat

SSS / santral sinir sistemi

sürvey / bilginin sistematik olarak toplandığı bir araştırmadır. genellikle belirlenmiş bir toplulukta, belli bir zaman aralığında yürütülür. (sürveyanstan farklı olarak süreklilik arz etmez; bununla birlikte, eğer düzenli tekrarlanıyorsa, bir sürveyans sisteminin temelini sürveyler oluşturabilir)

sürveyans / verilerin sistematik olarak toplanması, biriktirilmesi ve özellikle elde edilen sonuçlara göre harekete geçecek kişiler başta olmak üzere bu sonuçlara ihtiyacı olan birimlere zamanında geri bildirimini sağlayacak şekilde verilerin değerlendirilmesi sürecidir. *aktif sürveyans*: sürveyans sisteminde bildirim yapmakla yükümlü kişi veya birimlerin kendiliğinden rapor etmesini beklemeksizin, yetkili birimlerce düzenli olarak verilerin toplanması; *pasif sürveyans*: katılımcılardan aktif olarak veri toplanmayan, bildirimin kendiliğinden yapılmasının beklendiği sürveyans sistemi.

temaslı / enfekte bir kişiyle, hayvanla veya kontamine çevreyle, o enfeksiyonu edinme olasılığı doğuran bir ilişkisi olmuş kişi veya hayvan.

THSK / Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Sağlık Bakanlığının yeniden yapılanması kapsamında, başlıca, eski adı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı olan kurum ile eski adı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü olan birimleri bir çatı altında toplayan yapı)

TTA / transtrakeal aspirasyon (sıvısı)

UAMDS / Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı

UMS / Ulusal Mikrobiyoloji Standardı

UV / ultraviyole (ışık)

vaka / sürveyans amaçları veya salgın için yapılmış bir vaka tanımı ile uyumlu bir hastalığa ya da sağlık sorununa sahip kişi (sürveyans veya salgın araştırma amacı için yapılmış bir vaka tanımının geleneksel klinik tanımlamalarla aynı olması bir gereklilik değildir).

vaka bazlı sürveyans / her bir vakaya ait spesifik verinin toplanması yoluyla bir hastalığın sürveyansı (örn. poliomiyelit sürveyansında AFP vakalarına ait detaylı bilgi toplanması)

vaka sınıflaması / kriterlerin destekleme derecesine göre "vaka" olma olasılığının derecelendirilmesi (örn., olası vaka, kesin vaka...) (bu, özellikle vakanın çok erken bildirilmesi gerekli durumlar (ebola hemorajik ateş v.b.) için ve kesin tanısının konulmasında güçlük olan (karmaşık laboratuvar testleri gerektiren v.b.) durumlar için kullanışlıdır).

vaka tanımı / belli bir hastalığın sürveyansı veya salgın araştırma amaçları için bir bireyin bir "vaka" olarak tanımlanabilmesinde bir arada bulunması gereken tanısal kriterler seti (vaka tanımları; kişi, yer ve zaman elemanlarıyla birlikte, klinik kriterler, laboratuvar kriterleri veya bunların bir kombinasyonu şeklinde olabilir).

virülans / konağın dokularına invazyon yeteneğine ve/veya neden olduğu hastalığın şiddetine göre, bir enfeksiyöz ajanın patojenite derecesinin ölçüm değeri.

VTM / viral transport medium

WHO / World Health Organization

zoonoz / hayvanlardan insanlara doğal koşullar altında geçebilen enfeksiyon hastalığıdır. endemik (enzootik) veya epidemik (epizootik) olabilir.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

ÖNSÖZ

Bulaşıcı hastalıkların, insanlık tarihi boyunca hem bireyleri hem de toplumları etkileyerek ciddi sağlık tehdidi oluşturdukları bilinmektedir. Bulaşıcı hastalıkların küresel boyutta kontrol altına alınması, ulusal düzeylerde uygulanan kontrol programlarının başarısına bağlıdır. Bu nedenle ‘güvenilir’, ‘doğru’ ve ‘zamanında’ veri toplanması önem kazanmaktadır. Sürveyans ve kontrol programlarına veri sağlayan en önemli kaynaklardan biri ise laboratuvarlardır.

Ülkemizde bulaşıcı hastalıkların sürveyansı ve kontrolüne yönelik çalışmalar mevzuat ile düzenlenmiş olup sistemin kanıta dayalı işlemesi esas alınmıştır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, kanıta dayalı bilgi üretmeleri nedeniyle ulusal sürveyans sisteminin vazgeçilmezi konumundadır. Ülkelerin laboratuvar tanı kapasitelerinin güçlendirilmesi, Uluslararası Sağlık Tüzüğü (2005)’nün 2007 yılından itibaren Dünya Sağlık Örgütü’ne taraf üye ülkelerde yürürlüğe konması ile birlikte, ayrıca önem kazanmıştır.

“Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi” kapsamında Başkanlığımız Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı tarafından ulusal laboratuvar tanı kapasitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar; bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıkların mikrobiyolojik tanısında geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına gereksinim olduğunu göstermektedir. Projenin en önemli faaliyetlerinden biri “Mikrobiyoloji Laboratuvarı Performans Kalitesinde Sürekli İyileştirme Sağlanması ve Kalite Güvence Kılavuzları ile İşlemlerinin Desteklenmesi”dir. Bu çerçevede ülkemizde laboratuvar tanı kapasitesinin geliştirilmesi amacıyla “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” oluşturulmuştur.

Bu Rehber, bulaşıcı hastalıkların kesin tanısı ve erken uyarı-yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı tehditlerinin araştırılmasında geçerli tekniklerin, geçerli teknik adımlarla uygulanması için yol gösterecek, ‘güvenilir’, ‘doğru’ ve ‘zamanında’ sonuçlar elde edilmesine hizmet edecektir.

“Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”nin oluşturulmasında görev alan ve emeği geçen herkese teşekkür eder, çalışmalarında başarılar dileriz.

Prof. Dr. Seçil ÖZKAN
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanı

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

GİRİŞ

Laboratuvardan çıkan sonuç öncelikle 'hasta yararı'nı ilgilendirir. Doğru, güvenilir ve zamanında tanı hasta bireyin en kısa sürede uygun tedaviyi almasının güvencesidir. Laboratuvarın sonuçları 'hastalıklarla mücadele'yi de yakından ilgilendirmektedir. Zira laboratuvarlardan sunulan veriler sayesinde halk sağlığını tehdit eden sorunlara kanıta dayalı çözümler üretilebilir.

Bulaşıcı hastalıkların sürveyansı ve kontrolünde doğru, güvenilir ve zamanında veri toplanması son derece önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları sürveyans sistemine veri sağlayan temel yapılardan biridir. Ulusal mevzuatımız ve Uluslararası Sağlık Tüzüğü sistemin kanıta dayalı işlemlerini kaçınılmaz kılmakta, bu da tanı kapasitesinin geliştirilmesi gereğini beraberinde getirmektedir.

Avrupa Birliği fonlarından desteklenen ve Dünya Sağlık Örgütü'nün teknik danışmanlığında yürütülen "Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi" kapsamında ulusal laboratuvar tanı kapasitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar bildirimi zorunlu bulaşıcı hastalıkların tanısında geçerli yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına gereksinim olduğunu göstermiştir.

REHBERİN AMACI

Elinizdeki Rehber (Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi) bu gereklerden doğmuş; doğru ve güvenilir tanı için *geçerli* yöntemlerin kullanımının yaygınlaştırılması ve ülkemizin mikrobiyolojik tanı kapasitesinin geliştirilmesi amacıyla oluşturulmuştur.

Rehberin bulaşıcı hastalıkların kesin tanısı ve erken uyarı/yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı tehditlerinin araştırılmasında *geçerli* tekniklerin *geçerli* adımlarla uygulanmasına yol göstereceği öngörülmektedir. Rehberden beklenen diğer önemli etki de, tanıda laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamasıdır. Ayrıca hastalık kontrol programlarına doğru ve güvenilir veri sunulması sayesinde, etkin kontrol önlemlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Rehberin kurumlar ve sektörler arası iletişim ve işbirliğinin güçlenmesine de katkı sağlayacağı umut edilmektedir.

REHBERİN HEDEF KİTLESİ

Rehberin başlıca dört farklı hedef gruba hizmet edeceği düşünülmektedir.

- 1 Öncelikle sahada klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında nihai karar sorumluluğu olan profesyonellere - tanıda standart yaklaşımları sunan bir kaynak olarak (gerektiğinde detaylı uzman görüşüne ayrıca başvurulmalıdır);
- 2 Hekimlere - laboratuvar hizmetlerinin standardı ve uygun testlerin seçimi /

talep edilmesi hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;

- 3 Halk sağlığı otoritelerine – özellikle halk sağlığını yakından ilgilendiren enfeksiyon vakalarının ya da salgınların araştırılmasında, bir yandan olması gereken asgari laboratuvar kapasitesi hakkında bir yandan da 'kesin tanı'ya ulaşılması süreç ve süreleri hakkında bilgi sağlayan bir kaynak olarak;
- 4 Ödeme kurumlarına – 'kesin tanı'ya ulaşılmasında asgari standart mikrobiyolojik işlem paketleri hakkında bilgi sağlayan ve ücretlendirmelerin rasyonel bir çerçeveye içinde yapılmasına destek verecek bir kaynak olarak.

REHBERİN KAPSAMI ve OLUŞTURULMA SÜRECİ

Rehber; saydam, katılımcı, kanıta dayalı, sürdürülebilir ve kurumsal olma ilkeleri temel alınarak oluşturulmuştur. Bu çerçevede başlangıç olarak "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Yönergesi" yazılmış ve "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi"nin kapsamı belirlenmiştir. Kapsamda iki temel kategori ayırt edilebilir:

Birinci kategoride mikrobiyoloji laboratuvarlarının tanı süreçlerinde yararlanacağı standartlar yer almaktadır. Bu standartlar bildirim zorunlu enfeksiyon hastalıkları için mikrobiyolojinin ana dallarına göre -bakteriyoloji, viroloji ve parazitoloji olmak üzere- bölümlenmiş olup (i) örnek yönetimi ve (ii) mikrobiyolojik tanı/tanımlama, ve (iii) test prosedürleri belgeleridir.

Örnek yönetimi belgeleri klinik örneklerin seçimi ve uygun alınmasını; örneğin işlenmesine kadar geçen süre içinde özelliğini kaybetmeden korunmasını; alınması, taşınması ve işlenmesi sırasındaki güvenlik gereklerini ve örneğin işlenmesinde uygulanacak sistematik yaklaşımı açıklayan belgelerdir.

Mikrobiyoloji tanı/tanımlama belgeleri bildirim zorunlu hastalığın mikrobiyolojik tanısı veya patojen etkenin tanımlanmasında uygulanan ana işlem basamaklarını anlatan belgelerdir.

Test prosedürleri ise başlıca bakteriyolojide kullanılan tanımlama testlerinin yapılışını ayrıntılı olarak açıklayan, testin her seferinde ve farklı kişiler tarafından aynı biçimde yapılmasını sağlayan belgelerdir. Bu noktada belirtmek gerekirse; hem "test prosedürleri" başlığı altında verilenlerden, hem de diğer birçok UMS'nin içinde/ekinde yer alan prosedürlerden bildirim sistemi dışında kalan enfeksiyon hastalıklarının tanısında da laboratuvarların yararlanabilmesi hedeflenmiştir. Laboratuvarlar bunları örnek prosedür olarak diğer çalışmalarına uyarlayabilirler.

İkinci kategoride ise 'sendromik tanı yaklaşımı' belgeleri bulunmaktadır. Bu kategorideki belgeler ulusal sürveyans sisteminde yer alan ve erken uyarı/yanıt sistemini ilgilendiren halk sağlığı acillerine temel tanı yaklaşımının özetlendiği belgelerdir. Burada DSÖ'nün öngördüğü beş ana sendroma (akut gastroenterit, akut respiratuvar sendrom, akut hepatit/sarılık sendromu, akut nörolojik sendrom ve akut hemorajik sendrom) yönelik tanı algoritmaları verilmekte, bu algoritmalar doğrultusunda istenecek mikrobiyolojik incelemeler ve laboratuvara gönderilecek örnekler listelenmektedir. Sendromik Tanı Yaklaşımı belgeleri alanda çalışan hekimlere ve Halk Sağlığı Müdürlüklerine bu sendromlar karşısında olasılıkların hızla göz önüne getirilmesini sağlamak bakımından yol gösterici dokümanlar oldukları kadar, laboratuvarlara da bir sendrom ön tanısı ile gelen

örnekte hangi olasılıkları çalışmaya hazır olmaları gerektiği hakkında fikir vermesi beklenen “hazırlıklılık” dokümanlarıdır.

Rehberin oluşturulmasında bildirim zorunlu bulaşıcı hastalıklar listesi temel alınmıştır. Her etkenin/hastalığın ilişkili olduğu sendromlar, örnek yönetimi ve mikrobiyolojik tanı/tanımlama hususları ile tanıda kullanılan yöntemler ve bu yöntemlerin gerektirdiği biyogüvenlik düzeyleri belirlenmiştir. Takiben Rehberde yer alacak konu başlıkları belirlenmiş ve “Tanı Standartları Çalışma Grupları” oluşturulmuştur.

Çalışma Gruplarının konularında yetkin kişilerden oluşması hedeflendiğinden gruplara katılma kriterleri belirlenmiştir. Şu kriterlerden en az birini karşılayan uzmanlar Çalışma Gruplarına davet edilmişlerdir: (i) son beş yılda Pubmed/Türk Tıp Dizininde yer alan en az üç yayınının olması, (ii) kitap veya kitap bölümü yazmış olmak, (iii) Sağlık Bakanlığı'nın bilimsel komisyonlarında görev almak, (iv) KLİMUD veya TMC komisyonlarında görev almak, (v) Sağlık Bakanlığı, KLİMUD veya TMC'nin organize ettiği eğitimlerde eğitici olarak görev yapmış olmak, (vi) Tübitak projesi veya uluslararası projelerde yer almak, (vii) önceki yıllarda hazırlanan “Bildirim Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri” veya “Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Sahada Çalışan Hekimler için Laboratuvar Rehberi”nin yazılması ve gözden geçirilmesinde görev almış olmak.

Nihayet, Aralık 2013'te ‘Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Çalıştayı’nda 89 uzman, Rehber kapsamında bulunan 107 konu başlığını hazırlamak üzere 12 Çalışma Grubu halinde bir araya gelmişlerdir. Her bir üye bilimsel ilkeler doğrultusunda, mevcut bilimsel kanıt ve bilgiler ışığında ve kendi deneyimlerinden de yararlanarak üstlendikleri konu ile ilgili güncel ve geçerli dokümanlar geliştirmişlerdir.

Çalıştayı ardından dokümanlarda dil birliği ve bilimsel bütünlüğün sağlanması amacıyla yoğun bir gözden geçirme süreci yaşanmış, “UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” yayına hazır hale getirilmiştir. Rehber, eş zamanlı olarak THSK web sitesinde (bkz. www.thsk.org.tr) de kullanıma sunulmaktadır.

Rehber bu haliyle bir TASLAK dokümandır. Böylece ilgili uzmanlık derneklerinin, meslek örgütlerinin ve sahadaki kullanıcıların görüşlerine açılmış bulunmaktadır. Alınacak geri bildirimlere göre son şeklinin verilmesi ve 2014 yılı sonu itibarıyla de onaylanmış “Ulusal Mikrobiyoloji Standartları” belgesi olarak yayınlanması hedeflenmektedir.

REHBERİN KULLANIMI

“UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi” 3 ciltten oluşmaktadır.

Birinci ciltte “Bakteriyoloji” başlığı altında solunum yolu patojenleri, enterik patojenler, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve zoonozlara yönelik mikrobiyolojik tanı/tanımlama standartları yer almaktadır.

İkinci cilt enfeksiyöz madde taşıma rehberi, bakteriyolojik test prosedürleri ve antibiyotik duyarlılık test standartlarını içermektedir.

Üçüncü cilt ise “Parazitoloji”, “Viroloji” ve “Sendromik Tanı Yaklaşımı” bölümlerini kapsamaktadır. “Parazitoloji” bölümünde örnek yönetimi, mikrobiyolojik

tanı/tanımlama ve test prosedürleri yer alırken “Viroloji” bölümünde viral etkenlere yönelik mikrobiyolojik tanı/tanımlama standartları bulunmaktadır.

“UMS Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi”ne standartlar bir kodlama sistemi kullanılarak yerleştirilmiştir. Buna göre; bakteriyoloji “B”, viroloji “V”, parazitoloji “P” ile sembolize edilmektedir. Standart kategorisine göre ise sendromik tanı yaklaşımı “SY”, örnek yönetimi “ÖY”, mikrobiyolojik tanı/tanımlama “MT”, test prosedürleri “TP”, antimikrobiyal duyarlılık “AMD” olarak kısaltılmıştır. Kodlama sistemi yapılandırılırken ise önce dokümanın hangi mikrobiyolojik alana ait olduğunu belirtmek üzere “B”, “V”, “P”; ardından standart kategorisi ve numarası gelmektedir. Örneğin, bakteriyoloji grubundaki “Boğmacanın Mikrobiyolojik Tanısı”, “B-MT-01 Boğmaca” olarak kodlanmıştır.

Rehber modüler yapıdadır; bütünlüğü ve dokümanlar arasındaki bağlantı, atıflar yardımıyla sağlanmıştır. Örneğin “B-MT-02 Difteri” dokümanında ilgili diğer UMS dokümanlarına atıfta bulunulmuştur; bu atıflar da her belgenin sonunda “İlgili diğer UMS belgeleri” başlığı altında kod numaraları ve isimleri ile ayrıca listelenmiştir.

Günümüzde bilginin hızla değişen karakteri Rehberin sürekli gelişen “canlı” bir doküman olmasını bir bakıma zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle basılı materyalin yanı sıra THSK web sitesinde de yayınlanarak güncellemelerin paylaşılması amaçlanmaktadır. UMS.LabTaniRehberi@thsk.gov.tr adresinden bize ulaşabilir; içerik ve diğer hususlarla ilgili her türlü önerinizi ve eleştirinizi ileterek veya uygulamada karşılaştığınız sorunları paylaşarak Rehberin geliştirilmesine katkı sağlayabilirsiniz.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Boğmacanın (*Bordetella* sp enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-01
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikleri	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	8
1 Hedef mikroorganizmalar	8
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	8
3 Boğmaca bakterisinin kültürden izolasyonu	11
4 Boğmaca tanısında diğer yöntemler	16
5 Raporlama ve bildirim	17
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	18
7 Referans Laboratuvar	18
EKLER.....	19
Ek-1 Bordet Gengou agar (BGA) hazırlanması	19
Ek-2 Stok antibiyotik solüsyonu hazırlanması.....	21
Ek-3 CSM besiyerinin hazırlanması	23
Ek-4 CSM besiyerinde kahverengileşme	24
Ek-5 <i>Bordetella</i> spp lam aglütinasyon testi	25
Ek-6 <i>Bordetella</i> spp DFA testi	26
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	29
KAYNAKLAR.....	29

Kapsam ve Amaç

Boğmaca, *Bordetella pertussis*'in etken olduğu akut, bulaşıcı bir solunum sistemi enfeksiyonudur. Boğmaca ülkemizde bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer alır ve aşı ile önlenabilir bir hastalık olarak özel program yürütülmektedir (1,2,3,4). Tanı mikrobiyolojik incelemeye dayanır. Hem hasta yönetimi hem de süre giden bağışıklama programlarının etkinliğinin analizi bakımından vakalara kesin tanı konulabilmesi önem taşımaktadır. Kesin tanı *Bordetella* spp'nin kültürden izole edilmesi ile konur. Ayrıca PCR, DFA ve serolojik yöntemlerden de yararlanılabilir.

B. pertussis klasik mikrobiyoloji eğitiminin iyi bilinen mikroorganizmalarından biri olmasına rağmen ülkemizde az sayıda klinik laboratuvarın *B. pertussis* tanısı koyabiliyor olması dikkat çekicidir. 2012 yılında ülke genelinde laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçlarına göre, çalışmaya katılan 510 klinik mikrobiyoloji laboratuvarının sadece %2.1'i boğmaca tanısı koyabilmektedir (5).

Tanının sahada yaygın bir eğilimle klinikte karakteristik öykü ve fizik muayene bulgularına dayalı konuyor olması laboratuvar tanı kapasitesini sınırlayan faktörlerden biri gibi gözükmemektedir. Çünkü çoğu laboratuvar boğmaca tanısı için gereken kaynağı (iş gücü, maddi vb.) yetersiz örnek akışı olasılığı yüzünden verimli kullanamayacağını varsayarak ayırmamaktadır.

Ancak etkili bir eliminasyon ya da kontrol programı için laboratuvara dayalı tanı esastır. Program çerçevesinde, hekimlerin şüpheli vakaları laboratuvara yönlendirme konusunda giderek daha duyarlı hale gelecekleri düşünülürse, uygun bir laboratuvar tanı rehberinin el altında olması da ülke genelinde tanının yaygınlaşmasını teşvik edecek bir araç olarak önemli görünmektedir.

Bu nedenlerle bu UMS belgesinde klinik laboratuvarlara, boğmacanın tanısında yöntemlerin seçimi, tanıdaki yerleri ve doğru uygulanmaları için bir Rehber sunulması hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

BGA	Bordet-Gengou agar
C-BGA	Sefaleksimli Bordet-Gengou agar
CSM	Cyclodextrin solid medium
FHA	Filamentöz hemaglutinin
Fim 2, Fim 3	Fimbria 2, Fimbria 3
KKA	%5 koyun kanlı agar
MRLDB	Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
PT	Pertussis toksin

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Boğmaca, *Bordetella pertussis*'in neden olduğu her yaş grubundaki duyarlı bireyleri etkileyebilen, özellikle bebeklik döneminde ağır seyreden, akut bulaşıcı bir solunum sistemi enfeksiyonudur (6). Dünyada her yıl 20 milyon boğmaca vakasının gözlemlendiği ve çoğu küçük çocuklar olmak üzere yaklaşık 200.000 ölüme neden olduğu bilinmektedir (7). Görülme sıklığı, aşı ve antibiyotik öncesi dönemlere göre azalmış olsa da boğmaca halen tüm dünyada endemik olarak gözlenmekte ve her 3-5 yılda bir epidemilere yol açmaktadır (6,8).

Aşının koruyuculuğunun zamanla azalması nedeniyle ergenlik çağından itibaren erişkin popülasyondaki duyarlılığın arttığı, anneden bebeğe geçen koruyucu antikorların bebeği ilk aşı dozu uygulanana kadar yeterince koruyamayabileceği bilinmektedir. Duyarlı yaş gruplarındaki bu epidemiyolojik kaymanın yanı sıra son yıllarda hastalıkla ilgili farkındalığın artışı, tanıda gelişmiş tekniklerin uygulanması, suşların biyoevrimi ile yeni *B. pertussis* kökenlerinin ortaya çıkması, insidansdaki artışın önemli nedenleri arasında gösterilmektedir (8,9,10). Öte yandan boğmaca insidansının belirlenmesinde bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bunlar; hastalığın farklı gruplarda farklı görülüşü (ergen/erişkinlerde asemptomatik veya ılımlı enfeksiyon gözlenirken yeni doğan ve bebeklerde yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyon oluşabilmesi), karma enfeksiyonlar nedeniyle yanlış tanı konması, hastalıktan şüphelenme indeksinin düşük oluşu ve bazı bölgelerde laboratuvar tanı kapasitesinin yetersizliğidir (11,12,13).

Boğmaca bildirimi zorunlu bir hastalıktır (2,3). Sağlık Bakanlığı, Genişletilmiş Bağışıklama Programı kapsamında boğmaca hastalığının kontrolüne yönelik çalışmalar yürütmektedir (4). Öte yandan, ülkemizde oldukça az sayıda laboratuvar boğmaca kültürü yapma yeteneğine sahiptir. Çünkü uzun bir dönem boyunca boğmaca tanısında klinik bulgular yeterli kabul edilmiş, laboratuvara başvurulmamıştır. *B. pertussis* için tanı kapasitesi de bu durumdan olumsuz yönde etkilenmiştir. Son yıllarda yenilenen bulaşıcı hastalıklar bildirim sistemi bulaşıcı hastalıkların tanısında laboratuvarlara önemli bir rol vermektedir. Zira, aşılama etkinliğini, yüksek riskli bölgeleri ve salgınları öngörmek ancak iyi işleyen bir *laboratuvara dayalı* sürveyanstan elde edilen veriler ile mümkündür.

Mikroorganizmanın özellikleri

Boğmacanın etkeni olan *B. pertussis*, yalnızca insanlar için patojenik olan, küçük, aerobik, zor üreyen, hareketsiz, gram negatif kokobasil yapısında bir bakteridir. *B. pertussis*, izolasyonu için özel besiyerlerine ihtiyaç duyar, karbonhidratları fermente etmez, aminoasitleri okside eder.

Bakterinin en önemli virulans faktörleri arasında adhezinleri ve toksinleri yer alır. Adhezin olarak filamentöz hemaglutinin (FHA), Fim 2, Fim 3, pertaktin ve trakeal kolonizasyon faktörü; toksin olarak da pertussis toksin (PT), adenilat siklaz hemolizini ve sitotrakeal toksin son derece önemlidir. Bunlar; başlıca klinik belirti ve bulgular ile immün yanıtta sorumludurlar (6,14,15,16).

Klinik özellikleri

Bulaşma, enfekte bireylerin solunum salgılarının damlacık yoluyla yayılması sonucu oluşur. Hasta ile ev içinde temas eden bireylerden bağışık olmayanların %90 gibi büyük bir bölümü etkeni alabilir. Çocukluk çağı aşılama programlarının etkin bir şekilde uygulandığı gelişmiş ülkelerde bağışıklığın yaşla giderek azalması sonucunda, ergen ve erişkin bireyler boğmacanın önemli bir kaynağı haline gelmişlerdir. Bebekler ve küçük çocuklara hastalık, çoğu zaman kliniği atipik seyreden büyük kardeşleri veya ebeveynlerinden yayılmaktadır (6,16,17).

Boğmacanın inkübasyon periyodu genellikle 7-10 gün olup (ortalama 4-21 gün) nadiren 40 güne kadar uzayabilir. Tipik hastalığın seyri birbirini takip eden üç dönemden oluşur; kataral dönem (1-2 hafta), paroksizmal dönem (1-6 hafta) ve nekahet dönemi (haftalar veya aylar sürebilir) (1,6,16,17).

Kataral dönem boğmacanın burun akıntısı, gözde yaşarma, halsizlik ve düşük ateş gibi hafif üst solunum yolu enfeksiyonuna benzer belirtiler ile başladığı ve seyrettiği dönemdir. Bu dönemde hastalığın akla getirilmesi, olguların çevrede bilinen bir boğmaca hastası ile temas öyküsü olmadıkça, mümkün değildir. Kataral dönem birkaç günde tamamlanabileceği gibi iki haftaya kadar uzayabilir. Ardından kuru öksürük başlar ve çok geçmeden boğmaca için karakteristik şiddetli öksürük nöbetleri ile paroksizmal dönem gelişir. Bir günde 30'dan fazla öksürük nöbeti gelişebilmektedir. Bu dönemde bir dizi ekspiratuvar patlama tarzı öksürüğü tipik bir nefes alma sesi (whooping) takip eder. Öksürüğün şiddeti ile hasta siyanotik bir görünüm alır ve kusar. Karakteristik öksürük nöbetleri, pertussis toksinin etkisi ile oluşan bronşiyal sekresyonların ve kalın mukus plaklarının atılmasını sağlayan bir mekanizmadır. Kimi olgularda ve geceleri ortaya çıkan nöbetler bazen gürültü ve soğuk hava gibi faktörlerle artabilir. Ateş ya yoktur ya da hafiftir (6,16,17). Altı aylıktan daha küçük bebeklerde hastalık atipik seyredebilir; apne sık görülen belirtilerdendir ve tipik öksürük nöbeti yoktur. Bunun gibi, büyük çocuklar ve erişkinlerde de belirtiler atipik olabilir; inatçı bir öksürükle seyreden hastalıkta tipik nöbet bulunmayabilir.

Paroksizmal dönemde artan intratorasik ve intraabdominal basınç etkisi ile burun kanamaları, subkonjonktival kanamalar, peteşiler, subdural veya spinal epidural hematoma, umbilikal/inguinal herniler ve rektal prolapsus görülebilir. Sık kusma ve beslenememe sonucu malnütrisyon gelişebilir. Konvülsiyon, pnömoni, ensefalopati ve ölüm gibi ciddi komplikasyonlar ortaya çıkabilir (6,16,17).

Laboratuvar tanısı

Boğmaca hastalığının rutin laboratuvar bulguları özgül olmasa da bazı özellikler gösterir. Geç kataral ve erken paroksizmal dönemlerde hematolojik bulgular tipik olabilir. Mutlak lenfositozun gözleendiği bu tabloda toplam beyaz küre sayısı $100.000/\text{mm}^3$ 'e ulaşabilir. Öksürük şiddeti ile beyaz küre sayısı paralellik arz eder. Periferik yaymada lenfositler normal büyüklükte ve bu özellikleri ile büyük atipik lenfositlerin gözleendiği viral enfeksiyonlardan ayırt edilirler. Hastalık süresince hiperinsülinemi ve epinefrine azalmış bir glisemik cevap vardır.

Bu bulgular klinik belirtilerle beraber boğmacayı güçlü bir şekilde düşündürse de boğmacanın kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konabilir.

Bu nedenle olası vakaların hızlı bir şekilde ve geçerli tanı yöntemleri kullanılarak laboratuvarca doğrulanması, hem hastaların tanı ve tedavisinde hem de halk sağlığını korumaya yönelik önlemlerin bir an önce alınmasında son derece önemlidir. Laboratuvar doğrulamasının temelini şüpheli vakalardan alınan örneklerde patojen etkenin izolasyonu oluşturur. Bu da hastalığın kaynağının araştırılmasına dair yapılacak epidemiyolojik araştırma için son derece önemlidir.

Kültür

Boğmaca tanısında kültür 'altın standart'tır. Kültürün özgüllüğü %100 olmakla birlikte duyarlılığı çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu faktörler arasında hastalığın evresi, antimikrobiyal tedavinin başlanmış olması, örnek alma tekniği, örnek alırken kullanılan malzemenin özellikleri, örneğin laboratuvara ulaştırılma koşulları ve laboratuvarın deneyimi sayılabilir (6,14,15,16,17,18).

Bakteri başlıca nazofarinks epiteline yerleşip çoğaldığı için kültür amacıyla nazofarinks sürüntüsü ya da nazofarinks aspirasyon örneği kullanılır.

B.pertussis'in başarılı bir şekilde elde edilebilmesi için sürüntünün nazofarinksten özel eküvyon yardımıyla (ince sentetik uçlu, esnek tel saplı) alınması gerekir. İdeal olarak örnekler besiyerine hasta başında ekilmelidir. Eğer bu yapılamıyorsa mümkün olduğunca çabuk laboratuvara iletilmelidirler. Geçmişte -uygulama kolaylığının da bir sonucu olarak- en yaygın kullanılan teknik öksürtme plağı tekniği olmuştur. Ancak bakterinin izolasyon şansı çok düşük olduğundan günümüzde öksürtme plağı yöntemi çoktan terk edilmiştir (14,15,16).

B. pertussis güç üreyen bir bakteridir ve izolasyonu için özel besiyerlerine ihtiyaç duyulur. Aerobik koşullarda, nemli ortamda, 36°C'de, en erken 72 saatte koloniler saptanır. Ancak bazı durumlarda 7-10. güne kadar üremenin takip edilmesi gerekebilir (15,16,17,18).

Seroloji

Semptomatik adölesan ve erişkinlerde serokonversiyonun gösterilmesi tanısız değere sahiptir. Ancak, eğer akut ve konvalesan faz örnekleri alınamamış ise, tek serum örneğinde anti-PT IgG antikor seviyesinin >100 EU/mL olması da akut enfeksiyon veya son zamanlarda geçirilmiş enfeksiyon lehine kabul edilir.

Boğmaca şüpheli **aşısız** çocuklarda PT veya FHA'e karşı gelişen IgG ve IgA titrelerinde artışın gösterilmesi de tanısız değere sahiptir. Boğmaca şüpheli **aşılı** çocuklarda ise antikor titresindeki hızlı yükseliş nedeniyle antikor yanıtındaki belirgin değişikliği göstermek zordur (14,16).

Moleküler Yöntemler

Boğmaca tanısında PCR tekniğinin kullanımındaki artışa rağmen henüz boğmaca tanısı için standardize edilmiş, onaylı bir ticari PCR testi mevcut değildir.

Klinik örneklerden PCR pozitifliğinin yorumu değişkenlik gösterir. CDC, PCR'ın tek başına değil, kültür ile birlikte kullanılmasını önermektedir. Bu nedenle PCR sonucu; boğmaca ile uyumlu klinik tablonun varlığı, tedaviye yanıt ve epidemiyolojik kriterler göz önüne alınarak ve diğer laboratuvar sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmektedir (6,14,15,16,17,18).

Kültürü negatif olan veya kültür yapılmamış vakalarda PCR pozitifliği (solunum yolu sekresyonlarında bulunabilen bazı bakterilerin nükleik asitleriyle çapraz reaksiyon olasılığı nedeniyle) “**olası tanı**” bulgusu olarak kabul edilmektedir.

Kültürü negatif olan veya kültür yapılmamış bir vakada eğer akut faz serum örneğinde yüksek antikor titreleri saptanmış ise PCR pozitifliği güçlü bir şekilde boğmaca lehine yorumlanır. Bir **kesin vaka** ile (kültürle doğrulanmış vaka) epidemiyolojik ilişkili vakada PCR pozitifliği ise boğmaca için **kesin tanı** bulgusu kabul edilir (6,14,15,16,17,18). Bir diğer ifade ile, salgınlarda (kesin tanısı kültür ile konmuş en az bir vakanın varlığında) PCR pratik olarak diğer vakaların hızla teyit edilmesini sağlaması bakımından önemli bir araç olarak değerlendirilebilir.

DFA

DFA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça düşüktür ve kesin tanı koydurucu değildir. kültürün duyarlılığını etkileyen hemen hemen bütün faktörler DFA sonuçlarını da etkiler. Dahası çapraz reaksiyonları nedeniyle özgüllük düşük olabilir.

Kültürde üreme saptanmadığı durumda, DFA ile alınan pozitif sonucun hastanın klinik bulguları, epidemiyolojik bilgi ve diğer laboratuvar test sonuçları ile birlikte değerlendirilmesi gerekir (6,14,15,16,17,18).

Boğmaca tanısında kullanılan yöntemlerin özellikleri Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Boğmaca tanısında kullanılan yöntemlerin özellikleri (19 nolu kaynaktan uyarlanmıştır)

Test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Optimal zamanlama	Avantajları	Dezavantajları
Kültür	%12-60	%100	Öksürük başlangıcından sonraki ilk 2 hafta	Altın standart’tır. Kesin tanı koydurur. Salgın şüphesinde mutlak uygulanmalıdır.	Üreme için 7-10 gün gerekebilir.
PCR	%70-99	86-100	Öksürük başlangıcından sonraki ilk dört hafta	Hızlı sonuç verir. Kültürden daha duyarlıdır. Antibiyotik tedavisi sonrasında ölü bakterileri saptar.	Onaylı veya standardize bir test henüz yoktur. Potansiyel yanlış pozitiflik ve çapraz kontaminasyon sorunu vardır.
Seroloji-çift serum	%90-92	%72-100	Semptomların başlangıcında ve 4-6 hafta sonra	Hastalığın erken ve geç dönemindeki antikor titreleri karşılaştırılabilir.	Hastadan farklı dönemde iki örnek almayı gerektirir. Geç tanı konur. Onaylı veya standardize test henüz yoktur.
Seroloji-tek serum	%36-76	%99	En erken öksürük başlangıcından 2 hafta sonra, ideali öksürük başlangıcından 4-8 hafta sonra	Hastalığın geç döneminde kullanılabilir.	Onaylı veya standardize test henüz yoktur. Test değerleri, yakın zamanda yapılan aşılama ile karışabilir. Tanısal cut-off değerlerinin validasyon sorunu var.

Şüpheli boğmaca vakalarının laboratuvar tanısında kullanılacak yöntem hastanın yaşını ve immün durumunu dikkate alarak karar vermek gerekir (14). Buna göre;

- Bebeklerde; öncelikle kültür uygulanır. Kültürün uygulanamadığı durumlarda PCR tercih edilebilir. Serolojik incelemeye güvenilemez.
- Çocuklarda; kültür veya PCR kullanılır. Hastaya bir önceki yıl aşı uygulanmamış ise serolojik inceleme de yapılır.
- Yetişkinlerde; serolojik inceleme tercih edilir.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Bordetella pertussis, *Bordetella parapertussis*, diğer *Bordetella* spp.

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

B. pertussis Risk Grubu 2 organizmadır ve boğmaca şüpheli klinik örneklerle ilgili incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalıdır. Önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Solunum yolu örneklerinin kültüre veya diğer işlemlere hazırlanması başta olmak üzere aerosol oluşturması muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyogüvenlik kabini içinde yapılmalıdır (18).

Serolojik tanı için serum veya plazma örnekleri ile çalışılırken en ciddi risk personele kan-kaynaklı patojenlerin (HIV, hepatit etkenleri) bulaşma riskidir. Serum/plazma ayırma işlemi ve test yapılırken **daima** eldiven giyilmelidir.

Boyalı olsun, olmasın bütün lamalar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen boğmacadan şüpheleniyorsa **kültür için** örnekleri laboratuvara göndermeden önce, laboratuvarın gerekli hazırlığı yapabilmesi için laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Boğmaca tanısında örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Tercih edilen örnek nazofarinks sürüntüsüdür. Tanıda, öksürtme plakları ya da boğaz sürüntüsü kullanılmaz! Nazofaringeal veya bronş aspirat örnekleri idealdir ancak hastane ortamında uygulanabilir.
- Nazofarinks sürüntüsü bu amaç için üretilmiş, ince dakron veya kalsiyum-alginat uçlu, gövdesi kolayca esneyebilir tel şaftlı eküvyon ile alınır. Rayon veya pamuk uçlu eküvyonlar *B.pertussis* için toksik yağ asitlerini içeriyor olabilecekleri için kullanılmamalıdır! Rutin amaçlar için kullanılan ahşap veya naylon saplı eküvyonlar ile laboratuvara gelen örnekler de incelemeye kabul edilmez; çünkü bu tip eküvyonlarla nazofarinkse ulaşılması ve uygun örnek alınması mümkün değildir.
- Erişkinlerden alınacak balgam ve hastanın nazofaringeal kateterinin ucu da *B. pertussis* izolasyonunda örnek olarak kullanılabilirler.
- *B. pertussis* kuruluğa aşırı duyarlıdır ve yavaş üreyen bir bakteridir. Bu nedenlerle taşıma esnasında hem nemliliğin korunması hem de florada bulunan diğer organizmaların aşırı üremesinin önlenmesi gerekir. Dolayısı ile ideal olan alınan örneklerin hasta başında besiyerlerine ekilmesi ya da hemen laboratuvara iletilmesidir. Eğer bu mümkün değilse örnekler, 2 saate kadar oda sıcaklığında %1'lik casamino asit içinde, 24 saate kadar da yine oda sıcaklığında kömürlü Amies transport besiyerinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- En iyi sonuçlar öksürüğün ortaya çıkmasından sonraki 2-3 hafta içinde alınan örneklerden elde edilebilir. İdeali, olası bir vakadan hemen ve mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce örnek alınmasıdır.
- Laboratuvara gelen örnekler de en kısa sürede işleme alınmalıdır. Nazofarinks aspiratı gelmiş ise ikiye bölünerek bir kısmı PCR için test gününe kadar -20°C'de saklanabilir.
- Serum - serolojik tanı için kullanılır. Akut ve konvalesan fazlarda olmak üzere en az 2-4 hafta ara ile iki kez serum alınmalı ve gönderilmelidir. Ancak bu mümkün olmadığında tek serum örneği de gönderilebilir.

Besiyeri / Reaktif

- Bordet Gengou Agar (BGA) - *Bordetella* türlerinin izolasyonunda kullanılan temel besiyeridir. Ticari olarak temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (bkz. Ek-1A ve B).
- Sefaleksimli Bordet Gengou Agar (C-BGA): Solunum yolu florasında bulunan gram pozitif bakterileri inhibe etmek amacıyla BGA agara sefaleksin eklenerek hazırlanan seçici bir besiyeridir. Laboratuvarında hazırlanır (bkz. Ek-1C). Sefaleksin stok solüsyonu hazırlamak için de bkz. Ek-2.
- CSM besiyeri - Laboratuvarında hazırlanır (bkz. Ek-3)
- Genel besiyerleri - KKA, MacConkey agar, 'Nutrient' agar

- Biyokimyasal tanı için reaktifler – oksidaz, üreaz, nitrat testleri, sitrat utilizasyonu (bkz. "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- İzolatların serotiplendirmesi için antiserumlar - *B. pertussis* faz I antiserum ve *B. paraptussis* antiserum (bkz. Ek-5)
- İzolatların tanımlanması için *Bordetella* DFA reaktifleri (bkz. Ek-6)

Diğer gereç, donanım

Besiyeri hazırlamak için

- pH metre
- Manyetik karıştırıcı/ısıtıcı ('hot-plate') ve manyetik balıklar
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Erlen (10 mL, 25 mL, 500 mL, 2 L)
- Burgu kapaklı steril tüpler, pipet, steril pipet
- Membran filtre (enjektör tipi, polikarbonat, 0.2 µm) ve enjektör
- Steril Petri kabı (tek kullanımlık),

Kültür, mikroskopi ve diğer testler için

- Biyogüvenlik kabini, sınıf-IIA – eğer boğmaca kültürü yapılıyorsa
- Öze, steril, tek kullanımlık – kültür ekimleri, koloni pasajları vb. için
- İnkübatör, 36°C
- Pipetleme ekipmanı
- Vorteks (tüp ataçmanlı)
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - *objektifler* 40×, 100× immersiyon; *oküler* 10×; kolonilerden boyalı mikroskopik incelemeler için
- Floresan mikroskop - *objektifler* 40×, 100× immersiyon; *oküler* 10×; DFA testi için (opsiyonel)

2.4. Kalite kontrol

Besiyerleri

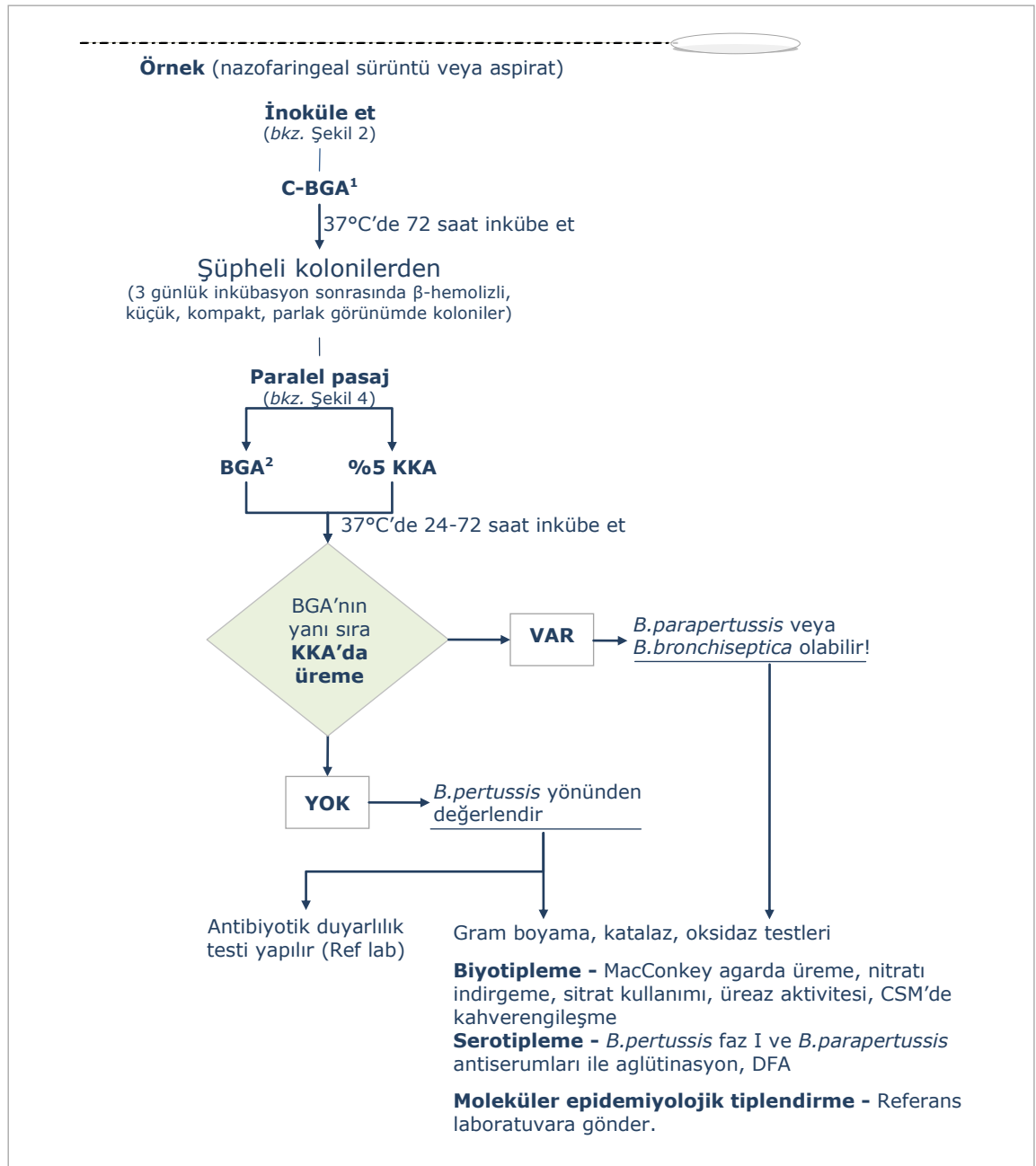
- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyerinde kuruma, çatlak vb. gözlenirse kullanılmamalıdır.
- Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir. Antimikrobiyaller zaman içinde yıkılabilir. Bu nedenle, antibiyotik içeren besiyerlerinin etkinliği de zamanla azalabilir.

Kitlere dayalı testler

- Her zaman kitin kontrol serumları/örnekleri kitte verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Laboratuvar kendi kalite kontrol serumlarına/örneklerine de sahip olmalı ve testlere dahil edilmelidir.
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kitin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine kaydedilmelidir.

3 Boğmaca bakterisinin kültürden izolasyonu

3.1. Kültürden izolasyon için genel akış şeması



Şekil 1. Nazofarinks örneklerinden *B. pertussis* izolasyonu ve tanımlanması için akış şeması

¹ Pertussis bakterisinin primer izolasyonu için CSM de kullanılabilir. Bu besiyeri 6 ay kadar uzun bir raf ömrü olması nedeniyle özellikle kaynakları sınırlı laboratuvarlar için idealdir.

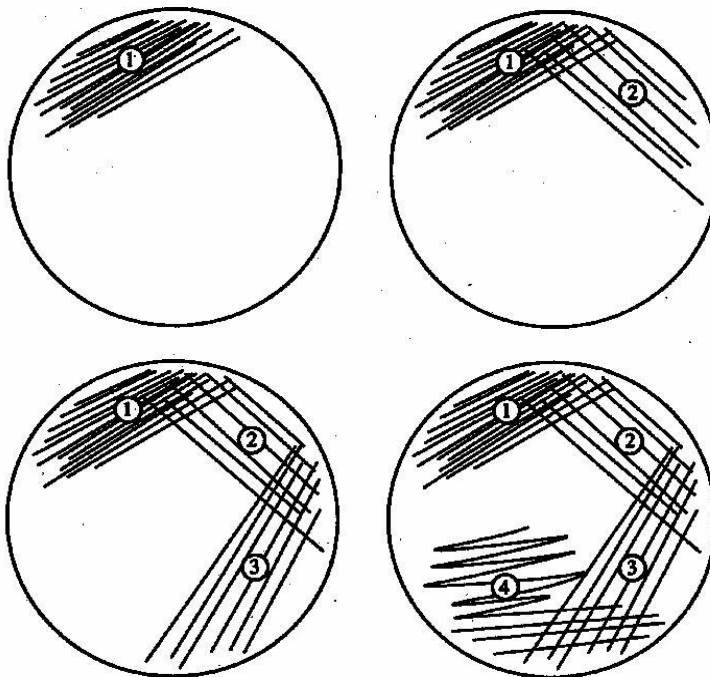
² BGA'nın majör avantajı hemolitik aktivitenin değerlendirilmesinin yanı sıra *Bordetella* fazlarının da değerlendirilmesine imkan vermesidir. *B. pertussis*'in virülans karakterlerinin ekspresyonu istikrarlı değildir ve bu özellik iyi bilinmektedir. Virülen fenotipler çevresel şartlara bağlıdır ve geri dönüşümlü olarak sıcaklıktan ya da kimyasallardan etkilenirler (*fenotipik modülasyon*).

- Virülans geninin ekspresyonu – Faz I
- Hemolizinlerin kaybı ile ara fazların meydana gelişi – Faz II veya III
- Bütün virülans faktörlerinin kaybı – Faz IV (BGA'da hemolitik özelliğin kaybı ve koloni özelliklerinin değişmesi –parlaklığın kaybı vb.- ile izlenir)

3.2. Örneklerin kültür vasatlarına ekilmesi

Hazırlık

- Örnekler geciktirilmeden besiyerlerine ekilmelidir. Bunun için bütün örnekler çalısma formuna ve laboratuvar protokol defterine kaydedilir.
- *B. pertussis*'in izolasyonu için gerekli asgari besiyerleri; BGA, C-BGA ve %5 koyun kanlı agardır (Şekil 1).
- Uygun sayıda C-BGA plağı buzdolabından çıkarılır. Oda ısısına gelmeleri sağlanır. Plakların üzerinde işlem protokol numarası, hasta adı, örnek tipi, ekim tarihi belirtilir.
- Bütün ekimler için **tam plak** yüzeyi kullanılır.
- Nazofaringeal sürüntü örnekleri - Casamino asit veya kömürlü Amies transport besiyerinde gelen örnek eküvyonu C-BGA plağının üst ¼ yüzeyine inoküle edilir. Ardından plakların geri kalan kısımlarına azaltma yöntemi ile yayılır (bkz. Şekil 2).
- Nazofaringeal aspirat örnekleri - Özel kateterle alınıp casamino asid solüsyonu içinde gelen örnekten steril Pastör pipeti kullanılarak iki damla örnek alınır; L öze ile C-BGA yüzeyine yayılır. Kömürlü Amies transport besiyerinde gelen örnekler nazofaringeal sürüntü örneğinde olduğu gibi inoküle edilir.
- İlk ekimler yapıldıktan sonra kalan orijinal örnekler laboratuvar sonucu çıkana kadar (ortalama 7-10 gün), 2-8°C'de saklanmalıdır.



Şekil 2. *Bordetella* türlerinin izolasyonu için klinik örneklerin plaklara ekimi (20).

3.3. Kültür plaklarının inkübasyonu

- Ekim yapılmış plaklar, 36°C'de, nemli ortamda, aerob koşullarda 72 saat inkübe edilir. Bazı durumlarda 7-10. güne kadar plakların takip edilmesi gerekebilir.

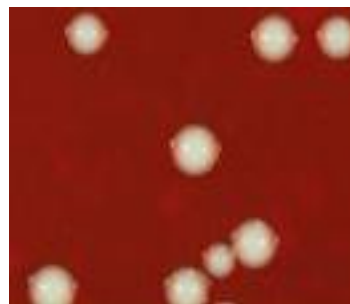
NOT: Uygun nem oranı etüv tabanına geniş bir cam tepsi ile distile su konarak elde edilir. Tepsinin kuru kalmasına izin verilmemeli, düzenli aralarla kontrol edilerek su eklenmelidir.

3.4. Kültür plaklarının değerlendirilmesi

- İlk değerlendirme 72 saat inkübasyon ardından koloni mikroskopunda $\times 20 - \times 50$ büyütme ile yapılır. Koloni mikroskobu mevcut değilse kolonilerin incelenmesinde bir el büyüteci kullanılmalıdır.
- C-BGA plaklarının, kuşkuyla *B. pertussis* kolonilerinin varlığı açısından dikkatlice incelenmesi gerekir. Her ne kadar koloni görünümünden tanı koymak söz konusu değilse de sonraki tanımlama adımları için şüpheli kolonilerin belirlenmesi önemlidir (Şekil 3).
- Bordetella* türlerinin C-BGA'daki koloni görünimleri aşağıdaki gibidir:
 - B. pertussis* - Düzgün kenarlı ve düz yüzeyli, yaklaşık 1 mm çapında transparan, konveks kolonilerdir. Üç günü aşan inkübasyonun ardından koloni çevresinde dar bir beta hemoliz zonu oluşabilir.
 - B. parapertussis* - *B. pertussis* kolonilerine benzer ancak daha büyük ve donuktur; yakından incelendiklerinde kahverengimsi görünimleri dikkat çeker. *B. pertussis* kolonilerinden daha kısa sürede oluşurlar.
 - B. bronchiseptica* - Pürüzlü yüzeye sahip dövülmüş metali anımsatan küçük koloniler oluştururlar. Bir gecelik inkübasyonun ardından gözlenirler.



(a)

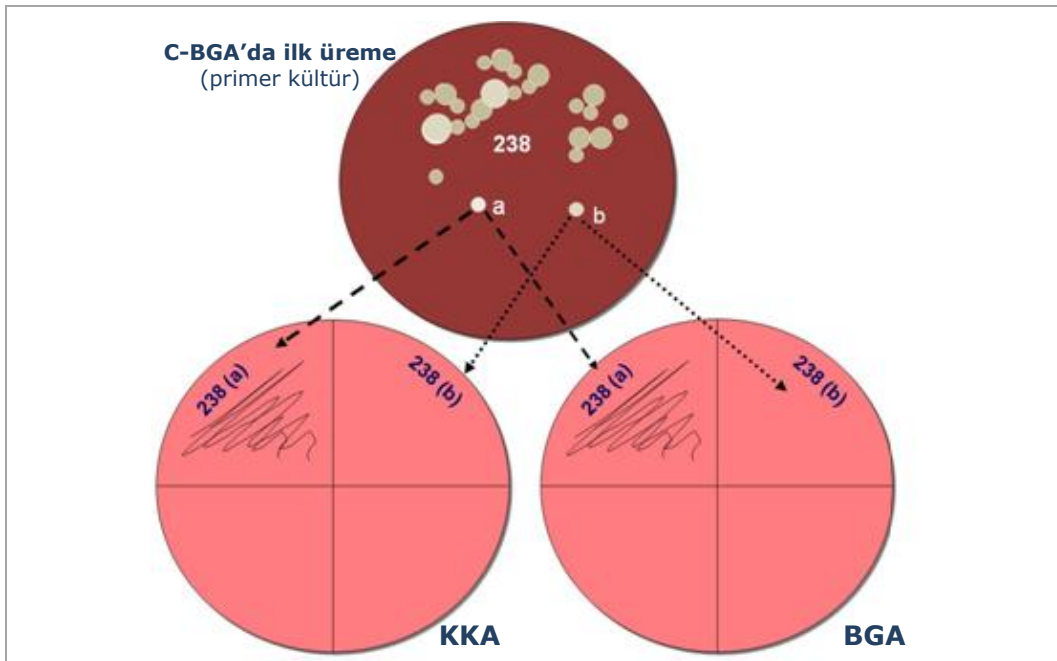


(b)

Şekil 3. (a) koloni mikroskopunda plakların incelenmesi (Kaynak: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı Arşivi, Ankara, 2007) (b) *B. pertussis*'in koloni görünümü

3.5. Şüpheli kolonilerden paralel pasaj yapılması - tanımlama basamaklarına geçiş

- Sonraki tanımlama basamaklarında kullanılacak saf kültürleri elde etmek için, kuşkulu kolonilerden mümkün olduğunca çok sayıda seçilerek, 4'e bölünmüş BGA ve KKA plaklarına paralel pasaj yapılır (bkz. Şekil 4).
- Plaklar 36°C'de, nemli, aerob ortamda inkübe edilir ve 48-72 saat sonra değerlendirilirler.
- Değerlendirmeyi Şekil 1'de özetlenen adımlar takip eder. Buna göre şüpheli koloniler eğer;
 - (a) hem KKA'da hem BGA'da üreme gösterirlerse - *B. parapertussis* veya *B. bronchiseptica* olabilir! Diğer adımlara geçilmelidir.
 - (b) sadece BGA'da ürerlerse - *B. pertussis* olabilir! Diğer tanımlama adımlarına geçilmelidir.



Şekil 4. C-BGA'daki kuşkulu kolonilerin BGA'ya ve KKA'ya paralel pasajı (Şekil 21 no.lu kaynaktan alınarak uyarlanmıştır).

Boyanma özellikleri

- *Bordetella* türlerinin ortak mikroskopik özellikleri şöyle sıralanabilir:
 - Küçük kokobasil yapısında Gram negatif bakterilerdir.
 - Sefaleksimli besiyerinden yapılan Gram boyamalarda uçlara doğru incelen, düz veya hafifçe kıvrık pleomorfik çomaklar gözlenir.
 - Hareketsizdirler.
 - Spor yapmazlar.
 - Aside dirençli boyanmazlar.

- BGA pasajında üreyen kolonilerden Gram boyama yapılır (bkz. UMS-B-TP-03) ve özellikleri değerlendirilir.

Tarama testleri

- BGA pasajındaki saf üremelerden yapılması önerilen basit tarama testleri Tablo 2’de verilmiştir.
- Özellikle BGA’da 72. saatten sonra üreyen, oksidaz pozitif, koyun kanlı agarda üremeyen, üreyi hidrolize etmeyen bakteriler *B. pertussis* yönünden incelenmeye devam edilir. Bu bakteri izolatlarının kesin tanısı için *B. pertussis* faz I antiserumla lam aglütinasyonu uygulanmalıdır.

Tablo 2. *Bordetella* türlerinin üreme ve biyokimyasal özellikleri

Özellik	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
BGA’da üreme	3–6 gün	1-3 gün	1-2 gün
Koyun kanlı agarda üreme	-	1-3 gün	1-2 gün
MacConkey agarda üreme	-	-	+
Nutrient agarda* veya CSM’de kahverengileşme	-	+	-
Oksidaz	+	-	+
Üre hidrolizi	-	+ (24 saat)	+ (4 saat)
Hareket	-	-	+
Nitrat redüksiyonu	-	-	+
Sitratın utilizasyonu	-	+	+

* 1g/L tirozin içeren nutrient agar; (+) pozitif reaksiyon; (-) negatif reaksiyon

B. pertussis faz I antiserum ile lam aglütinasyonu (Ek-5)

- Kuşkulu izolatların biyokimyasal testlerle tanımlanması *B. pertussis*’in diğer *Bordetella*’lardan ayrımında önemli ipuçları verse bile kesin tanı koydurucu değildir.
- Ayrıca hem koloni morfolojisi hem de biyokimyasal özellikleri açısından *B. pertussis* başta *Haemophilus influenza* olmak üzere diğer bazı üst solunum yolu florasında bulunabilen bakterilerle karıştırılabilir.
- Bu nedenlerle izolatın *B. pertussis* faz I antiserumla lam aglütinasyonu tanımlama için esastır.
- *B. pertussis* faz I antiserumla lam aglütinasyonu BGA pasajındaki üremelerden yapılır. Kural olarak aynı anda *B. parapertussis* antiserumu da test edilmelidir (bkz. Ek 5)
- Koloni morfolojisi, biyokimyasal özellikleri ve klinik tablosu *Bordetella* enfeksiyonları ile uyumlu ancak otoaglütinasyon veren veya herhangi bir aglütinasyon vermeyen izolatlar ileri tanımlama için Ulusal Referans Laboratuvara gönderilir.

3.6. Antimikrobiyal duyarlılık

- Dünyada otoriteler boğmaca vakalarından izole edilen *B. pertussis* suşları için rutin antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasına gerek olmadığını belirtmekle birlikte, özellikle epidemiyolojik amaçlar için ve tedaviye yanıt vermeyen olgularda antibiyotik duyarlılık çalışmaları yapmanın önemini vurgulamaktadırlar.
- Standardize edilmiş uluslararası bir yöntem olmamakla birlikte disk difüzyon, agar dilüsyon veya gradient difüzyon (E-test vb.) yöntemleri araştırmacıların ilgi odağı olmuş ve bu yöntemler uygulanarak çok sayıda araştırma yapılmıştır (15,16,22,23,24).
- *B. pertussis*'in eritromisin dahil olmak üzere çok sayıda antibiyotiğe duyarlı olduğu bilinmektedir. Ancak literatürde dirençli suşları görmek de mümkündür. Eritromisin tedavisine yanıt vermeyen boğmaca vakası ilk olarak 1994 yılında Arizona'dan bildirilmiştir. Son yıllarda da özellikle ABD, Taiwan ve Fransa'dan makrolidlere dirençli *B. pertussis* suşlarının varlığı rapor edilmiştir (15,16,22,23,24).
- Disk difüzyon yönteminde eritromisin zon çapının ≥ 42 mm olması *in-vitro* duyarlılığın göstergesi olarak kabul edilmektedir. Gradient difüzyon testinde MİK değerinin ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ olmasının direnç varlığına işaret ettiği belirtilmektedir (16,23).

4 Boğmaca tanısında diğer yöntemler

4.1. Moleküler yöntemler

- *B. pertussis*'in PCR ile tanısında kullanılıp 4 farklı kromozomal bölgeden köken alan primerler arasında;
 - (a) pertussis toksin 'promoter region',
 - (b) 'porin' gen DNA,
 - (c) tekrarlayan insersiyon sekansları,
 - (d) adenilat siklaz toksin geni yer alır.
- Henüz yeterli duyarlılığa ulaşılamamış ve tam olarak standardize edilememiş olmakla birlikte deneysel uygulamalarda hızla ilerleme sağlanması, PCR'ın gelecekte *B. pertussis* ve *B. parapertussis* tanısında daha yaygın ve hızlı bir yöntem olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (6,14,15,16,17).

4.2. Seroloji

- Serolojik tanı amacıyla ELISA kullanılır. Standardize edilmiş ve onaylanmış bir test kiti henüz bulunmadığı için rutin olarak laboratuvarlarda uygulanmamaktadır.
- Çift serum örneğinde anti-PT IgG antikorlarında ≥ 4 kat titre artışının saptanması, tek serum örneğinde ise anti-PT IgG antikorlarının ≥ 100 IU/mL bulunması boğmaca enfeksiyonu lehinedir (6,14,15,16,25).

4.3. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Bir laboratuvar *olası* vakalardan alınan örneklerde mevcut imkanları ile ilk izolasyonu gerçekleştiriyor ancak *B. pertussis* kesin tanısını koyamıyorsa (antiserumlarla tiplendirme yapılamıyorsa) izolatu en kısa zamanda THSK, MRLDB, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarına gönderir. Örneklerin ve izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (26) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Referans Laboratuvarı bu tür izolatlarda; (i) antiserumlarla aglütinasyon, DFA ve PCR tekniklerinden en az birini kullanarak izolatın kesin tanısını koyar. Antibiyotik duyarlılık çalışmasını yapar (nadir de olsa makrolidlere dirençli kökenler için). PFGE ve/veya diğer moleküler tekniklerle izolatın epidemiyolojik ilişkisini araştırır, (ii) bulgularını Halk Sağlığı Müdürlüğüne, örneği gönderen laboratuvara ve hastanın doktoruna rapor eder.
- İzolatların saklanması ile oluşturulacak bir arşiv hem laboratuvarın hem de süveyans sisteminin belleğini oluşturur. Bu nedenle her laboratuvar izolatlarını saklayabilmeli ve gerektiğinde ileri incelemeler için yeniden canlandırabilmelidir.
- Saklama için *Bordetella* spp izolatlarının %10'luk 'skim milk' içinde yoğun süspansiyonu yapılır ve -80°C'ye kaldırılır. Bu koşullarda bakteri 8-10 yıl saklanabilir (gerekli besiyerleri ve teknikler için bkz B-TP-01 Suş Saklama Prosedürü).

5 Raporlama ve bildirim

5.1. Sonuçların rapor edilmesi

- Negatif kültürlerin raporu - "Patojen etken üremedi".
- Pozitif kültürlerin raporu – örneğin; "*Bordetella pertussis* üred" şeklinde bakterinin adı açık yazılarak verilir.

5.2. Bildirim

- Boğmaca, bildirimi zorunlu bir hastalıktır. Mevcut bildirim sistemine göre İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne bildirim yapılması gerekmektedir (2). Bildirim klinisyenin sorumluluğudur. Bununla birlikte (boğmacanın *laboratuvardan bildirimi* zorunlu olmasa da) pozitif sonuç elde edilir edilmez laboratuvarın ilgili birime haber vermesi (ör., telefon ile) epidemiyolojik incelemelerin erken başlatılabilmesi açısından önemlidir.
- Olası veya kesin bir vakanın saptanması hemen her zaman başka vakaların olabileceğini de akla getirmeli; yakın temaslıları ve yüksek riskli temaslıları kapsayan aktif süveyans çalışmaları başlatılmalı, Boğmaca Saha Rehberi'nde yer alan öneriler doğrultusunda gerekli önlemler alınmalıdır (1).

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Boğmaca tanısında kültür 'altın standart'tır. Ancak, patojen bakterilerin kültürden izole edilebilmesi için uygun örneğin kataral/erken paroksizmal evrede alınması ve uygun şartlarda laboratuvara ulaştırılması gerekir.
- Nazofarinks örneği alınmasında kullanılan özel eküvyonların kurumların elinde bulunmayışı sık karşılaşılan bir sorundur. Boğmaca eküvyonları, Halk Sağlığı Müdürlüklerinden temin edilebilir.
- Boğmaca araştırmasında burun ve boğaz sürüntü örneklerinin ve öksürtme plaklarının yeri yoktur.
- Antibiyotik tedavisi başladıktan sonra alınan örneklerin kültüründe izolasyon şansı oldukça azdır.
- *B. pertussis* güç üreyen bir bakteridir. Bu nedenle zenginleştirilmiş özel besiyerlerine ihtiyaç duyulur.
- PCR'ın standardizasyon sorunu halen devam etmektedir. Kesin tanı kriteri değildir.
- Serolojik inceleme daha çok serosürveyans amacıyla yapılır. Kesin tanı kriteri değildir.

7 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı
ve
Aşı ile Önlenebilir Bakteriyel Hastalıklar Seroloji Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr; usyprl@saglik.gov.tr
Tel: 0312 458 2167 / 2000, 1727

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden *Bordetella* spp için tanı, doğrulama, moleküler tiplendirmelerin yapılması; boğmaca serolojisi ve seroepidemiolojik sürveyans çalışmaları yürütülmesi; bölgesel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması.

Ekler

Ek-1 Bordet Gengou agar (BGA) hazırlanması

A - Hazır ticari üründen BGA

Maddeler

Bordet Gengou agar baz	30 g
Gliserol	10 mL
Distile su	800 mL

Besiyerinin yapılışı

- 1 Malzemeler bir erlenin içinde manyetik karıştırıcı/ısıtıcı ('hot-plate') üzerinde hafif ısıtılarak 10 dk karıştırılır; pH 6.8 ± 0.2 'ye ayarlanır.
- 2 121°C 'da 15 dk otoklavlanır.
- 3 Otoklavdan çıkarılan besiyeri önceden 55°C 'a ısıtılmış su banyosuna konur, soğuması beklenir (besiyeri miktarına göre 30-60 dk sürer).
- 4 Besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcıya konur, karıştırılmaya başlanır. Karıştırılırken aseptik koşullarda **200 mL at kanı** (taze, günlük) eklenir.
- 5 pH tekrar ölçülür ve gerekirse 6.8 ± 0.2 'ye tekrar ayarlanır. Bunun için;
 - (a) Aseptik şartlarda 2-3 mL besiyeri küçük bir tüpe alınır, donması beklenir.
 - (b) pH metre probu besiyerine daldırılarak pH ölçülür.
 - (c) pH < 6.78 ise steril 1N KOH, > 6.82 ise steril 1N HCl azar azar eklenerek pH ayarlanır.
- 6 Önceden UV lambası açılmış ve ~30 dk ortam dekontaminasyonu sağlanmış odada besiyeri dökme işlemine geçilir. Bütün plaklar **önceden** besiyerinin adı ve hazırlama tarihi yazılarak etiketlenmiş olmalıdır.
- 7 Her Petriye (90 mm çaplı), ~28 mL besiyeri dağıtılır.
- 8 Besiyeri dökülen plaklar bir gece üzeri temiz bir örtü ile kapatılarak bekletilir.
- 9 Ertesi gün plaklar -kapaklar alta gelecek şekilde- ters çevrilir, naylon torbalara kaldırılır; torba üzeri de besiyerinin adı, hazırlama tarihi ve son kullanma tarihi (SKT) yazılarak etiketlenir; kapakları altta kalacak şekilde buzdolabında saklamaya alınır
- 10 Bu şekilde nem kaybı önlenerek saklandığında **raf ömrü** 2 aydır.
- 11 Torbaların içine aşırı nemlenme olasılığı için silika-jel paketleri konabilir.
- 12 Hazırlanan her besiyeri serisinden kalite kontrol yapılır.

B - Laboratuvar yapımı BGA (patates özütü; *in-house*)

Maddeler

Patates (küp küp doğranmış)	125 g
Glycerol	10 mL
NaCl	3.5 g
Polypepton	10 g
Agar	20 g
Distile su	800 mL

Besiyerinin yapılışı

- 1 Soyulmuş ve küp şeklinde doğranmış patatesler (125 g) balon joje içine konur. Aynı balon jojeye 800 mL distile su ve 10 mL gliserol eklenir.
- 2 Hot-plate üzerinde 100°C'de 30 dk kaynamaya bırakılır.
- 3 1000 mL'lik bir mezür üzerine bir huni yerleştirilir. Huninin içine çift katlı gazlı bez konur. Patates ekstraktı, kurulan bu düzenek yardımıyla süzülür. Süzme işleminde mezür kullanmanın amacı aynı zamanda ölçüm de yapabilmektir.
- 4 Süzülen ekstrakt 800 mL'den az ise aynı balon jojeye distile su koyarak çalkalanır; yavaş yavaş süzülerek 800 mL'ye tamamlanır.
- 5 2 L'lik bir erlene polipepton, agar ve sodyum klorür konur ve çok az distile su ilave ederek çözünürlüğü artırılır.
- 6 Süzölmüş olan patates ekstraktı, 2L'lik erlene aktarılır.
- 7 10 dk kadar manyetik karıştırıcı/ısıtıcı (hot-plate) üzerinde ısıtarak karıştırılır.
- 8 pH 6.8±0.2'ye ayarlanır.
- 9 121°C'da 15 dk otoklavlanır.
- 10 Yukarıda "A" başlığının altındaki 3. basamaktan itibaren bütün basamaklar (3-12) burada da uygulanarak besiyerinin hazırlanması tamamlanır.

C - Sefalekssinli Bordet-Gengou agar (C-BGA)

- 1 BGA agar baz yukarıda "A"da veya "B"de tarif edildiği gibi hazırlanır, otoklavlanır ve 55°C'ye soğutulur.
- 2 Sefalekssin supplement besiyerine at kanı ilavesi aşamasında ilave edilir.
 - (a) Bunun için derin dondurucudan sefalekssinin **10mg/mL stok*** solüsyonu önceden çıkarılmış ve oda ısısına getirilmiş olmalıdır.

*NOT: 10 mg/mL'lik sefalekssin stok solüsyonunun hazırlanışı için bkz. Ek-2.
 - (b) Besiyeri karıştırılırken stok solüsyondan 1 mL -aseptik olarak- besiyerine eklenir.
- 3 Yukarıda "A"nın altında verilmiş olan 3-12. basamaklar burada da uygulanarak C-BGA besiyerinin hazırlanması tamamlanır.

Ek-2 Stok antibiyotik solüsyonu hazırlanması

A - Prensip

Bir besiyerinin **seçici** olması, besiyerine, üremesi istenen bakterinin dirençli, diğerlerinin ise duyarlı olduğu antimikrobiyal (bazen de tellürit, boya vb.) maddelerin eklenmesi ile sağlanır. Besiyerindeki antibiyotik konsantrasyonu kritik öneme sahiptir. Konsantrasyon arttıkça izole edilmek istenen bakteri üzerindeki inhibitör etki de artabilir. Konsantrasyon düşük kaldığında ise istenmeyen bakterilerin üremesi artar. Bu nedenle antibiyotik tartımı, hazırlanması ve saklanması maksimum hassasiyet gösterilmesi önem kazanır.

Besiyerlerine konacak antibiyotikler besiyerinin 1 litresinde bulunması gereken miktarın 1 mL içinde sulandırılması prensibine göre hazırlanır. Bu şekilde hazırlanan antibiyotik (stok solüsyon) -20°C'de saklanır.

B - Gereç, donanım

- Hazırlanacak antibiyotik
- Membran filtre (enjektör ucu tipte, 0.2 µm por çalı)
- Tüpler, steril, burgu kapaklı (50 mL)
- Derin dondurucu tüpleri, steril (1.5 mL)
- Biyogüvenlik kabini
- Hassas terazi (0.001 g)
- Otomatik pipetler
- Derin dondurucu (-20°C, -85°C)

C - Formül, tartım

Tartım için şu formül kullanılır:

$$\frac{\text{Tartılacak miktar (mg)} \times \text{Aktivite (µg/mg)}}{\text{Volüm (mL)}} = \text{İstenen konsantrasyon (µg/mL)}$$

- Ambalajı üzerinde "aktivite" değeri belirtilmemiş antibiyotikte aktivite 1000µg/mg olarak kabul edilir.
- "Tartılacak miktar" terazinin hassasiyet kapasitesine göre kararlaştırılır.
- Hassas terazi en az 0.001g hassasiyette olmalıdır. Böyle bir hassas terazide bir kerede güvenli olarak tartılabilecek en küçük miktar ~20 mg'dır. Daha düşük ağırlıkta tartımdan kaçınılmalıdır.
- *Örneğin*; 1 mg/mL'lik antibiyotik stok solüsyon yapmak için en az 20 mg tartım yapmak gereği göz önüne alınırsa -aktivite de (µg/mg) hesaba katılınca- en az 20 mL dilüent ile sulandırım yapılacağı hesaplanır. Bu miktar yaklaşık 20 L besiyeri içindir.

D - Stok antibiyotiğin hazırlanması

- Tartılacak miktar belirlenip istenen konsantrasyona göre sulandırım volümü hesaplandıktan sonra, antibiyotik tartılır.

- Dilüenti ile sulandırılır. Dilüent çoğu kez "su"dur; ancak bazı antibiyotikler HCl veya diğer bazı çözücüler içinde eritilebildiğinden, dilüentin antibiyotiğe göre değişebileceği akılda tutulmalıdır.
- Eritilmiş antibiyotik stok solüsyonu membran filtre ile steril edilir.
- Önceden etiketlenip hazırlanmış 1.5 mL'lik steril tüplere, her 1 L besiyeri için 1 mL olacak şekilde (ya da tüp çeperine bulaşacak miktar da hesaba katılarak, 1.1 mL) dağıtılır.
NOT: Eğer besiyeri daha az miktarlarda dökülüyorsa alikotlar da buna göre daha küçük tutulabilir. *Örneğin*; 250 mL besiyeri için 250 µL stok antibiyotik gerekir; bu durumda tüp çeperine bulaşacak miktar hesabıyla 300 µL'lik alikotlar hazırlamak iyi olur.
- Tevzi edilmiş antibiyotik solüsyonu derin dondurucuda 2 yıl saklanabilir.

E - Sefalekssin stok solüsyonu (10mg/mL) hazırlama

- 1 Biyogüvenlik kabini* en az 10 dk önceden açılır, çalıştırılır. Çalışma yüzeyi alkolle temizlenir. Gerekli malzeme (tüpler, enjektör, filtreler...) çalışma alanına yerleştirilir.
- 2 Tartım miktarına göre yeterli sayıda (ör., 20 adet) steril 1.5 mL'lik derin dondurucu tüpü alınır ve şu bilgiler yazılarak etiketlenir:
 - Sefalekssin 10 mg/mL
 - Miktarı 1.1 mL
 - Hazırlama tarihi (o günün tarihi)
 - Son kullanma tarihi (2 yıl sonraki o günün tarihi)
- 3 Açıldığı tarihte ambalaj üstünde belirtilen aktivite *ör.*, >900 µg/mg olsun; tartılacak miktarın 200 mg olmasına karar verdiğimiz varsayılın.
- 4 Besiyerinde sefalekssinin son konsantrasyonu = 10 mg/L olması istendiğine göre 'Stok Sefalekssin' = 10 mg/mL (10.000 µg/mL) olacak şekilde hazırlanacaktır. Yukarıda "C - Formül, tartım" başlığının altında verilen formüle koyulduğunda:
$$\frac{200 \text{ mg} \times 900 \text{ µg/mg}}{\text{Volüm}} = 10.000 \text{ µg/mL} \quad \text{Volüm} = 18 \text{ mL bulunur}$$
- 5 Toz antibiyotikten 200 mg tartılır ve dikkatli bir şekilde 50 mL'lik temiz bir erlene konur. Üzerine 18 mL distile su ilave edilir. Bu esnada tartım kabı da suya tutulur ve üzerinde hiç madde kalmaması sağlanır.
- 6 Antibiyotik tümü ile eriyene kadar yavaş yavaş karıştırılır.
- 7 Solüsyon enjektöre alınır ve 0.22 µm membran filtre ile steril bir tüpe süzülür. Bu tüpten de steril pipet yardımıyla derin dondurucu tüplerine 1.1 mL'lik alikotlar halinde (1 L besiyerine 1 mL koymak üzere; fazla 0.1 mL tüpe bulaş vb payı için) tevzi edilir. Yukarıda verilen ölçülere göre toplamda 17 litre besiyerine yetecek kadar sefalekssin stok hazırlanmış olur.
- 8 Tüpler, önce supor ile derin dondurucuya kaldırılır ve -20°C'de dondurulur. Donduktan sonra tüpler (fazla yer kaplamaması için) üzeri etiketlenmiş kapaklı bir kaba veya kutuya aktarılır ve -20°C'de saklanır.

* Çalışma mümkünse sınıf-I veya IIA BGK içinde yapılmalıdır. Eğer mümkün değilse çalışma öncesinde odanın UV lambası 30 dk açık bırakılmalı; daha sonra UV kapatılıp odaya girilmeli, dikkatli bir şekilde, gerekmedikçe konuşmaksızın antibiyotik tevzi edilmelidir.

Ek-3 CSM besiyerinin hazırlanması

Maddeler

Sodyum glutamat (mono)	10.7 g
L-proline	0.24 g
NaCl	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
KCl	0.2 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
Tris	6.1 g
Casamino-acid	0.5 g
Cyclodextrin	1.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	975 mL

Besiyerinin hazırlanışı

- 1 Yukarıdaki maddelerin hepsi 2 L'lik bir erlene konur.
- 2 Erlen, manyetik karıştırıcı üzerine oturtulur. Erlen içeriğindeki agar eriyinceye kadar karıştırılır. pH'sı 7.4'e ayarlanır.
- 3 115°C'de 15 dk otoklavlanır.
- 4 Aşağıdaki maddeler (1000 mL baz besiyeri için), filtrasyonla steril edilerek ilave edilir. Her biri ayrı ayrı 5'er mL distile su içinde olacak şekilde;

L-sistein mono hidroklorit	40 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	10 mg
Askorbik asit	20 mg
Niasin (nikotinamid)	4 mg
İndirgenmiş glutatyon	150 mg
- 5 Etiketlenir. Buzdolabında naylon torbada nem kaybı önlenerek saklandığı takdirde raf ömrü 6 aydır.

Besiyerlerinin kalite kontrolü

Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite*, *üreme* ve *seçici özellik* kontrollerini kapsar.

- 1 Sterilite kontrolü - Yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 L başına 2-3 plak seçilir; 36°C'de 3 gün inkübe edilir. Hiçbir kontaminant (bakteri, mantar) ürememiş olmalıdır.
- 2 Üreme kontrolü - pozitif kontrol suşları (*B. pertussis* ATCC 9797 ve *B. parapertussis* ATCC 15311) pasajlanarak üreme değerlendirilir.
- 3 Seçici özellik kontrolü - C-BGA için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 inoküle edilir.

Besiyeri kalite kontrolünde **daha ayrıntılı bilgi için** bkz. UMS, B-MT-02 Difteri, Ek-3 veya UMS, B-MT-06 Lejyoner Hastalığı, Ek-2. *Bordetella* spp besiyerleri için kalite kontrol suşlarının stokları verilen UMS belgelerinden yararlanılarak benzer şekilde hazırlanabilir, saklanabilir, kullanılabilir ve sonuçlar da benzer şekilde değerlendirilebilir.

Ek-4 CSM besiyerinde kahverengileşme

Materyal

- CSM besiyeri
- Test edilecek izolatın ve kontrol suşlarının BGA pasajları (37°C'de 3 günlük)
- Pozitif kontrol - *B. parapertussis* ATCC 15311
- Negatif kontrol - *B. pertussis* ATCC 9797

Uygulama

- 1 Test edilecek izolatların (kontrol suşları dahil) taze kültürlerinden CSM besiyerine pasaj yapılır.
- 2 37°C'de nemli ortamda 48-72 saat inkübe edilir.
- 3 İnkübasyon sonunda, plak agar yüzeyi, kahverengi pigmentasyon oluşumu yönünden değerlendirilir.

Yorum

- 1 Kahverengi koloni, agarda kahverengileşme - *B. parapertussis*
- 2 Saydam-renksiz koloniler - *B. pertussis*

Ek-5 *Bordetella* spp lam aglütinasyon testi

Materyal

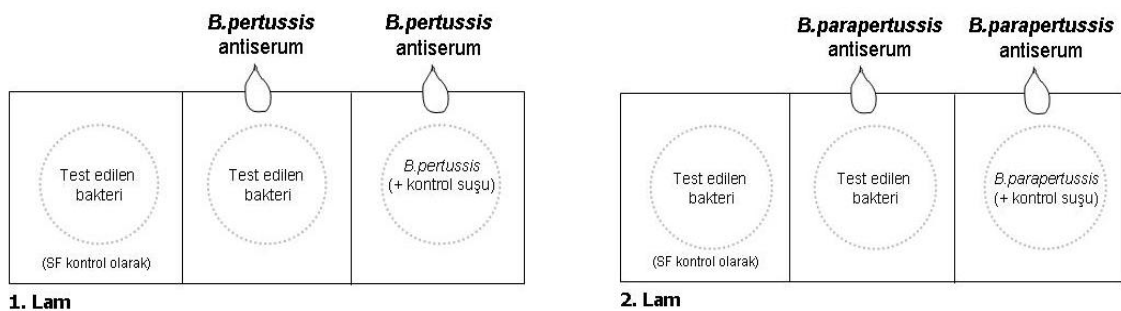
- Test edilecek izolatin ve pozitif kontrol suşlarının BGA pasajları (37°C'de 3 günlük)
- Pozitif kontrol suşları:
 - B. pertussis* ATCC 9797
 - B. parapertussis* ATCC 15311
- Antiserumlar:
 - B. pertussis* faz I antiserum
 - B. parapertussis* antiserum
- %0.85 NaCl (SF)
- Cam tüpler, steril
- Lamlar (temiz), cam kalemi
- Pastör pipetleri, otomatik pipet, pipet uçları
- McFarland No 3 standart tüpü

Aglütinasyon testinin yapılışı

- Şüpheli izolatlar ve kontrol suşlarından bakteri süspansiyonları hazırlanır. Bunun için, izolat sayısı kadar tüpe 1'er mL SF konur. Birkaç öze dolusu bakteri alınarak SF içinde iyice ezilir. Pastör pipeti aracılığıyla homojenize edilir. Süspansiyonların bulanıklığı McFarland No 3'e uygun olmalıdır.
- Temiz iki lam alınır ve cam kalemi ile her biri 3 bölmeye ayrılır. Her bir bölmeye birer damla ve Şekil 5'de verilen düzende olduğu gibi önce bakteri süspansiyonları, sonra antiserumlar konur. 1 dk sonra reaksiyon değerlendirilir.

Değerlendirme, yorum

- SF kontrolde (sol) herhangi bir aglütinasyon gözlenmemelidir. Aglütinasyon varsa "kültür R tipi ve antijenik değerlendirme için uygun değil" demektir. Pozitif kontrolde (sağ) hızlı, 4+ değerinde tam aglütinasyon gözlenir.
- Orta bölmede aglütinasyon varsa, kullanılan antiseruma göre o izolatin POZİTİF olduğu anlamına gelir.
- Pozitif kontrolde 4+ reaksiyon gözlenmeyişi, negatif kontrolde ise "rough" reaksiyon gözlenmesi durumunda test tekrarlanmalıdır.



Şekil 5. Kuşkuolu izolattan lam aglütinasyonu yapılırken **mutlaka** *B. pertussis* ve *B. parapertussis* pozitif kontrol suşları da beraber test edilir. 2 adet lam alınır ve Şekil'de görüldüğü düzende önce bakteri süspansiyonları lamlara konur; ardından üzerlerine uygun antiserumlar damlatılır (Şekil 21 no.lu kaynaktan alınmıştır).

Ek-6 *Bordetella* spp DFA testi

Materyal

- Test edilecek izolatin ve pozitif kontrol suşlarının BGA pasajları (37°C'de 3 günlük)
- Pozitif kontrol suşları:
 - *B.pertussis* ATCC 9797
 - *B.parapertussis* ATCC 15311
- Negatif kontrol suşu - *Escherichia coli* ATCC 25922 (KKA pasajı)
- DFA testi için konjugatlar (FITC bağlanmış, poliklonal, tavuk antiserumu)
 - *B. pertussis* FITC konjugat
 - *B. parapertussis* FITC konjugat
- PBS, pH 7.2
- 'mounting medium'[†] pH 7.2
- %1 casamino asid
- %0.85 NaCl (SF), steril
- Cam tüp, steril (yeterli sayıda)
- Temiz DFA lamaları (yeterli sayıda)
- Petri kabı (ıslak süzgeç kağıdı ile nemli ortam temini için)
- Floresan mikroskop

Prensip

Bu testte bir bilinmeyen izolatin hem *B.pertussis* hem de *B.parapertussis* olup olmadığı araştırılır. Bu nedenle her iki tür için standart pozitif kontrol suşlarının ve negatif kontrol bakterisinin her teste alınması gerekir! Cam malzeme ve pipetlerin temiz olmasına ve deterjan kalıntısı içermemesine dikkat edilir!

Test öncesinde tüm kit materyali, 30 dk oda ısısında bekletilir!

Konjugatın hazırlanması

- 1 *Bordetella* sp konjugatları liyofilize haldedir. Testlerde kullanılmadan önce sulandırılmalı ve çalışma dilüsyonuna karar verilmelidir.
- 2 Konjugat kitin talimatnamesine göre uygun dilüent kullanılarak sulandırılır. Yavaşça çevirerek karıştırılır; içeriğin tamamen çözülmesi sağlanmalıdır.
- 3 Sulandırılmış konjugattan **çalışma dilüsyonu** hazırlanmalıdır. Çalışma dilüsyonunu bulmak için konjugatın seri dilüsyonu (pH 7.2 PBS kullanarak) yapılır.
- 4 Her bir dilüsyon *B.pertussis* ve *B.parapertussis* standart suşları ile ayrı ayrı test edilerek konjugatın titrasyon değeri saptanır. Çalışma dilüsyonu elde etmek için *yanda* örnek olarak verilen titrasyon tablosu incelenir.
- 5 Tabloda verilen örnekte, son 4+ floresan 1:40 titrede görülmüştür. Klinik örnekler veya şüpheli izolatların tanımlanmasında testlerde kullanılacak çalışma dilüsyonu olarak –testin güvenli olması açısından- 1:20 dilüsyon yapılmasına karar verilir ve konjugat 1:20 sulandırılır.

Konjugat dilüsyonu	Floresan
1:5	4+
1:10	4+
1:20	4+
1:40	4+
1:80	2+

[†] Tamponlu gliserindir (%75'lik gliserol-PBS). Ticari olarak temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir. Bunun için; 7.5 mL gliserole 2.5 mL PBS (pH 7.2) eklenir.

DFA lamlarının hazırlanması

DFA lamları taze saf BGA kültürlerinden hazırlanır. Pozitif ve negatif kontrol suşları da test edilecek şüpheli izolatlarla birlikte teste hazırlanır. Test için;

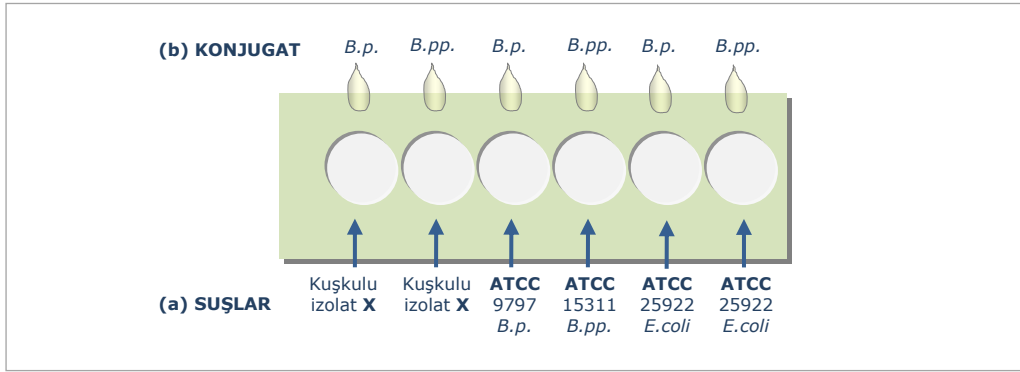
- 1 Suşların her birinden ~2 mL distile su içinde McFarland No 0.5 veya 1 bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlayın.
NOT: Pozitif kontrolün dansitesi homolog konjugat ile 4+ floresan verecek şekilde ayarlanmalıdır. Test edilecek kültür izolatlarının yoğunluğunun da pozitif kontrole karşılık gelecek şekilde ayarlanması gereklidir.
- 2 **Bir** şüpheli izolatın test edilebilmesi için toplam 6 godeye ihtiyaç vardır (bkz. Şekil 6). Her godeye ~30 µL bakteri süspansiyonu olacak şekilde;
 - (a) test edilecek izolat, lamların ilk iki godesine,
 - (b) *B. pertussis* standart suşu 3. godeye,
 - (c) *B. paraptussis* standart suşu 4. godeye,
 - (d) *E. coli* (negatif kontrol) de son iki godeye konur.
- 3 **Birden fazla** şüpheli izolatın test edilmesi durumunda;
 - (a) 4 godeli bir lam, kontrol suşlarına ayrılır ve bir godeye *B. pertussis* standart suşu, bir godeye *B. paraptussis* standart suşu, iki godeye de *E.coli* (~30 µL) konur.
 - (b) Diğer lam(lar)a da test edilecek her bir örnekten ikişer godeye ~30'ar µL konur.
- 4 Lam(lar) havada kuruttuktan sonra 3 kez alevden geçirilerek fikse edilir.

ÖNEMLİ NOT: **Klinik örneklerden** *B.pertussis* veya *B.paraptussis*'in DFA testi sadece **ön tanı** konmasında yardımcıdır. Kesin tanı kültür, morfolojik ve serolojik değerlendirmelerin ardından konmalıdır. Yine de laboratuvar klinik örneklerde DFA uygulamak isterse, klinik örneklerden yayma hazırlanmasının, koloniden preparat hazırlanmasından **farklı** olduğu hatırlanmalıdır. Aşağıda verilen yol izlenir:

- Önce nazofaringeal eküvyon 0.5 mL %1'lik casamino asit solüsyonu içinde homojenize edilir ve en fazla 2 saat olmak üzere 37°C'da bekletilir.
- Godeleri büyük olan çift godeli bir lamların her iki godesine de homojenattan 30-50 µL alınarak yayılır. Pozitif ve negatif kontroller ayrı lama hazırlanır.
- Lamlar havada kurutulur ve %95'lik etanol ile sabitlenir.
- Örnek lamlarının her biri ve kontrol lamları **kesinlikle** ayrı ayrı kaplarda olacak şekilde yıkanmalıdır. Bu nedenle birden fazla tek kullanımlık bardağa PBS konur.

Testin yapılışı

- 1 Sabitlenmiş lamların her godesine ~30 µL uygun konjugat konur (bkz. Şekil 5) ve godeye yayılır. Lam, nemli ortamda (ör., içine ıslak süzgeç kağıdı yerleştirilmiş temiz bir Petri kutusuna yerleştirilerek), oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir.
- 2 Sonra lamların üzerinden yumuşakça PBS akıtılarak konjugat uzaklaştırılır ve lam 10 dk bir yıkama jarı içindeki PBS'de bekletilir. İlk 5 dakikayı takiben PBS yenilenir.
- 3 Ardından, lam 2 dk distile suda bekletilir; havada veya kurutma kağıdı ile kurutulur.
- 4 Godelere birer damla (~20 µL) 'mounting medium' damlatılır. Lamel ile kapatılır.
- 5 Floresan mikroskopta 40× veya 100× objektif ile incelenir. Floresan varlığı açısından değerlendirilir ve derecesi kaydedilir (bkz. Yorum)



Şekil 6. Bir şüpheli izolatın DFA ile *Bordetella* sp için incelenmesinde preparatın hazırlanışı: Önce bakteri süspansiyonları godelere (a)'da verilen düzende yerleştirilir ve fiks edilir. Sonra konjugatlar (b)'de verilen düzende godelere damlatılır (Şekil 21 no.lu kaynaktan alınmıştır).

Yorum

- 1 *B. pertussis* ve *B. parapertussis* DFA konjugatlarının rutin test dilüsyonlarında reaksiyon bu bakterilerin düz (smooth) kolonili homolog kültürleri ile göz alıcı parlaklıkta (4+) ve özgül olmalıdır. Genellikle, heterolog suşlarla çapraz reaksiyon gözlenmez.
- 2 Floresan yoğunluğu aşağıda belirtilen özelliklere göre değerlendirilir ve kaydedilir:
 - 4+ göz alıcı parlak, sarı-yeşil, periferik boyanma, maksimum floresan.
 - 3+ parlak sarı-yeşil, periferik boyanma
 - 2+ tam, ancak donuk, sarı-yeşil, periferik boyanma
 - 1+ zayıf fark edilebilen periferik boyanma
- 3 Pozitif kontrol, konjugatın çalışma dilüsyonu ile 4+ reaksiyon vermeli.
- 4 Negatif kontrol, konjugatın çalışma dilüsyonu ile 1+ reaksiyonu aşmamalı.
- 5 Test yaymalarında en az 2+ floresan, pozitif reaksiyon olarak düşünülmelidir.
- 6 Pozitif kontrol 3+ reaksiyondan az veya negatif kontrol 1+ reaksiyondan fazla ise:
 - (a) Konjugat bozulmuş olabilir,
 - (b) PBS veya 'mounting medium' pH'sı değişmiş olabilir. Yeni reaktiflerle test tekrarlanmalıdır.

Olası sorunlar/sınırlılıklar

- 1 Bazı heterolog suşlarla 1+ reaksiyon gözlenebilir; değerlendirmede bu tür minimal reaksiyonlar göz ardı edilebilir. Bazı *B. bronchiseptica* suşları değişen derecelerde her iki konjugatla da çapraz reaksiyon verebilir, ancak çoğu durumda 2+ reaksiyondan fazla değildir.
- 2 Gram negatif diplokok, gram pozitif kok ve difteroid çomakların özgül olmayan boyanmalarının ayırt edilmesi ve floresan yoğunluğunun derecelendirilmesi deneyim gerektirir.
- 3 Test reaktiflerinin hazırlanması ve saklanması sırasında kullanılan cam malzemeler kesinlikle deterjan kalıntı vb. içermemelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Boğmacanın Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-04	Hareket testi
UMS, B-TP-06	IMVIC testleri (sitrat utilizasyonu için)
UMS, B-TP-15	Nitrat redüksiyonu
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, B-TP-22	Üreaz testi
UMS, B-MT-02	Difteri, Ek-3 (Besiyeri kalite kontrol için)
UMS, B-MT-06	Lejyoner Hastalığı, Ek-2 (Besiyeri kalite kontrol için)
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Boğmaca Saha Rehberi. Sağlık Bakanlığı, Ankara-2003.
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (erişim tarihi: 06.01.2014).
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 4 Genişletilmiş Bağışıklama Programı Genelgesi. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-8187/genisletilmis-bagisiklama-programi-genelgesi-2009.html> (son erişim tarihi 06.01.2014).
- 5 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 6 Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:326–382.
- 7 Pertussis vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record* 2010;85:385–400.
<http://www.who.int/wer/2010/wer8540.pdf>
- 8 Cherry JD. Epidemic Pertussis in 2012-Resurgence of a Vaccine-Preventable Disease. *New England J Medicine* 2012;30:785-787.
- 9 EUVAC-NET Report of the 7th Annual Meeting. 25-26 January 2010. Athens, Greece.
- 10 Cherry JD. The present and future control of pertussis. *Clin Infect Dis* 2010;51:663-667.
- 11 Cherry JD. Pertussis: Challenges today and for the future. *PLOS Pathogens* 2013;9(7):1-3.
- 12 Carlsson RM et al. Control of pertussis-lessons learnt from a 10-year surveillance programme in Sweden. *Vaccine* 2009;(27):5709-5718.
- 13 Bamberger ES, Srugo I. What is new in pertussis? *Eur J Pediatr* 2008;167:133-139.

- 14 WHO. Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. *Immunisation, Vaccine and Biologicals*. WHO/IVB/ 04.14, 2004.
- 15 Wirsing von König CH, Riffelmann M, Coenye T. *Bordetella* and related genera. In: Versalovic J (ed. in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 739-750.
- 16 CDC. Pertussis. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th Edition Second Printing, 2012.
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/pert.html> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 17 CDC. Guidelines for the Control of Pertussis Outbreaks. CDC, Atlanta, GA. 2000 (with amendments made in 2005 and 2006).
- 18 UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* from selective agar.
http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1313155001428 (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 19 ID_2010May_Pertussis-Diagnostics-Brochure.
http://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/ID_2010May_Pertussis-Diagnostics-Brochure.pdf (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 20 Begg N. Diphtheria: Manual for the management and control of diphtheria in the European region. Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO, Copenhagen. 1994.
- 21 Nar S, Akbas E. Boğmaca tanısı için laboratuvar prosedürleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Ver 2.1, Ankara. 2005
- 22 Gordon KA, Fusco J, Biedenbach DJ, Pfaller MA, and Jones RN. Antimicrobial Susceptibility Testing of Clinical Isolates of *Bordetella pertussis* from Northern California: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45(12): 3599-3600.
- 23 Fry NK, Duncan J, Vaghji L, George RC, Harrison TG. Antimicrobial susceptibility testing of historical and recent clinical isolates of *Bordetella pertussis* in the United Kingdom using the Etest method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;(29):1183-1185.
- 24 Guillot S, Descours G, Gillet Y, Etienne J, Floret D, Guiso N. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis* 2012;18(6): 966-968.
- 25 de Melker HE, Versteegh FG, Conyn-Van Spaendonck MA, et al. Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single serum sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:800-6.
- 26 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.



ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Difterinin (*Corynebacterium* sp enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-02
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	7
1 Hedef mikroorganizmalar.....	7
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları.....	7
3 Difteri bakterisinin kültürden izolasyonu.....	10
4 Difteri tanısında diğer yöntemler.....	20
5 Raporlama ve bildirim	21
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar	22
7 Referans Laboratuvar.....	22
EKLER.....	23
Ek-1 CTBA besiyerinin hazırlanması	23
Ek-2 Tinsdale agar besiyerinin hazırlanması	24
Ek-3 Besiyerlerinin kalite kontrolü	25
Ek-4 Pirazinamidaz (PYZ) testi.....	26
Ek-5 Hiss serum su karbonhidrat besiyeri ve Karbonhidrat fermentasyon testi	27
Ek-6 Antimikrobiyal duyarlılık testleri.....	28
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	29
KAYNAKLAR.....	29

Kapsam ve Amaç

Difteri, başta tonsiller, farinks, larinks ve burun olmak üzere deri, konjonktivalar ile genital bölgede yerleşim gösterebilen akut bakteriyel bir hastalıktır. Hastalık aerob, gram pozitif bakteri *Corynebacterium diphtheriae*'nin toksijenik gravis, mitis veya intermedius biyotiplerinden biri ile ortaya çıkabilir. Diğer bazı *Corynebacterium* türlerinin de (*C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*) toksin üretebildiği ve difteri kliniğinden sorumlu olabileceği bilinmektedir (1).

Difteri ülkemizde bildirimi zorunlu bir hastalıktır ve kesin tanısı mikrobiyolojik incelemeye dayanır (2,3). Laboratuvar tanısında kültür 'altın standart'tır (1,4). Hastalığın son yıllarda hemen hiç görülmemesine de bağlı olarak laboratuvarların difteri tanı kapasitesi önemli ölçüde düşmüş görünmektedir. Ülkemizde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının çok azı (%2.1) difteri tanısı için geçerli teknikleri kullanarak ilgili inceleme yapabilmektedir (5). Dolayısı ile uygun bir prosedürün el altında olması tanının yaygınlaşmasını teşvik edecek bir araç olarak önemli görünmektedir. Bu belge, difteri hastalığının kesin tanısı için geçerli yöntemlere ait prosedürleri kapsamaktadır. Belgenin amacı ise; gerek hasta yönetiminde gerekse bildirimde esas doğru ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için uygun yöntemlerin seçimi ve doğru uygulamalar için kaynak oluşturmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

Biyovar	Biyovaryant
CTBA	Cystine tellurite blood agar (sistin-tellürit-kanlı agar)
CYS	Sistinaz
KKA	%5 Koyun kanlı agar
MIK	Minimum inhibitör konsantrasyon
NCTC	National Collection of Type Cultures
PYZ	Pirazinamidaz

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Hipokrat zamanından beri bilinen, belki de insanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan difteri başta tonsiller, farinks, larinks ve burun olmak üzere üst solunum yolları, deri ve bazen de konjonktivalar ile genital bölgede yerleşim gösterebilen akut bakteriyel bir enfeksiyondur. Difteri halen dünyanın hemen her yerinde görülebilen bir hastalıktır, ancak rutin bağışıklamanın başlamasını takiben pek çok bölgede hastalığın görülme sıklığında belirgin azalma olmuştur. Difteri, 1980'lerin sonlarında tarihe karıştığı varsayılan ve gerek klinik özellikleri gerekse laboratuvar tanısı unutulmaya yüz tutmuş bir hastalık olarak değerlendirilmekte idi. Ancak Rusya başta olmak üzere eski Sovyetler Birliğinden ayrılan devletlerde 1990'ların başında ortaya çıkan epidemi ile tekrar gündeme gelmiştir (1,4,3).

DSÖ Avrupa Bölgesi'nde 2000 yılına kadar yerli difteri vakalarının eliminasyonunu hedeflemesine rağmen bugün geline nokta, Litvanya, Ukrayna ve Rusya Federasyonu başta olmak üzere Avrupa ülkelerinde halen difteri vakaları gözlenmektedir. Eliminasyon hedeflerine ulaşamamasının en önemli nedeni aşılama ile kazanılan bağışıklığın zaman içinde azalması gibi gözükmektedir (6). Toplum aşılama olduğunda bile asemptomatik taşıyıcılık durumu olabilmekte, böyle taşıyıcılar patojenin duyarlı bireylere geçişinde önemli rol oynamaktadır (1,4,3). Öte yandan hayvan kökenli toksijenik izolatların da insanlarda difteri tablosuna neden olduğunun gözlenmesi difteri epidemiyolojisine ve sorunun ele alınmasına yeni bir boyut getirmiştir (7).

Difteri bildirimi zorunlu bir hastalıktır (2,3). Ülkemizde difteri hastalığının kontrolüne yönelik çalışmalar Sağlık Bakanlığının Genişletilmiş Bağışıklama Programı kapsamında gerçekleştirilmektedir (8).

Mikroorganizmanın özellikleri

Corynebacterium türleri, sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, metakromatik granül oluşumuyla karakterize, düzensiz boyanma özelliğine sahip, gram pozitif pleomorfik çomak yapısında bakterilerdir (9). Toksin üretme yeteneğine sahip olan türler, insanlarda ve hayvanlarda hastalık yapar. *C. diphtheriae*'nin gravis, mitis veya intermedius biyotipleri ile *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* bu potansiyele sahip mikroorganizmalardır (7).

C. diphtheriae, *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* türlerinin karakteristik özellikleri sistinaz aktiviteleri pozitif iken pirazinamidaz aktivitelerinin negatif olmasıdır. Koloni görünüşleri ve başlıca üre hidrolizi, nitrat redüksiyonu ve karbonhidrat fermentasyon yetenekleri temel alınarak tanımlanırlar (7).

C. diphtheriae'nin majör virölans faktörü, ekstrasellüler bir protein olan ve difteri toksini olarak da adlandırılan potent bir toksindir. Bu toksin, protein sentezini inhibe ederek hücre ölümüne neden olur. Tek bir toksin molekülünün duyarlı bir hücrede birkaç saat içinde protein sentezini durdurabildiği, 0.1 µg/kg kadar küçük dozlarda bile duyarlı bir canlıyı öldürebileceği bilinmektedir (9).

Klinik özellikleri

Difteri *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis*'ın **toksijenik** kökenleri ile meydana gelen bir hastalıktır (1). *C. diphtheriae*'nin kişiden kişiye bulaşı yakın temas ile olur. Bulaşta solunum sekresyonları ya da deri lezyonları ile doğrudan temas söz konusudur. Deri lezyonlarının özellikle sıcak iklimli ülkelerde hastalığın yayılmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (1).

C. ulcerans ve *C. pseudotuberculosis*'ın ise evcil veya çiftlik hayvanları ile temas ve çiğ süt tüketimi gibi yollarla yayılabileceği akılda tutulmalıdır. Bugüne kadar *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* için insandan insana bulaş bildirilmemiştir (1).

Klinik olarak hastalığı anatomik lokalizasyonuna göre sınıflandırmak kolaylık sağlar. Buna göre difteri şu formlarda görülebilir: (a) solunum sistemi yerleşimli; tonsiller difteri, farinks difterisi, larinks difterisi veya laringo-trakeal difteri, burun (nazal) difterisi, ve (b) solunum sistemi dışı yerleşimli; deri/kulak difterisi, konjonktival difteri, genital lezyonlar (1,4,3).

Difteride inkübasyon periyodu genellikle 2-5 gündür, ancak bazen daha uzun olabilir. Solunum yolu difterisinde klinik tablo, membranöz farenjit ve düşük ateş ile başlar. Difteri için tipik olan, psödomembran olarak ta tanımlanan gri veya beyaz, düz, kalın, fibrinöz ve kuvvetlice mukozaya yapışmış halde bir membran bulunabilir. Membran; bir tonsil üzerinde küçücük bir leke kadar olabileceği gibi, her iki tonsili, uvulayı, yumuşak damağı ve faringeal duvarı tümü ile kaplayan büyüklükte de olabilir. Büyümüş ve hassas servikal lenf nodları ile birlikte orta şiddette bir boğaz ağrısı olur; ağır olgularda ise boyunda anlamlı derecede şişlik ve ödem gelişir. Larinks difterisi ise giderek artan ses kısıklığı ve solunum güçlüğü ile karakterizedir. Burun difterisinin başlangıcı soğuk algınlığı gibidir. Tek veya çift taraflı nazal akıntı olur. Başlangıçta seröz olan burun akıntısı daha sonra serözanjinöz hale gelir. Nazal septumda beyaz membran oluşabilir (1,2,3).

Difterinin geç etkileri 2-6 hafta sonra ortaya çıkar. Bunlar; kranial ve periferik sinir tutulumları ve miyokardit şeklinde olup genellikle şiddetlidir. Difteri hastalığında vaka-ölüm oranları son 50 yılda çok az değişmiştir ve %5-10'dur (9).

Günümüzde karakteristik difteri vakaları yerine ılımlı difteri vakalarının olabileceği hatırlanmalıdır. Özellikle aşıli bireylerde streptokok farenjitine benzer klinik tablo oluşturan, klasik psödomembranın gözlenmediği difteri vakaları gözden kaçabilmektedir. Endemik bölgeye seyahat, evcil veya çiftlik hayvanları ile temas, çiğ süt tüketimine ait öykü de hastalığın akla getirilmesinde yararlı olabilir (1).

Difteri özellikle aşıli bireylerde streptokok farenjitine benzer ılımlı bir tablo ile seyrediyor olabilir! Bu durum toplumda toksijenik suşların dolaşımının göstergesi olarak önemlidir!

Laboratuvar tanısı

Difteride klinik gözleme dayalı tanı günümüzde geçerliliğini kaybetmiştir. Tanı laboratuvara dayalıdır. Öte yandan hastalığın prevalansının önemli düzeyde düşmüş olması klinik laboratuvarların difteri tanısındaki deneyimlerini kaybetmelerine neden olmuştur. Yinede pek çok laboratuvarın *olası* vakalarda izolasyon ve ilk tanımlama adımlarında inceleme yapabilmesi ve şüpheli izolatları Referans laboratuvara göndererek süreyansa destek vermeleri mümkündür. *Olası* difteri vakalarının hızlı ve geçerli tanı yöntemleri kullanılarak laboratuvarca doğrulanması, hem hastaların tanı ve tedavisinde hem de halk sağlığını korumaya yönelik önlemlerin bir an önce alınmasında son derece önemlidir.

Laboratuvar doğrulamasının temelini, şüpheli vakalardan alınan örneklerden patojen etkenin izolasyonu **ve** toksijenik olduğunun gösterilmesi oluşturur (10).

Kültür

Difteri tanısında kültür 'altın standart'tır ve ilk (hatta tek) seçenektir. Bakterinin izolasyonu **kesin tanı** koydurur.

Kültürün duyarlılığı; hastaya uygulanan antibiyotik tedavisi, örneğin kalitesi, örnekte bulunan bakteri miktarı, örneğin laboratuvara ulaştırılma koşulları, laboratuvarın deneyimi, uygun besiyerlerinin kullanımı gibi pek çok faktörden etkilenebilir (10,11,12,13).

Difteri kuşkulu olgulardan alınan klinik örneklerin kültüründe *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis* üretilmesi anlamlıdır. Suşların **toksijenik** olup olmadıkları **mutlaka** tespit edilmelidir. İzolasyonu gerçekleştiren laboratuvar, toksijenite testleri ve moleküler epidemiyolojik analiz yapılması için hızla ulusal referans laboratuvarı ile bağlantı kurulmalıdır (10,11,12,13,14).

Bir olgudan toksijenik *Corynebacterium* türü izole edildiğinde, o bölgede potansiyel duyarlı bir popülasyonun varlığı göz önünde bulundurularak başka hastaların da olabileceği düşünülmeli ve **taşıyıcılık** durumu kültür yöntemi kullanılarak araştırılmalıdır (11,12,13).

Toksijenite testleri

Difterinin mikrobiyolojik tanısında **en önemli** test, toksin üreten kökenlerin saptanmasıdır.

C. diphtheriae, *C. ulcerans* ve *C. pseudotuberculosis*'in bütün suşları toksin üretme yeteneğine sahip değildir. Çeşitli *in vivo* ve *in vitro* metotlar olmakla birlikte uygulanabilmeleri, laboratuvarın olanaklarına ve deneyimine bağlıdır. Ülkemizde de söz konusu yöntemler; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu kapsamındaki Ulusal Referans Laboratuvarında uygulanmaktadır.

Avrupa bölgesinde difteri hastalığının kontrol altına alınması için kurulan Avrupa Difteri Sürveyans Ağı kapsamında gerçekleştirilen uluslararası dış kalite kontrol programları raporlarında toksijenite testlerinin hemen hemen sadece referans laboratuvarlarda uygulandığı belirtilmektedir (10).

Elek testi (Konvansiyonel yöntem)

Toksin varlığının araştırılmasında kullanılan en yaygın metot Elek immüno-presipitasyon testidir. Geliştirilmiş yöntemde, testin netliğinde ve doğruluğunda anlamlı düzeyde bir artış sağlayan üstün bir ELEK besiyeri kullanılmaktadır (10,11,12,13).

Toksin araştırması için diğer 'immunoassay'ler

Bakteri kültürlerinden difteri toksininin araştırılmasında kullanılan diğer immunoassay temelli testler; 'verocell' hücre kültüründe toksin etkisi ve toksin nötralizasyonunun gösterilmesi, 'Western blotting', 'dot blotting' ve 'capture' ELISA yöntemleridir (4,3,10).

In vivo toksijenite testleri

Kobaylarda virülans için kullanılan en güvenilir toksin üretimi saptama testleri subkutanöz testlerdir (10,11).

PCR ile difteri toksin geninin saptanması

PCR ile bakterinin toksin genleri gösterilebilir. Ancak bakteri toksin genlerine sahip olsa da toksin üretimi söz konusu olmayabilir. Tanıda önemli olan, difteri toksinin üretilip üretilmediğinin saptanmasıdır. Çünkü toksin geni bulunduğu halde toksin üretmeyen (PCR+, Elek test -) kökenler mevcuttur (10,11).

Bu nedenle klinik örneklerden PCR ile elde edilen pozitif sonuç vakada toksijenik kökenlerin "kolonizasyonu"nun olduğuna dair fikir verir; toksinin aktif olarak üretildiği anlamına gelmemektedir. PCR ile toksin geni taşıdığı saptanan bakterilerin toksin üretilip üretilmediği mutlaka Elek testi ile gösterilmelidir.

PCR yukarıda bahsedilen dezavantajlarına rağmen, kullanılan biyolojik reagenlerin kolay standardize edilmesi, karışık kültürlerden ya da inhibitörlü besiyerlerindeki izolatlardan çalışılabilmesi, hızlı sonuç vermesi gibi avantajlara da sahiptir. Klinik bulgular ile birlikte tanıya yardımcı olabilir (10,11).

Seroloji

Difterinin laboratuvar tanısında serolojik incelemenin değeri sınırlıdır. Kültürlerde bakterinin izole edilemediği durumlarda hastanın antikorlarının koruyucu düzeyin altında (<0.01 IU/ml) olduğunun gösterilmesi klinik tanıyı destekleyebilir. Ancak, örnek hastaya antiserum tedavisi başlanmadan alınmış olmalıdır (11,12).

Serolojik inceleme, daha ziyade bağışıklama programları kapsamında, aşılama etkinliğinin toplumda araştırılması gereksinimi ile seroepidemiolojik surveyans amacıyla yapılır.

Serolojik yöntemler olarak difteri IgG ELISA ve hücre kültüründe toksin nötralizasyon testleri uygulanır (10,11,12).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Corynebacterium diphtheriae ve toksin üretme yeteneğine sahip diğer *Corynebacterium* türleri:

- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Corynebacterium pseudotuberculosis*
- *Corynebacterium ulcerans*

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

C.diphtheriae, *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* Risk Grubu 2 organizmalardır ve çalışmalar, asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalıdır. Difteri şüpheli örneklerin kültürden izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili tüm laboratuvar çalışmaları sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır. Önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Bazı özel durumlarda yapılan işlemler ise (ör., yüksek miktarda toksin üretimi) BGD3 koşulları gerektirebilirler (15).

Söz konusu mikroorganizmalar primer olarak solunum yolu ile bulaşır. Toksikjenik türler oldukça ciddi ve fatal enfeksiyonlara yol açar. Özellikle enfeksiyöz aerosol kaynağı olan işlemlerle ilişkili olduğu bilinen laboratuvar kaynaklı enfeksiyonları rapor edilmiştir. Bu nedenle difteri kültürleri ile çalışan laboratuvar personelinin bağışıklık düzeylerinin ölçülmesi; difteri antikor titresi <0.1 IU/ml olan personelin aşılanması gereklidir (10,12).

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen difteriden şüpheleniyorsa **kültür için** örnekleri laboratuvara göndermeden önce, laboratuvarın gerekli hazırlığı yapabilmesi için mutlaka laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesi ile tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Difteri tanısında örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Şüpheli bir vakadan olabildiğince çeşitli örnekler alınıp gönderilir.
- **Boğaz** sürüntüsü klasik solunum yolu difterisinde birinci seçenektir. Aynı hastadan **burun** sürüntüsü örneği de alınıp gönderilmelidir. Ayrıca, varsa **psödomembran** yavaşça kaldırılıp eküvyon ile altına girilerek de örnek alınmalıdır. Bu tür örnekler en değerli klinik örneklerdir.
- Nazofarinks sürüntüsü ve aspiratı kültür ve PCR için kullanılabilir.
- Konjonktiva örneği – göz difterisi olasılığında alınıp gönderilir.
- Özellikle endemik bölgelerde yaygın form, diğer pyodermalardan klinik olarak ayırt edilemeyen kutanöz difteridir. Şüpheli vakada herhangi bir yara veya deri lezyonundan örnek alınmalıdır. Deri, yara, dış kulak yolu ve vajen sürüntü örnekleri bu bölgelerde lokalize enfeksiyon olasılığında veya klasik difteride bakterinin solunum yolundan başka bir yerleşim yerinin olup olmadığını araştırmak için alınıp gönderilir.
- Ölüm nedeni olarak difteriden kuşkulandığında, tanı için otopsi sırasında alınacak *post-mortem* psödomembran, üst solunum yolu örnekleri ve diğer vital organ örnekleri gönderilmelidir.
- Örnekler mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır.
- Sürüntü örneklerini almak için *mümkünse* polyester uçlu, plastik şaftlı eküvyonlar kullanılmalıdır. Pamuk uçlu ve tahta şaftlı eküvyonlar taşıma veya bekleme esnasında bakterinin olumsuz etkilenmesine neden olabilmektedir. Eğer kısa süre içinde (~1 saat içinde) ekim yapılacaksa tahta şaftlı, pamuk eküvyonlar kullanılabilir.
- Serum – Hastaya antitoksin tedavisi başlanmadan alınmış olmalıdır. Çünkü serum örneği, tanı amacıyla değil, vakanın hastalığa yakalanmadan önceki bağışıklık düzeyini belirlemek amacıyla kullanılır.
- Salgın durumunda – Temaslıların boğaz, burun sürüntüsü örnekleri ile birlikte serum örnekleri de gönderilmelidir.

Besiyeri / Reaktif

- KKA - Difteri kültürü için temel besiyeridir. Ticari olarak temin edilebilir.
- CTBA (Sistin-tellürit-kanlı agar) - Seçici besiyeridir. Potasyum tellürit solunum yolu florasını baskılar. *Corynebacterium* spp, stafilokoklar ve mayalar siyah koloni yaparlar. Laboratuvarında hazırlanır (bkz. Ek-1).
- Tinsdale agar - Yüksek seçici bir besiyeridir; potasyum tellürit, L-sistin ve sodyum deoksikolat içerir. Laboratuvarında hazırlanan bir besiyeridir (bkz Ek-2). Sistinaz pozitif türlerin (*C.diphtheriae*, *C.ulcerans*, *C.pseudotuberculosis*) saptanmasında kullanılır. Sadece bu türler bir gecelik inkübasyon ardından sistinaz aktivitesi göstererek kahverengi hale ile çevrili karakteristik siyah koloniler oluşturmurlar.
- Loeffler'in serum koagüle besiyeri - Mikroskopik morfolojiyi değerlendirmek için kullanılır.
- Biyotiplendirme için reaktifler – katalaz reaktifi (%3'lük H₂O₂), üreaz, nitrat testleri, Gram boya ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri (bkz. "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- Pirazinamid solüsyonu (bkz Ek-4)
- Hiss serum-su-karbonhidrat fermentasyon besiyeri (bkz Ek-5)
- Hızlı biyokimyasal tanı testi kiti – Piyasadan temin edilir.
- ELEK besiyeri ve difteri antitoksin emdirilmiş steril stripler - Hastalardan elde edilen izolatların toksijenik olup olmadığı Referans Laboratuvarında uygulanan ELEK test ile belirlenir.

Diğer gereç, donanım

Besiyeri hazırlamak için

- Erlen (10 mL, 25 mL, 500 mL, 2 L)
- Manyetik karıştırıcı/ısıtıcı ve manyetik balıklar
- Membran filtre (enjektör tipi, polikarbonat, 0.2 µm) ve enjektör
- pH metre
- Petri kabı, steril, tek kullanımlık
- Pastör pipeti, steril pipetler; pipetleme ekipmanı
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Tüpler steril, vida kapaklı

Kültür, mikroskopi ve diğer testler için

- Biyogüvenlik kabini, sınıf-IIA
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - Kolonilerden boyalı mikroskopik incelemeler için
- İnkübatör, 36°C
- Öze, steril, tek kullanımlık
- Vorteks (tüp ataçmanlı)

2.4. Kalite kontrol

- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyerinde kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır.
- Organizmanın tanımlanmasında kullanılan bütün reaktifler ve kitler pozitif ve negatif reaksiyonları bilinen organizmalarla test edilmelidir.
- Metilen mavisi boyası da her testte bilinen bir tipik *Corynebacterium* ile ve başka gram pozitif bakterilerle eş zamanlı kullanılmalıdır.
- Bütün kalite kontrol sonuçları, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.
- Laboratuvarı hazırlanan besiyerlerinin her yeni lotu kalite kontrol organizmaları ile test edilmelidir. Besiyerleri için kalite kontrol prosedürü Ek-3'de verilmiştir. Aşağıdaki tabloda besiyerlerinde bu organizmalar ile alınması beklenen sonuçlar özetlenmektedir.

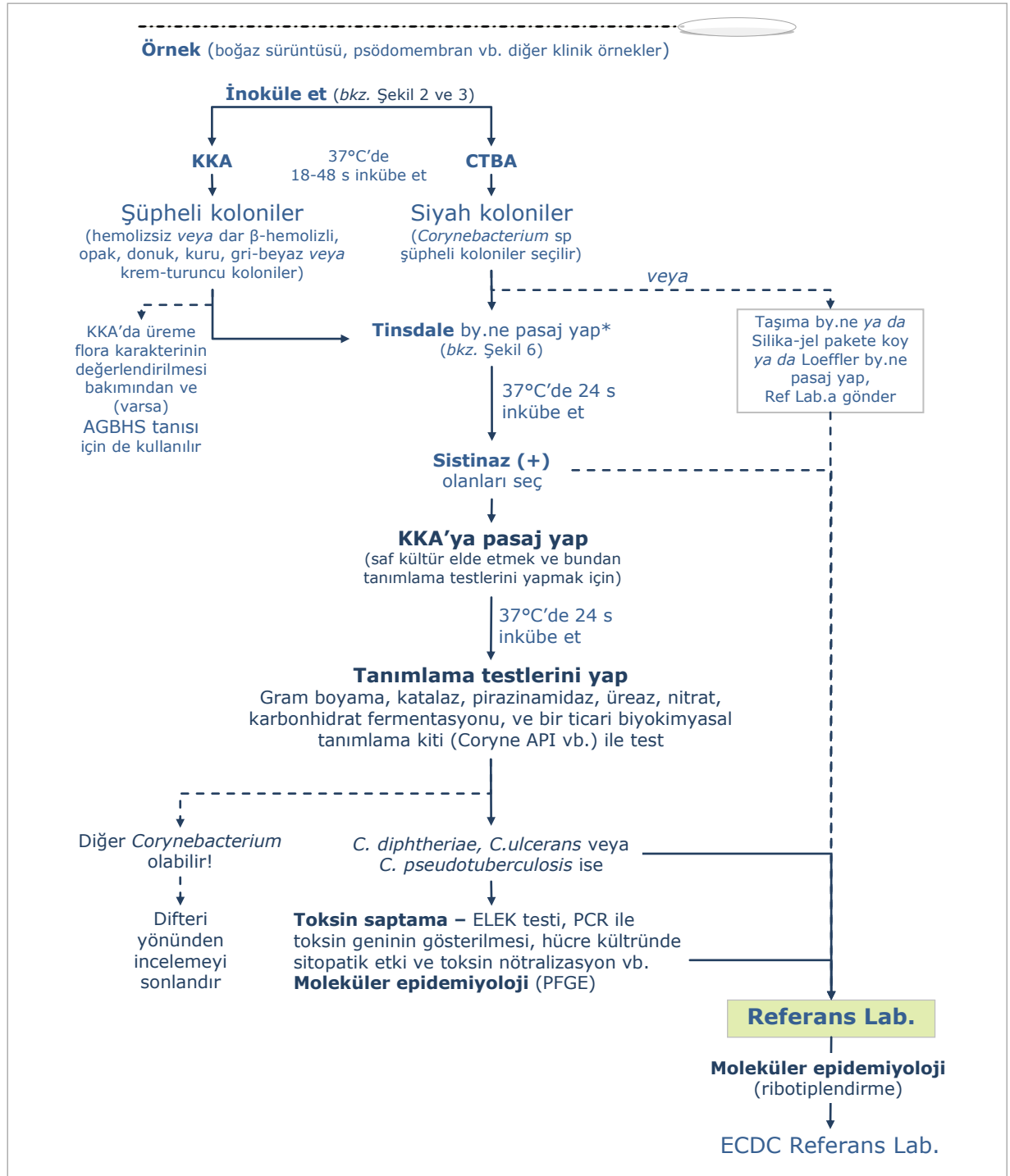
Tablo 1. Kalite kontrol organizmaları (16 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

Organizma (ATCC)	Sonuç
<i>C. diphtheriae</i> biyovar intermedius ATCC 9675 or ATCC 51696	CTBA'da gri-siyah koloniler meydana getirir (periferinden merkeze doğru koyulaşan) Tinsdale'de siyah koloni oluşur, çevresinde kahverengi hale ile
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 veya <i>C. xerosis</i> NCTC 12078	Tinsdale'de siyah koloni oluşur, halesiz
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	CTBA'da inhibe olur (kısmen veya tamamen)

3 Difteri bakterisinin kültürden izolasyonu

- Difterinin kesin tanısı için biricik seçenek patojen *Corynebacterium*'un kültürden izolasyonudur. Bu nedenle kültürden izolasyon başarısı büyük önem taşımaktadır.
- Toksik *Corynebacterium* kökenlerinin izolasyonunda gerekli asgari besiyerleri şunlardır: (a) (%5 Koyun Kanlı Agar, (b) Sistin-Tellürit-Kanlı agar (CTBA), (c) Tinsdale agar, (d) Loeffler's serum besiyeri.
- Klinik örneklerin ilk olarak **kanlı agara** ve bir selektif **tellüritli agara** ekimi esastır (bkz. Şekil 1, Şekil 2).
- Taşıyıcılardan, temaslılardan ve iyileşme dönemindeki hastalardan alınan örneklerde genellikle *C. diphtheriae* az sayıdadır ve Loeffler serum besiyeri gibi selektif olmayan ortamlarda diğer bakterilerin aşırı üremesi ile *C. diphtheriae* baskılanabilir. Bu nedenle güncel prosedürler primer izolasyonda selektif besiyerleri (CTBA) önerir (7,10,11,12,13). Loeffler besiyeri primer izolasyonda **kullanılmaz!** Loeffler'in serum koagüle besiyeri mikroskopik morfolojiyi değerlendirmek için sonraki bir tanımlama basamağında kullanılır (7,10).

3.1. Kültürden izolasyon için genel akış şeması



Şekil 1. Difterinin tanısı için klinik örneklerin kültürlerinden izolasyon ve tanımlama akış şeması s, saat; AGBHS, A grubu beta-hemolitik streptokok; PFGE, pulsed field gel electrophoresis; ECDC, European Center for Disease Prevention and Control

* DSÖ (10) bu basamakta (ilk izolasyon plaklarındaki şüpheli kolonilere) tarama testi olarak Gram boyama yapılmasını; böylece korineform oldukları belirlenen kolonilerin-sonraki tanımlama adımları için- inhibitör olmayan besiyerlerine (KKA ve Loeffler) pasajlanmasını önermektedir. Ancak önerilen yaklaşım uygulamada bazı pratik güçlükler yaratmıştır. Bu nedenle prosedür yukarıdaki şekilde verildiği gibi değiştirilmiş; şüpheli kolonilere tarama testi olarak sistinaz aktivitesinin kullanımı tercih edilmiş ve standardize edilmiştir. Maliyeti Gram boyamaya nazaran biraz daha yüksek olsa da, uygulaması kolay, hata payı düşük ve güvenilir bir yol olarak değerlendirilmektedir.

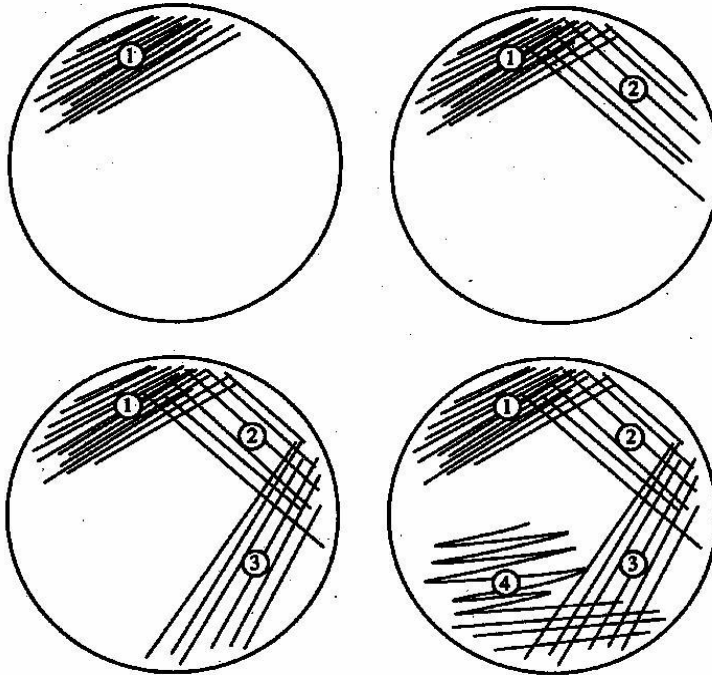
3.2. Örneklerin kültür vasatlarına ekilmesi

Hazırlık

- Örnekler geciktirilmeden besiyerlerine ekilmelidir. Bunun için bütün örnekler çalışma formuna ve laboratuvar protokol defterine kaydedilir.
- Uygun sayıda besiyeri plağı (KKA ve CTBA) buzdolabından çıkarılır. Oda ısısına gelmeleri sağlanır. Plakların üzerinde işlem protokol numarası, hasta adı, örnek tipi, ekim tarihi belirtilmelidir.
- Bütün ekimler için **tam plak** yüzeyi kullanılmalıdır:
- Eküvyon ile alınan sürüntü örnekleri herhangi bir taşıyıcı besiyerinde gelmediği takdirde, plaklara ekilmeden önce birkaç damla 'nutrient' buyyon ile eküvyonların ıslatılması gerekir.



Şekil 2. Difteri şüpheli örneklerin CTBA ve KKA besiyerlerine ilk inokülasyonu. İşlem daima bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır! (Kaynak: RSHMB, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı Arşivi, Ankara, 2007)



Şekil 3. Klinik örneklerin azaltma yöntemi ile plaklara ekimi (11).

- Eküvyon ile önce CTBA sonra KKA'nın üst ¼ yüzeyine ekim yapılır; ardından plakların geri kalan kısımlarına azaltma yöntemi ile yayılır (bkz. Şekil 3).
- Otopsi örnekleri - en fazla bir zeytin büyüklüğünde bir doku parçası 5 mL TSB içine konur. Mekanik bir doku öğütücü ile homojenize edilir. Steril bir Pastör pipeti kullanılarak homojenattan alınır ve her plağa 2 damla örnek konur; L öze ile CTBA ve KKA yüzeyine ekim yapılır.
- İlk ekimler yapıldıktan sonra kalan orijinal örnekler laboratuvar sonucu çıkana kadar (ortalama 5-7 gün), 2-8°C'de saklanmalıdır.

3.3. Kültür plaklarının inkübasyonu

- Ekim yapılmış plaklar biyogüvenlik kabininde kapakları yarım kapatılmış şekilde, yüzeyleri kuruyuncaya kadar bekletilirler. Yüzeyleri kurumuş plaklar kapak alta gelecek şekilde ters çevrilerek inkübatöre kaldırılırlar.
- Yüzeyi kurumadan inkübe edilen plaklarda yayılarak üreme olur; tek koloni ayırt edilemez. Bu nedenle yüzeyin kurduğundan emin olunmalıdır. Özellikle L öze ile yapılan ekimlerde yüzeyin kurması zaman alabilir.
- Plaklar, 36°C'de, normal atmosferde, 18-48 saat inkübe edilir.

3.4. Kültür plaklarının değerlendirilmesi

- Herhangi bir kuşkulu koloninin olabildiğince çabuk pasajlanabilmesi için ilk ekim plakları 18-24 saat inkübasyonun ardından incelenmelidir. Bu inceleme mümkünse koloni mikroskopunda yapılmalıdır (Şekil 4a).
- Değerlendirme, koloni mikroskopunda $\times 20$ – $\times 50$ büyütme ile yapılır. Koloni mikroskobu mevcut değilse kolonilerin incelenmesinde bir el büyüteci kullanılmalıdır.

Şekil 4. (a) koloni mikroskopunda plakların incelenmesi
(b) CTBA'da *Corynebacterium* spp'nin koloni görünümü (Kaynak: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı Arşivi, Ankara, 2007)



(a)



(b)

- Eğer KKA'da görünür bir üreme yoksa, bu durum sürüntü örneğinin yetersiz alınmış olmasına veya antibiyotik tedavisi nedeniyle doğal floranın baskılanmış olmasına bağlıdır. Antibiyotik tedavisi başlanmamış ise hastadan hemen yeni bir örnek istenmelidir.
NOT: KKA plakları sıklıkla olgularda bulunabilen piyojenik streptokokların (Grup A, C veya G) saptanmasında kullanışlıdır.
- CTBA plaklarında tipik *Corynebacterium* kolonilerinin 48 saat inkübasyon sonrasında gelişmesi beklenir. Bu nedenle ilk 24 saat sonrası incelemesinden sonra plaklar tekrar inkübatöre kaldırılmalıdır.
- İnkübasyonun ardından primer izolasyon plakları incelendiğinde;
 - (a) CTBA besiyerinde flora bakterilerinin belirgin bir şekilde inhibe oldukları ve varsa hemen yalnızca tellüriti indirgeyen türlere ait siyah kolonilerin bulunduğu dikkati çeker (Şekil 4b).
 - (b) KKA'da florada mevcut tüm bakteriler ürer. Varsa beta-hemolitik streptokoklara ait koloniler de KKA'da ayırt edilir ve A grubu beta hemolitik streptokok yönünden değerlendirilir (bkz. Şekil 1).
 - (c) Bazı *C. diphtheriae* kökenleri potasyum tellürite duyarlıdır ve tellüritli besiyerinde inhibe olabilirler. Bu nedenle KKA ekimlerinin, kuşkuyla *C. diphtheriae* kolonilerinin varlığı açısından da dikkatlice incelenmesi gerekir.

3.5. Şüpheli kolonilerin tanımlanması (10,11,15)

- Difteri etkeni *Corynebacterium* türlerinin KKA ve CTBA'da koloni görünüm özellikleri Tablo 2'de verilmektedir.
- KKA'da bazı *C.diphtheriae* biyovaryları ile *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* dar beta hemoliz zonu oluştururlar. Hemolizli koloniler ve gri-beyaz, kuru, konveks koloniler veya krem- turuncu renkli koloniler ileri tanımlama adımları için seçilmelidirler.
- *Corynebacterium* türlerinin CTBA'daki tipik koloni görünimleri ise genellikle kuru, gri/siyah, opak, mat yüzlü koloniler şeklindedir. Büyüklükleri biyovara veya türe göre biraz değişkenlik gösterir. CTBA besiyerinden bu özelliklere sahip bütün koloniler seçilip incelemeye alınmalıdır.

ÖNEMLİ NOT: Bazen bir vakada birden fazla *C.diphtheriae* biyovaryını veya bir biyovaryın toksijenik ve non-toksijenik kökenlerini aynı anda izole etmek mümkündür. Tanımlama adımlarına almak üzere olabildiğince çok koloni seçilmesi izolasyon şansını ve farklı kökenleri yakalama şansını artırmaktadır.

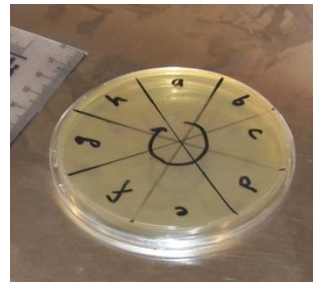
- *Corynebacterium* türlerinin Tinsdale agardaki tipik koloni görünimleri de aşağıdaki gibidir.
 - (a) Tüm *C.diphtheriae* biyovaryları, *C.ulcerans* ve *C.pseudotuberculosis* Tinsdale agarda kahverengimsi siyah hale ile çevrili siyah koloniler oluşturur (bkz. Şekil 5).
 - (b) Bunların dışındaki *Corynebacterium* türleri Tinsdale agarda **halesiz** siyah koloniler oluştururlar.

Tablo 2. CTBA'da ve KKA'da difteri etkeni patojen *Corynebacterium* spp'nin koloni özellikleri.

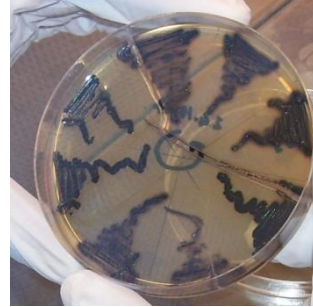
	KKA	CTBA
<i>C.diphtheriae</i>		
biovar <i>gravis</i>	hemolizsiz koloniler	Öze ile dokunulduğunda kolayca parçalanıp küçük segmentlere "ayırılma" eğiliminde; donuk, kuru, gri, opak, 1.5-2 mm çapında, mat yüzlü koloniler yapar. Bazen kırılmadan yüzeyde "kayar".
biovar <i>mitis</i>	Dar beta hemoliz zonu olan koloniler	Düzgün kenarlı ve düz yüzeyle, 1.5-2 mm çapında, gri, opak koloniler yapar. Büyüklük varyasyonları yaygın bir özelliktir.
biovar <i>intermedius</i>	Dar beta hemoliz zonu olan koloniler	0.5-1 mm çapında, küçük, gri, translusent koloniler yapar.
biovar <i>belfanti</i>	Dar beta hemoliz zonu olan koloniler	<i>C.diphtheria</i> biovar <i>mitis</i> kolonilerine çok benzer.
<i>C.ulcerans</i>		
	Dar beta hemoliz zonu olan, gri-beyaz, kuru, konveks koloniler	Gri/siyah, opak, çok kuru koloniler
<i>C.pseudotuberculosis</i>		
	Dar beta hemoliz zonu olan, krem- turuncu renkli koloniler	Gri/siyah, opak, çok kuru koloniler



(a)



(b)



(c)

Şekil 5.

(a) *C.diphtheriae*'nin Tinsdale agarda koloni görünümü; çevresinde kahverengi hale ile siyah koloniler;

(b) Sistinaz aktivitesi tayini için pasaj yapmak amacıyla hazırlanmış Tinsdale plağı;

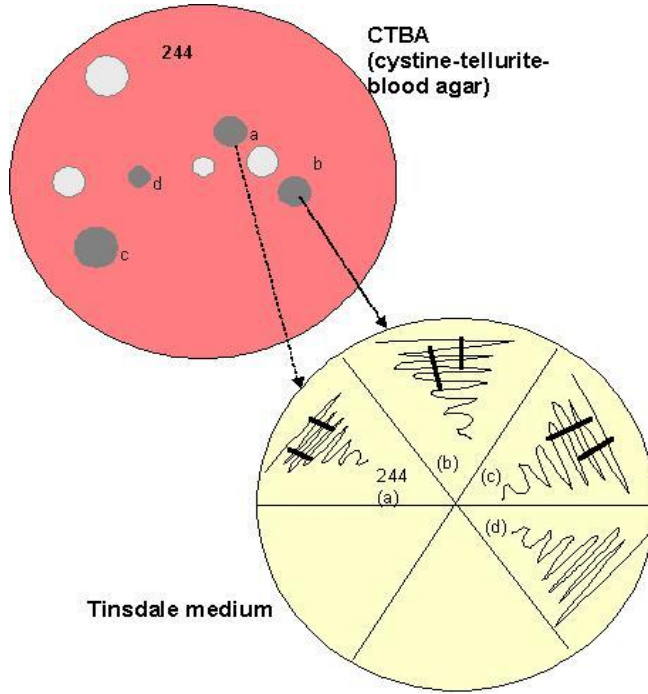
(c) Tinsdale pasajında 18 s inkübasyon sonrası üreme.

(Kaynak: RSHMB, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı Arşivi, Ankara, 2007)

3.6. Şüpheli kolonilerden ileri tanımlama basamaklarına geçiş

- CTBA'da görülen siyah koloniler ve KKA'da görünümü *C.diphtheriae* morfolojisi ile uyumlu olanların belirlenmesi ve ileri tanımlama testlerine alınması gereklidir.
- Daha önce de belirtildiği gibi, bazen bir olguda birden fazla *C.diphtheriae* varyantı birlikte bulunabileceğinden ileri tanımlama için çok sayıda koloni seçilmesinde fayda vardır.

- Teknik şöylece uygulanır:
 - (a) Yeterli sayıda Tinsdale plakları alınır; her biri cam kalem ile 6-8'e bölünür ve örneğin protokol numarası yazılır. Bir klinik örnekten birden fazla koloni seçildiği takdirde her bir koloni *ayrıca* alfabenin harfleri ile adlandırılır (Şekil 5).
 - (b) Daha sonra seçilen her koloni bölmelerden birine pasajlanır ve ilk ekim bölgesi yüzeyine öze ile hafifçe iki-üç kesik atılır (sistinaz aktivitesinin daha iyi izlenebilmesi için) (Şekil 6).
 - (c) Tinsdale besiyeri pasajları 24 saat sonra değerlendirilir. Uzamış inkübasyonda başka bazı bakteri türlerinin de kahverengi hale oluşturma ihtimali artmaktadır.



Şekil 6. CTBA'daki kuşkulu kolonilerin, sistinaz aktivitesi araştırması için, Tinsdale agara pasajı. KKA'dan seçilen kuşkulu koloniler de benzer şekilde Tinsdale agara pasajlanır (17).

3.7. Tarama ve tanımlama testleri

Tarama

- Tarama testleri olarak sistinaz ve pirazinamidaz aktivitelerinin varlığı araştırılır.
- **Sistinaz** pozitifliği Tinsdale besiyerinde siyah koloni etrafında kahverengi hale oluşumu ile ayırt edilir.
- *C. diphtheriae*'nin gravis, mitis, intermedius biyovaryları ve diğer toksin üretme potansiyeli olan türler (*C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*) **sistinaz pozitif**dir.

- Sistinaz testinin yanı sıra **pirazinamidaz** da aynı biyovaryların ve türlerin ön tanısı için kullanışlı tarama testleridir (bkz Ek-4).
- Ancak bulgular bu testlerden sadece birinin değil ikisinin birlikte kullanıldıklarında yeterli olacağını ortaya koymaktadır.
- Sonraki tanımlama basamaklarına geçmek için sistinaz pozitif bulunan bütün kolonilerden;
 - (a) KKA'ya pasaj yapılır - saf kültür elde etmek ve bu saf kültürden pirazinamidaz testi, biyokimyasal testler ve Elek testi yapmak için. 24 saat inkübasyondan sonra da sayılan tanımlama basamaklarına geçilir (Şekil 1).
 - (b) Loeffler'in serum koagüleye pasaj yapılır - mikroskopik morfolojiyi değerlendirmek için (Şekil 1).

Boyama özellikleri

- Loeffler'in serum koagüle besiyerindeki **4-6 saatlik** üremeden Gram ve metilen mavisi boyamaları yapılmalıdır.
- Patojenik *Corynebacterium*'ların ortak mikroskopik özellikleri şöylece sıralanabilir (10,11,15):
 - Genellikle gram pozitifler, fakat bazı *C.diphtheriae* izolatları fazla dekolorize olmaya eğilimlidirler ve gram-değişken görünebilirler.
 - Uçlara doğru incelen, düz veya hafifçe kıvrık pleomorfik çomaklardır.
 - Hareketsizdirler.
 - Spor yapmazlar.
 - Asit-fast boyanmazlar.
 - Metakromatik granül oluşumuyla birlikte düzensiz boyanırlar.

Biyokimyasal testler

- Sistinaz aktivitesinden başka önerilen başlıca konvansiyonel testler:
 - katalaz üretimi,
 - nitrat redüksiyonu,
 - üre hidrolizi,
 - pirazinamidaz aktivitesi, ve
 - glikoz, sukroz, maltoz ve nişasta fermentasyon testleridir (Ek-5).
- Hızlı biyokimyasal tanı kitleri de kullanılabilir ve böylece daha fazla biyokimyasal özellik test edilebilir.
- Çoğu *C. diphtheriae* suşları;
 - sistinaz pozitif, pirazinamidaz negatif, katalaz pozitif, üre negatif, nitrat pozitif, glikoz, maltoz, nişasta (yalnızca *gravis*) fermentasyonu pozitifdir (bkz Tablo 3).

ÖNEMLİ NOT: Buraya kadarki tanımlama çalışması *C. diphtheriae*, *C.pseudotuberculosis* ya da *C. ulcerans* türlerinden birine işaret ediyor ise izolatlar hemen ve mutlaka Referans laboratuvara gönderilmelidir. Hekime biyotiplendirme sonucu tanımlanan etken "ön rapor" olduğu belirtilerek rapor edilir ve bu raporda toksijenite testleri için izolatın Referans laboratuvara gönderildiği ifade edilir.

Tablo 3. *Corynebacterium*lar için biyokimyasal tanımlamada kullanılan özellikler (11,12,13,18)

Mikroorganizma	CYS	PYZ	nitrat	üreaz	glukoz	maltoz	sukroz	nişasta	trehaloz	Jelatin eritme
<i>C.diphtheriae</i>									U	
var gravis	+	-	+	-	+	+	-	+	U	U
var mitis	+	-	+	-	+	+	-	-	U	U
var intermedius	+	-	+	-	+	+	-	-	U	U
var belfanti	+	-	-	-	+	+	-	-	U	U
<i>C.ulcerans</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	+	25°C'de +
<i>C.pseudotuberculosis</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	25°C'de -
<i>C.pseudodiphthericum</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	U	U
<i>C.xerosis</i>	-	+	+	-	+	+	+	-	U	U
<i>C.striatum</i>	-	+	+	-	+	-	+/-	-	U	U

CYS, Tinsdale besiyerinde sistinaz üretimi; bir gece inkübasyondan sonra karakteristik kahverengi hale ile çevrili siyah koloni oluşumu POZİTİF olarak değerlendirilir.

PYZ, Pirazinamidaz aktivitesi; 4 veya 24 saatlik tüp test; reagen eklenmesi ile reaksiyon sonucu turuncu renk oluşumu POZİTİF olarak değerlendirilir (bkz. Ek-4).

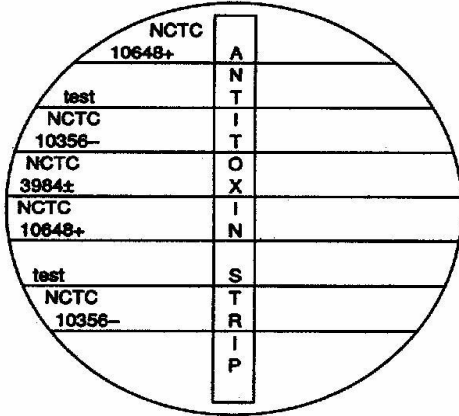
U, uygulanmaz

3.8. Toksikite testleri

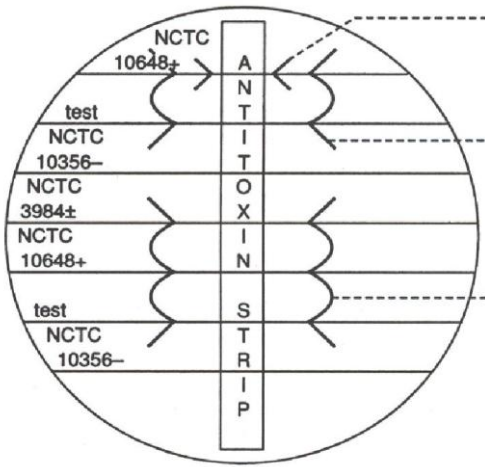
Biyokimyasal testlerle yalnızca organizmanın türü ve biyotipi tanımlanır. Elde edilen izolatin hastalık etkeni olduğunu ileri sürebilmek için ise **toksin** üretip üretmediğinin gösterilmesi gerekir.

Elek testi (Konvansiyonel yöntem)

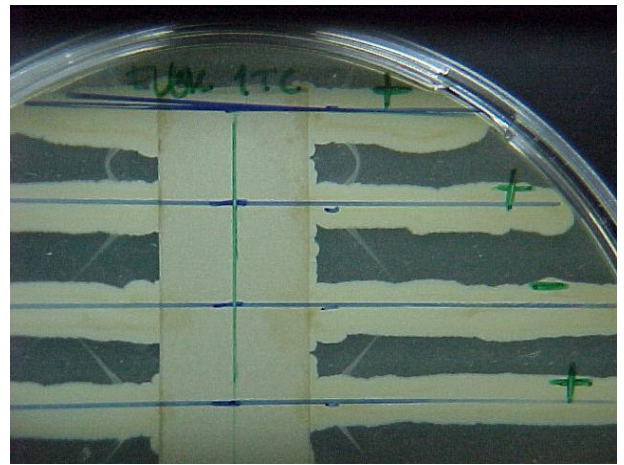
- Toksin üretimi araştırılacak izolat ile birlikte aşağıda belirtilen standart suşların da mutlaka test edilmesi gereklidir.
 - C. diphtheriae* NCTC 10648; toksin üreten pozitif kontrol suşu
 - C. diphtheriae* NCTC 3984; zayıf toksin üreten pozitif kontrol suşu
 - C. diphtheriae* NCTC 10356; toksin üretmeyen negatif kontrol suşu
- Test edilecek izolatin ve standart suşların taze pasajlarından Şekil 7'de gösterilen şekilde Elek besiyeri plağına ekim yapılır. Özel filtre kağıdından hazırlanan ve 1000 IU difteri antitoksini emdirilmiş şeritler, ekim çizgilerine dik olacak şekilde (tam olarak 90° açı ile) yerleştirilir.
- Plaklar 36°C'de inkübe edilir. Test 24-48. saatte değerlendirilir.
- Pozitif kontroller ile 'ark' formu oluşturan klasik presipitasyon çizgileri toksin üreten kökeni belirtir.
- Karakteristik presipitasyon çizgileri; şeritten 10 mm uzaklıkta ve üreme çizgisine 45° açı ile oluşur. Test kökeni benzer çizgiler oluştursa toksijenik olarak yorumlanır (Şekil 8 ve 9). Toksikite olmayan kökenler böyle çizgiler oluşturmaz.
- Eğer testin inkübasyon süresi 48 saati geçerse özgül olmayan presipitasyon bantları görülür. Difteri toksininden farklı olarak çözünür antijenlere bağlı özgül olmayan presipitasyon çizgileri toksijenik ve toksijenik olmayan kökenler tarafından oluşturulabilir.



Şekil 7. Elek testinin uygulanış planı (solda) (11).



Şekil 8. Elek testinin değerlendirilmesi için şematik çizim (üstte) (11).



Şekil 9. Elek testinin değerlendirilmesi, ELEK test besiyerinden fotoğraf. Antitoksin emdirilmiş **filtre kağıdı** düşey konumda (plağın ortasına yerleştirilmiş) ve toksin üretimi araştırılan *Corynebacterium* izolatlarının **ekim çizgileri** buna dik konumda görülmektedir. Ekim çizgileri arasında en üstte görülen presipitat arkı her iki izolatın da toksin pozitif olduğunu göstermektedir (Kaynak: RSHMB, Difteri-Boğmaca Referans Laboratuvarı Arşivi, Ankara, 2007)

Difteri toksin araştırması için diğer immunoassayler:

- Bu testler duyarlı ve özgül olmalarına rağmen, yorucu ve zaman alıcı olmaları ile rutin kullanımda tavsiye edilmezler (10,11).

In vivo toksin testi

- Virülans (toksin üretimi) testi, Loeffler'de üreyen canlı bakterilerin korunmamış ve korunmuş (bakteri inokülasyonundan hemen önce, 200U difteri antitoksini verilmiş) kobaylara enjeksiyonudur.
- Bu test yalnızca tecrübeli laboratuvarlar tarafından uygulanabilir. Çoğu kez sonuç 48-72 saat içerisinde belirgin olmasına rağmen, eğer *C.diphtheriae* izolatı zayıf toksijenik ise karakteristik özelliklerin gelişmesi 7-10 gün sürebilir (11).

3.9. Antimikrobiyal duyarlılık

Penisilin ve eritromisin

- Difteri hastalarında ve taşıyıcılarda antimikrobiyal tedavi için ilk seçenek penisilin ve eritromisindir (11,19).
- Öte yandan yapılan çeşitli çalışmalarda; penisiline ve eritromisine direnç gösteren izolatlar olduğu, eritromisin direncinin penisilin direncine göre daha sıklıkla rapor edildiği gösterilmiştir (19).

Diğer antibiyotikler

- Uluslararası kaynaklarda *C.diphtheriae* izolatlarının çoğu antibiyotiğe duyarlı olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte çok ilaca dirençli kökenler olabileceği akılda tutulmalıdır (19,20,21).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri

- Ek-6'da verilmiştir.

4 Difteri tanısında diğer yöntemler

4.1. PCR ile difteri toksin geninin saptanması

- Difteri toksin geninin özellikle 248bp'lik biyolojik olarak aktif bölgesinin (A fragmanı) ve A+B fragmanlarının PCR ile saptanabileceği ortaya konmuştur. Günümüzde genin farklı bölgelerine özgül çeşitli primerler tanımlanmış olup başarıyla kullanılmaktadır (7,10,11).

4.2. Seroloji

- Serolojik tanı (serokonversiyon veya 4 kat titre artışının gösterilmesi) pratik olarak mümkün görünmemektedir; çünkü klinik difteri tanısı almış vakalara tedavi protokolleri gereği antiserum uygulanmaktadır.
- Buna karşın (tedavi başlanmadan önce alınacak) bir serum örneği, kişinin hastalığa yakalandığı andaki bağışıklık durumunu ortaya koyması bakımından anlamlıdır.
- Hastalık başladığında antikorların koruyucu düzeyin altında (<0.01 IU/ml) olduğunun gösterilmesi, kültürlerde bakteri izole edilemeyen vakalarda klinik tanıyı destekleyebilir (11).

4.3. Mikroskopi

- Difteri tanısında direkt mikroskopik incelemenin **yeri yoktur!** Klinik örneklerin direkt preparatlarının mikroskopik incelemesi temelinde difteri tanısı, yanlış pozitif ve yanlış negatif bulma olasılığının yüksek olması nedeniyle önerilmez (7,10).

*Difteri tanısında
'direkt
mikroskopik
inceleme'nin
yeri yoktur!!*

4.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Kültürde izole edilen *Corynebacterium* türlerinin toksijenik olup olmadığının saptanması, antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması, izolatlar arasındaki epidemiyolojik bağlantının anlaşılması, izolatların yerli veya yabancı kökenli olup olmadığının belirlenmesi için Referans laboratuvara gönderilmesi gereklidir. Bu incelemeler, halk sağlığı önlemleri için ilgili otoritelere yol gösterici sonuçlar üretir.
- Örneklerin ve izolatların gönderilmesinde *paketleme ve taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (22) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Laboratuvarlar, izolatlarını saklayabilmelidir. İzolatların saklanması ile oluşturulacak bir arşiv hem laboratuvarın hem de süveyans sisteminin belleğini oluşturur. Bu nedenle her laboratuvar izolatlarını saklayabilmeli ve gerektiğinde ileri incelemeler için yeniden canlandırabilmelidir.
- Saklama için *Corynebacterium* izolatlarının %16'lık gliserollü triptik soy buyyon içinde yoğun süspansiyonu yapılır ve -80°C'ye kaldırılır. Bu koşullarda bakteri 8-10 yıl saklanabilir. İzolatların hem saklanması hem de yeniden canlandırılmasında gerekli besiyerleri ve teknikler için bkz B-TP-01 Suş Saklama Prosedürü.

5 Raporlama ve bildirim

5.1. Sonuçların rapor edilmesi

- Negatif kültürlerin raporu - "Patojen etken üremedi" şeklinde verilir.
- Pozitif kültürler - mutlaka üreyen *Corynebacterium* kökeninin cins, tür ve biyovar adı açık yazılarak ve toksin üretilip üretilmediği bilgisi ile birlikte rapor edilir. *Örneğin*;
 - "Toksijenik *Corynebacterium diphtheriae* biyovar gravis üredir"
 - "Non-toksijenik *Corynebacterium diphtheriae* biyovar mitis üredir"
 - "Toksijenik *Corynebacterium ulcerans* üredir"... gibi.

5.2. Bildirim

- Difteri **bildirimi zorunlu** bir hastalıktır (3,2,23).
- Mevcut bildirim sistemine göre İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne bildirim yapılması gerekmektedir.
- Bildirim klinisyenin sorumluluğudur. Bununla birlikte (difterinin *laboratuvardan bildirimi* zorunlu olmasa da) pozitif sonuç elde edilir edilmez laboratuvarın ilgili birime haber vermesi (ör., telefon ile) önerilir. Bu, epidemiyolojik incelemelerin bir an önce başlatılabilmesi ve temaslı taramaları için zaman kazandıracağından dolayı değerlidir (3,2,23).

- Vaka tespit edildiğinde, difteri temaslı taramasına başlanır. Toksikjenik *C. diphtheriae* ile enfekte bir difteri olgusu ile son 7 gün içinde her kim yakın temasta bulundu ise risk altında olduğu kabul edilir. Temaslı taramasında uygulama Sağlık Bakanlığının 2003 yılında yayınlamış olduğu "Difteri Saha Rehberi"ne göre yapılmalıdır (3).
- Toksikjenik olmayan *C. diphtheriae* veya toksikjenik olan veya olmayan *C. ulcerans* izole edilen olguların yakın temaslıları risk altında değildir.

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Difteri tanısında kültür 'altın standart'tır. Ancak, patojen bakterilerin kültürden izole edilebilmesi için iyi örnek alınması ve uygun şartlarda laboratuvara ulaştırılması gerekir.
- Antibiyotik tedavisi başladıktan sonra alınan örneklerin kültüründe izolasyon şansı oldukça azdır.
- *Corynebacterium* türlerinin normal boğaz ve nazofarinks florasında da bulunması nedeniyle kültürde seçici ve yüksek seçici besiyerlerinin kullanılması gereklidir. Boğaz florasında bulunan bakteriler ve özellikle patojen olmayan *Corynebacterium*ların varlığı nedeniyle KKA'dan difteri şüpheli kolonilerin seçilmesi oldukça deneyim gerektiren bir iştir.
- PCR ile elde edilen toksin geni pozitifliğinin mutlak suretle Elek test ile doğrulanması gereklidir.
- Serolojik incelemeler daha çok serosürveyans amacıyla yapılır.

7 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı
ve

Aşı ile Önlenebilir Bakteriyel Hastalıklar Seroloji Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr; usyprl@saglik.gov.tr
Tel: 0312 458 2167 / 2000, 1727

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden toksikjenik *Corynebacterium* spp için tanı, doğrulama, toksin araştırma, moleküler tanı ve tiplendirmelerin yapılması; difteri serolojisi ve seroepidemiolojik sürveyans çalışmaları yürütülmesi; bölgesel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması.

Ekler

Ek-1 CTBA besiyerinin hazırlanması

1000 mL besiyeri için gerekli materyal

Agar baz için

Lab Lemco Powder	10.0 g
Pepton	10.0 g
NaCl	5.0g
Agar	18.0g
Deiyonize su	1000 mL

Suplement için

L sistin	50 mg
Potasyum tellürit, %2'lik	18 mL
Koyun kanı	50 mL

Agar bazın hazırlanması

- 1 Agar baz için listelenen maddeler tartılır. Deiyonize su eklenir. Manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırılır. pH'sı 7.4 ± 0.2 'ye ayarlanır. 121°C 'de 20 dk otoklavlanır.

Suplementin hazırlanması

- 1 %2'lik potasyum tellürit hazırlanır. Bunun için 2.0 g potasyum tellürit tartılır; 100 mL deiyonize su eklenir. Solüsyon kendinden sterildir. Karanlıkta (vida kapaklı kahverengi şişede veya alüminyum folyo kaplanmış şişede), oda sıcaklığında, 6 ay saklanır.
- 2 L sistin (50 mg) tartılır.
- 3 Koyun kanı (bir litre besiyeri için 50 mL) oda ısısına getirilir.

Besiyerinin dökülmesi

- 1 Otoklavdan çıkarılan besiyeri önceden 55°C 'a ısıtılmış su banyosuna konur, soğuması beklenir (besiyeri miktarına göre 30-60 dakika sürer).
- 2 Besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcıya konur, karıştırılmaya başlanır. Üzerine koyun kanı, L-sistin ve %2'lik potasyum tellürit (listede verilen miktarlarda) eklenir.
- 3 İyice karışması beklenir ve tekrar pH kontrolü yapılır. Bunun için;
 - (a) Aseptik şartlarda 2-3 mL besiyeri küçük bir tüpe alınır, donması beklenir.
 - (b) pH metre probu besiyerine daldırılarak pH ölçülür. pH, steril 1N HCl ve steril 1N NaOH kullanılarak 7.4 ± 0.2 'ye ayarlanır.
- 4 Önceden UV lambası açılmış ve ~30 dk ortam dekontaminasyonu sağlanmış odada besiyeri dökme işlemine geçilir. Bütün plaklar **önceden** besiyerinin adı ve hazırlama tarihi yazılarak etiketlenmiş olmalıdır.
- 5 Her Petriye (90 mm çaplı, tek kullanımlık), ~28 mL besiyeri dağıtılır. Besiyeri dökülen plaklar bir gece üzeri temiz bir örtü ile kapatılarak bekletilir.
- 6 Ertesi gün plaklar -kapaklar alta gelecek şekilde- ters çevrilir, naylon torbalara kaldırılır; torba üzeri de besiyerinin adı, hazırlama tarihi ve son kullanma tarihi (SKT) yazılarak etiketlenir; buzdolabında saklamaya alınır. Bu şekilde nem kaybı önlenerek saklandığında **raf ömrü** 2 aydır. Torbaların içine aşırı nemlenme olasılığı için silika-jel paketleri konabilir. Hazırlanan her besiyeri serisinden kalite kontrol yapılır.

Ek-2 Tinsdale agar besiyerinin hazırlanması

200 mL için gerekli maddeler

Agar baz için

Tinsdale agar baz	9.0 g
Deiyonize su	200 mL

Suplement için

At serumu	20.0 mL
L sistin solusyonu, %20'lik	0.24 mL
Potasyum tellürit, %2'lik	2.5 mL
Sodyum tiyosülfat, %2.5'luk	3.0 mL

Agar bazın hazırlanması

- 1 Tinsdale agar baz tartılır.
- 2 Üzerine 200 mL deiyonize su eklenir.

Suplement hazırlanması

- 1 L sistin solüsyonu (%20'lik): 2 g L sistin tartılır. 10 mL 2M HCl eklenir. Solüsyon kendinden sterildir. Karanlıkta (vida kapaklı kahverengi şişede veya alüminyum folyo kaplanmış şişede), oda sıcaklığında, 6 ay saklanır.
- 2 Potasyum tellürit solüsyonu (%2'lik): 2 g potasyum tellürit tartılır. Steril 100 mL deiyonize su eklenir. Solüsyon kendinden sterildir. Karanlıkta (vida kapaklı kahverengi şişede veya alüminyum folyo kaplanmış şişede), oda sıcaklığında, 6 ay saklanır.
- 3 Sodyum tiyosülfat (%2.5'luk): 0.25 g sodyum tiyosülfat tartılır. Steril 10 mL deiyonize su eklenir. Her seferinde **taze** olarak hazırlanır ve filtrasyon ile steril edildikten sonra besiyeri için gerekli olan miktar eklenir.
- 4 At serumu oda ısısına getirilir.

Besiyerinin dökülmesi

- 1 Otoklavdan çıkarılan besiyeri önceden 55°C'a ısıtılmış su banyosuna konur, soğuması beklenir (besiyeri miktarına göre 30-60 dakika sürer).
- 2 Besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcıya konur, karıştırılmaya başlanır.
- 3 **200 mL besiyeri** için 0.24 mL L sistin solüsyonu, 2.5 mL potasyum tellürit solüsyonu, 3 mL sodyum tiyosülfat solüsyonu ve 20 mL at serumu eklenir.
- 4 İyice karışması beklenir ve tekrar pH kontrolü yapılır. pH kontrolü ve takip eden adımlar Ek-1'de "Besiyerinin dökülmesi" başlığının altındaki 3-6. maddelerde verildiği şekilde yapılır.

Ek-3 Besiyerlerinin kalite kontrolü

Difteri besiyerlerinin kalite kontrolünde **sterilite kontrolü**nün yanı sıra, istenen bakterilerin **üremesi** ve istenmeyen bakterilerin baskılanmasını gözlemlemek gerekir.

Pozitif kontrol organizmaları olarak mümkünse toksijenik olmayan *Corynebacterium* kökenleri (ideali ATCC veya NCTC suşları) kullanılmalıdır (bkz. Tablo 1). Difteri vakasından elde edilmiş -hiç pasajlanmamış veya az pasajlanmış- bir klinik izolat da kullanılabilir. Daha önce hiç izolasyon gerçekleştirmemiş bir laboratuvar böyle suşları Referans laboratuvarından isteyebilir.

Sterilite kontrolü

- 1 Yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 37°C'de 3 gün inkübe edilirler. Herhangi bir bakteri veya mantar ürememiş olmalıdır.

Üreme ve seçici özellik kontrolü

Kontrol suşlarının hazırlanması

- 1 Kontrol suşlarının (*S. aureus* veya *S. pyogenes* dahil) kanlı agara pasajları yapılır. Bu pasajlardan McFarland No1 yoğunluğunda olacak şekilde steril TSB içinde süspansiyon hazırlanır.
- 2 Bu süspansiyonlar eşit miktarda steril %10'luk 'skim-milk' ile karıştırılır ve küçük alikotlar halinde derin dondurucu tüplerine tevzi edilir; -80°C'ye kaldırılır. Bu şekilde hazırlanmış bakteri süspansiyonları ~5 yıl -80°C'de saklanabilir.

Kalite kontrolün uygulanması

- 1 Derin dondurucudan kontrol suşlarından birer alikot çıkarılır; eritilir ve steril TSB ile 1/100 oranında sulandırılır. (Test edilecek besiyerine göre)
- 2 10 µL standart öze ile test edilecek besiyeri plağına bir öze dolusu ekimleri yapılır. CTBA 48 saat, Tinsdale agar 24 saat, 36°C'de inkübe edilir ve koloni sayımı yapılır.
- 3 Besiyerine göre ekim yapılacak organizmalar ve beklenen sonuçlar Tablo 4'de verilmiştir. *Corynebacterium* suşu için orijinal süspansiyonun tam konsantrasyonuna bağlı olarak 50 ila 200 arasında siyah koloni sayılmalıdır.

Tablo 4. Kalite kontrolü için besiyerlerine ekilecek bakteri suşları ve beklenen sonuçlar.

Besiyeri	Ekim yapılacak kontrol organizması ve beklenen sonuç	
	Pozitif kontrol	Negatif kontrol
CTBA	<i>C. diphtheriae</i> – ürer, gri-siyah koloniler (50-200 koloni)	<i>S. aureus</i> - inhibe olur (kısmen veya tamamen)
Tinsdale	<i>C. diphtheriae</i> - ürer, kahverengi hale yapmış siyah koloniler oluşturur (50-200 koloni)	<i>C. xerosis</i> (veya <i>S. pyogenes</i>) - halesiz siyah koloniler oluşturur (50-200 koloni)

- 4 Her besiyeri lotunun sterilite kontrol sonuçları ve koloni sayımları ayrıntılı olarak kayıt edilmelidir. Zaman içinde derin dondurucuda saklanan inokulumdaki canlı organizma sayısı azalabilir. Koloni sayımının azalması bu nedenle besiyerinin kalitesinde bir azalma gibi yorumlanmamalıdır. Bu olasılığı değerlendirmek için aynı lot taze bir izolat ile test edilir ve sonuç karşılaştırılır.

Ek-4 Pirazinamidaz (PYZ) testi

Reaktifler

Pirazinamid solüsyonu

- Pirazinamid distile suda 2 mg/mL olacak şekilde hazırlanır
- 0.45 µm membran filtreden geçirilerek steril edilir.
- Steril burgu kapaklı derin dondurucu tüplerine tevzi edilir. -20°C'de saklanır.

PYZ reaktifi (ferroz amonyum sülfat)

- %20'lik (2 g ferroz amonyum sülfat, 10 mL steril distile suda) olacak şekilde hazırlanır.
- -20°C'de saklanır.

Güvenlik uyarısı!

Pirazinamid toz formunda tehlikelidir! Deriye temas etmemeli ve solunmamalıdır!

Kontrol suşları

- Pozitif kontrol - *C. xerosis* NCTC 12078
- Negatif kontrol - *C. ulcerans* NCTC 12077

PYZ testinin yapılışı

- 1 Üç adet steril tüpe 0.25 mL Pirazinamid solüsyonu dağıtılır.
- 2 Tüplerden birinde test kökeninin yoğun bulanık süspansiyonu (McFarland No 8) hazırlanır. Diğer iki tüpte ise pozitif ve negatif kontrol süspansiyonları hazırlanır.
- 3 37°C'da 4 saat veya bir gece inkübe edilir.
- 4 İnkübasyondan sonra her süspansiyona birer damla PYZ reaktifi eklenir.
- 5 Oda sıcaklığında 1-5 dk beklenir.
- 6 Test tüpü pozitif ve negatif kontrol tüpleri ile karşılaştırılır.

Yorum

- 1 Pozitif tüpte bulanık/paslı pembe bir renk oluşumu gözlenmelidir.
- 2 Negatif tüpte değişiklik olmaz.
- 3 Sonuç:
Negatif ise - *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* veya *C. pseudotuberculosis*
Pozitif ise - diğer *Corynebacteria* spp

Ek-5 Hiss serum su karbonhidrat besiyeri ve Karbonhidrat fermentasyon testi

Karbonhidrat besiyerinin hazırlanması

- *C. diphtheriae* için karbonhidrat setine glikoz, maltoz, sukroz ve nişasta konur. Genel *Corynebacterium* spp test setine ise glikoz, maltoz, galaktoz, dekstrin, sukroz ve laktoz konur. Laboratuvar bu setlerden hangisini kullanacağını göz önüne alarak şeker ve nişasta içeren karbonhidrat besiyerlerini hazırlamalıdır.

Andrade indikatörü

20 mL distile suda 100 mg asit fuksin karıştırılır. 3.2 mL 1N NaOH damlatarak ilave edilir. Bu işlem ile fuksin renksizleşmeli (saman sarısı renkte olacak).

Baz besiyeri için maddeler

Pepton	5.0 g
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	1.0 g
At serumu	178 mL
Andrade indikatörü	7.8 mL
Distile su	1000 mL

Baz besiyerinin hazırlanması

- 1 Pepton ve Na₂HPO₄ ılık distile suda eritilir ve 15 dk kaynar su banyosunda tutulur. Wattmann kağıt filtreden süzülür. Soğutulur. pH 7.4'e ayarlanır.
- 2 At serumu eklenir karıştırılır; 20 dk kaynar su banyosunda tutulur.
- 3 Andrade ayırıcı eklenerek pH 7.7'ye ayarlanır. Burgu kapaklı şişelere 90 mL tevzi edilir. 115°C'da 10 dk otoklavlanır.

Tam karbonhidrat besiyerinin hazırlanması

- 1 **Şeker** içeren (%1'lik) besiyeri yapmak için;
 - (a) Önce testte kullanılacak her şekerin **stok** (%10'luk) solüsyonu hazırlanır ve her biri 0.22 µm membran filtreden geçirilerek steril edilir; etiketlenir, saklanır.
 - (b) Stok şeker solüsyonundan 10 mL, aseptik olarak 90 mL baza eklenir (her şeker ayrı ayrı). Böylece elde edilen %1'lik şekerler steril burgu kapaklı tüplere 1-1.5 mL alikotlar halinde dağıtılır. Etiketlenir ve buzdolabında saklanırlar.
- 2 **Etanol** 10 mL önceden steril edilmiş 90 mL baza, aseptik olarak, eklenir.
- 3 **Nişasta** testte %0.5'lik konsantrasyonda kullanılır. Bunun için pratik metot 3 mL baz besiyerine bir öze dolusu nişasta ekleyerek karıştırmaktır. Tercih edilen metot ise; bir steril tüpte 0.15 g çözünabilir nişastaya 5 mL steril distile su eklenir. Sürekli karıştırılarak 5 dk kaynatılır. Karıştırılarak soğutulur. 3 mL baz besiyerine hazırlanan nişastadan 0.15 mL (steril Pastör pipeti ile 3 damla) eklenir.

Karbonhidrat fermentasyon testinin yapılışı

- 1 Test edilecek izolatların (pozitif ve negatif kontrol suşları dahil) taze kültürlerinden steril distile su içinde yoğun (McFarland 6-8) bakteri süspansiyonu hazırlanır.
- 2 Örnek sayısı kadar kullanılacak şekerler ve nişasta tüpleri bir spora dizilerek hazırlanır.
- 3 Her tüpe 40-50 µL yoğun bakteri süspansiyonundan konur. 37°C'da 24-48 saat inkübe edilir. Pozitif reaksiyon tüplerde pembe-kırmızı renk oluşumu ile ayırt edilir.

Ek-6 Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Corynebacterium izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı sıvı dilüsyon ve gradient difüzyon (E-test vb.) yöntemi ile araştırılır.

Antimikrobiyal

- Tablo 5’de listelenmiştir.

Besiyerleri

- %2.5-5 lize at kanı ilave edilmiş, katyonlu Mueller Hinton agar (CAMHA) ve katyonlu Mueller Hinton buyyon (CAMHB) kullanılır.
- Besiyerlerinin hazırlanışı için bkz. “UMS, AMD-TP-01-AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması”.

Yöntemler

- CLSI kriterleri doğrultusunda uygulanır. Yöntemlerin uygulanışı ile ilgili olarak bkz “UMS, AMD-TP-04-MIK saptama yöntemleri”

Kalite kontrol suşları

- Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- Escherichia coli* ATCC 25922

Antimikrobiyal duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi

Tablo 5. Antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI M45-A2 ölçütlerine göre değerlendirilir (24).

Antimikrobiyal sınıfı	Antimikrobiyal	MIK (µg/mL) Değerlendirme ölçütü		
		S	I	R
Penisilinler	Penisilin	≤1	2	≥4
Sefemler	Sefepim	≤1	2	≥4
	Sefotaksim	≤1	2	≥4
	Seftriakson	≤1	2	≥4
Karbapenemler	Imipenem	≤4	8	≥16
	Meropenem	≤4	8	≥16
Glikopeptidler	Vankomisin	≤2	-	-
Lipopeptidler	Doptomisin	≤1	-	-
Aminoglikozidler	Gentamisin	≤4	8	≥16
Makrolidler	Eritromisin	≤0.5	1	≥2
Kinolonlar	Siprofloksasin	≤1	2	≥4
Tetrasiklinler	Doksisiklin	≤4	8	≥16
	Tetrasiklin	≤4	8	≥16
Linkozamidler	Klindamisin	≤0.5	1-2	≥4
Folat yolu inhibitörleri	Trimetoprim-sülfametoksazol	≤2/38	-	≥4/76
Anzamisiner	Rifampin	≤1	2	≥4
Streptograminler	Kinopristin-dalfopristin	≤1	2	≥4
Okszolidinler	Linezolid	≤2	-	-

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Difterinin Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-14	Loeffler'in metilen mavisi
UMS, B-TP-15	Nitrat redüksiyonu
UMS, B-TP-22	Üreaz testi
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-04	MIK saptama yöntemleri
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Burkovski A. Diphtheria and its etiological agents. In: Burkovski A (ed). *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. Springer, ISBN 978-94-007-7624-1, e-book.
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 3 Difteri Saha Rehberi. Sağlık Bakanlığı, Ankara-2003.
- 4 Begg N. Diphtheria: Manual for the management and control of diphtheria in the European region. Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO, Copenhagen. 1994.
- 5 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 6 First annual meeting of the European Diphtheria Surveillance, Stockholm, 17 March 2011.
- 7 Guaraldi ALM, Junior RH, Azevedo VCA. Chapter 2. *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*-General Aspects. In: Burkovski A (ed). *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. Springer, ISBN 978-94-007-7624-1, e-book.
- 8 Genişletilmiş Bağışıklama Programı Genelgesi. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-8187/genisletilmis-bagisiklama-programi-genelgesi-2009.html> (son erişim tarihi 06.01.2014).
- 9 Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry mL, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 413-442.
- 10 Berger A, Hogardt M, Konrad R, Sing A. Detection Methods for Laboratory Diagnosis of Diphtheria. In: Burkovski A (ed) *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. Springer, ISBN 978-94-007-7624-1, e-Book.
- 11 Efstratiou A, Maple PA. Manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO. Copenhagen. 1994.

- 12 Efstratiou A, George RC. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Communicable Disease and Public Health*. 1999;2(4):250-257.
- 13 Efstratiou A, Engler KH, Mazurova IK, Glushkevich T, Vuopio-Varkila J, Popovic T. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl1):S138-45.
- 14 ECDC Technical Report. External quality assurance scheme for diphtheria diagnostics 2012. As part of the European Diphtheria Surveillance Network (EDSN). ECDC, Stockholm. 2011.
- 15 UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Corynebacterium* species. http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1313155000824 (son erişim tarihi 06.01.2014).
- 16 Synder JW. *Corynebacterium diphtheriae* cultures. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.11.7.1-9
- 17 Akbas E, Nar S. Difteri tanısı için laboratuvar prosedürleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Ver 2.1, Ankara. 2005.
- 18 DIPNET Diphtheria Surveillance Network. European Workshop on Laboratory Diagnosis of Diphtheria. HPA Centre for Infections, London, 6-8 June 2007.
- 19 Zasada AA. Antimicrobial susceptibility and treatment. In: Burkovski A (ed). *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. Springer, ISBN 978-94-007-7624-1, e-book.
- 20 Zasada AA, Baczewska-Rej M, Wardak S. An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland—molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. *Int J Infect Dis* 2010;14:907-912.
- 21 Mina NV, Burdz T, Wiebe D, et al. Canada's first case of a multidrug-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain, isolated from a skin abscess. *J Clin Microbiol* 2011;49:4003-4005.
- 22 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 23 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (erişim tarihi: 06.01.2014).
- 24 CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious: Approved Guideline-Second Edition. M45-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA. 2010.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Neisseria meningitidis Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-03
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Hastalığın önemi ve epidemiyolojisi	4
Klinik özellikleri	5
Mikrobiyolojik tanısı	6
TEKNİK BİLGİLER	9
1 Hedef mikroorganizma	9
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	9
3 Bakteriyel menenjitlerde tanı için genel akış şeması	12
4 Örneklerin direkt incelenmesi	13
5 Kültür	15
6 Tanıda diğer yöntemler	22
7 Raporlama ve bildirim	22
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	22
9 Referans Laboratuvar	23
EKLER.....	24
Ek-1 Trans-Isolate (T-I) besiyeri hazırlanması.....	24
Ek-2 CTA şeker kullanım besiyeri ve test.....	26
Ek-3 <i>N.meningitidis</i> lam aglütinasyon testi	27
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	28
KAYNAKLAR.....	29

Kapsam ve Amaç

Bakteriyel menenjitler dünya genelinde -özellikle küçük çocuklarda, beyin hasarı, sekeller ve ölümlerle sonuçlanabilen ciddi tablolara yol açtıklarından dolayı- halen en önemli enfeksiyöz hastalıklardır. En sık rastlanan üç meningeal patojen olan *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* vakaların %80'den fazlasını oluştururlar. Erken ve özgül tanı hasta yönetiminde ve hastalığın kontrolü ile ilgili önlemlerin alınmasında önemlidir. DSÖ bu bakteriyel patojenlerin neden olduğu menenjitlerin ya da invaziv hastalıkların dünya genelinde azaltılması ile ilgili yaygın program yürütmektedir (1,2). Ülkemizde de bu üç patojenin neden olduğu menenjitler ve diğer invaziv hastalıklar bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır (3,4).

Bazı klinik özellikleri ile olası etiyoloji akla getirilebilirse de tanı genel olarak klinik bulgular temelinde konulamadığı için bu hastalıkların kesin tanısı mikrobiyolojik incelemeye dayanmaktadır. "Tanı stratejisi"ni ise laboratuvara gelen klinik örneklerden bu üç patojenin saptanması öncelikli olmak üzere bütün olası bakteriyel etkenlerin yakalanabileceği ortak bir tanı akış şemasının izlenmesi oluşturur (1). Laboratuvar tanısında genellikle direkt mikroskopi, hızlı antijen saptama, kültür ve moleküler tekniklerden yararlanılır. Kesin tanı kültür ile ya da bazı durumlarda antijen saptama yöntemleriyle konabilmektedir.

Neisseria meningitidis fırsatçı patojendir ve nazofarinkste hastalık tablosu oluşturmadan bulunabilir. Ancak kan akımı enfeksiyonu yapıp kan beyin bariyerini geçtikten sonra çoğunlukla menenjit tablosu oluşturur. *N.meningitidis* menenjit ve meningokoksemi dışında nadir de olsa pnömoni, artrit, supraglottit ve üretrit gibi klinik tablolar da oluşturabilmektedir. Özellikle endemik bölgelere seyahat edenler, askeri birlikler, kreşler ve bakımevlerinde bulunan duyarlı kişiler risk altındadır.

Hastalığın seyri ölümcül olabileceğinden **bakteriyel menenjit** etkenlerinin tanısı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının en önemli tanı fonksiyonlarından biridir. Kesin tanı epidemiyolojik incelemelere de yön vereceği için ayrıca önemlidir.

Bu nedenlerle bu UMS belgesinde, anılan etkenlerden *N. meningitidis*'in tanısı için izlenecek akış şeması ile başta kültürlerden izolasyonu olmak üzere, doğru ve güvenilir tanı için geçerli prosedürlerin verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇA	Çikolata agar
KKA	Koyun kanlı agar
LOS	Lipooligosakkarit
MIK	Minimum inhibitör konsantrasyon
SPS	Sodyum polyanetol sülfonat

Genel Bilgi

Mikroorganizmanın özellikleri

Neisseria cinsi bakteriler, *Neisseriaceae* ailesi üyesi olan, genellikle çiftler şeklinde bulunan 0.6x0.8 µm boyutlarında gram negatif diplokoklardır. Aynı ailenin üyesi olan *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella* ve *Allysiella* cinsleri ile beraber sınıflandırılırlar (5).

Neisserialar zor üreyen bakteriler olduklarından, laboratuvarında elde edilebilmeleri için uygun besiyeri ve üreme ortamının sağlanması gerekmektedir. Optimal 35-37°C sıcaklık ve %5-10 CO₂'li ortamda ürerler. Uygun besiyerinde saydam, pigmentsiz, hemoliz yapmayan 1-5 mm çapında koloniler oluştururlar. Kapsül varsa düz olmaktan ziyade mukoiddirler. Otoliz olduğundan eskimiş kültürlerinin şekil ve büyüklüklerinde değişiklikler görülebilmektedir (6).

N. meningitidis polisakkarti kapsülün kimyasal yapısına göre seroagglütinasyon ile A, B, C, D, X, Y, Z; E, W-135, H, I, K ve L olmak üzere 13 farklı serogruba ayrılmaktadır. Grup A ve C polisakkaritleri insanlarda immünojeniktir ve yapılan aşı çalışmaları bunu göstermektedir. Ancak grup B polisakkaritinin pürifiye edilmiş olmasına rağmen insanlarda yeterli immünojenik reaksiyon oluşturmadığı anlaşılmıştır ve henüz grup B için aşı üretilmemiştir (6).

Meningokokların dış membran yapısı diğer gram negatif bakterilerin yapısına benzemektedir. Patogenez ve immünobiyolojiden sorumlu birçok somatik antijen içermektedir. Ana antijenler gram negatif bakteri lipopolisakkariti analoğu olan LOS'ler ve dış membran proteinleridir (6).

Hastalığın önemi ve epidemiyolojisi

Neisseria meningitidis, menenjitin en önemli etkenlerinden biridir ve aynı zamanda meningokoksemi ve değişik oranlarda pnömoni, artrit, supraglottitis ve üretrit gibi klinik tablolara neden olabilmektedir (7).

Meningokoklar, geniş çaplı epidemilere yol açabilme potansiyeli nedeniyle ile diğer bakteriyel menenjit etkenlerinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle meningokokların yol açtığı menenjit tablosu, epidemik menenjit olarak da adlandırılmaktadır.

Hastalığın tarihçesine bakıldığında epidemik serebrospinal ateşin (meningokokal menenjit) ilk kez Cenova'da 1805 yılında Vieusseaux tarafından tanımlandığı görülür (8). 1887 yılında Weichselbaum bakteriyi BOS'dan izole etmiş ve organizma ile epidemik menenjit arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Sero gruplar ilk kez 1909 yılında Dopter tarafından tanımlanmıştır. 1928, 1930 ve 1941 yıllarında önemli yerel ve uluslararası salgınlar gözlenmiştir (6).

Afrika, Yeni Zelanda ve Singapur'daki epidemiler bu hastalığın halen tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir. Vakaların büyük bir bölümünü çocuklar oluşturmaktadır. 1939 ile 1962 yılları arasında dünyada yaklaşık 100.000'i ölümle sonuçlanan 600.000 meningokokkal hastalık vakası bildirilmiştir. Salgınlar özellikle toplu yaşamın olduğu askeri kamplar, çocuk bakım merkezleri, okullarda ve üniversitelerde gelişmiştir (6).

Dünyada bölgesel olarak serogrup dağılımı değerlendirildiğinde Güney Amerika kıtasında C (%57), Amerika'da C (%31), Kanada'da B (%54), Avrupa'da B (%76), Avustralya'da B (%84), Yeni Zelanda'da B (%83), Tayvan'da B (%52) ve Afrika'da A (%91) en sık izole edilen serogruplardır. Serogrup W-135 Afrika'dan %8, Amerika'dan %12 oranında bildirilmiştir (9).

Afrika kıtasında yer alan ve menenjit kuşağı olarak bilinen ülkelerden Hac görevi nedeniyle çok sayıda kişi Mekke ve Medine'ye gitmektedir. Ülkemizden de Hac nedeniyle bu bölgeye yılda ortalama 150 000 kişinin gittiği göz önüne alındığında Hac ziyaretinin etken bakteri ile karşılaşma olasılığı bakımından risk faktörleri arasında olduğu söylenebilir. Nitekim Hacca giden kişilerde 2000-2001 yıllarında *N.meningitidis* W-135 ile uluslararası düzeyde bir epidemi meydana gelmiştir. Bu salgınlarda Hac klonu olarak bilinen *N. meningitidis* serogrup W-135'un sekans tip (ST)-11 klonunun baskın olduğu tespit edilmiştir (10). Aynı klon daha sonraki dönemlerde de dünyanın çeşitli ülkelerinde menenjitli hastalardan izole edilmiştir (11). 2000 yılında ortaya çıkan salgında Hac ziyaretinden dönen kişiler ve onlar ile yakın temasta bulunan 10 ülkeden 400 kişide *N. meningitidis* W-135 izole edilmiştir. 2001 yılında ise bu oran nispeten azalmış ve 200'e düşmüştür (11,12)

N. meningitidis serogrup W-135 tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de menenjit ve kan akımı enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Hac klonu olarak da bilinen serogrup W-135 ST-11 klonu 2004 yılında iki menenjitli ve iki taşıyıcı askerden (13), 2006 yılında iki taşıyıcı askerden (14), 2007-2008 yılında ise bir menenjitli vaka ile bir taşıyıcı kişiden izole edilmiştir (15).

Türkiye'de ayrıca W-135'in ST-2754 klonu ile de enfeksiyon bildirilmiştir; 2003 yılında menenjitli bir hastadan ilk kez izole edildikten sonra 2004 yılında menenjitli bir hastadan (13), 2006 yılında menenjitli hasta ve bir taşıyıcıdan (14), 2007-2008 yılında bir menenjitli hasta ve iki taşıyıcıdan izole edilmiştir (16).

Türkiye'de hakim serogrupları belirlemek için yapılan çalışma sonuçları birbirlerinden farklılık göstermektedir. 1996 yılında 120 kişi ile yapılan çalışmada serogrup B (%47.5) (15), 1997 yılında yapılan çalışmada serogrup C (%27.8) (17) ve 2005'de ise serogrup Y/W-135 (%37.5) en sık izole edilen serogruplar olarak bildirilmiştir.

Ülkemizde B ve W-135 ile ilişkili hastalık tabloları sık olarak görülmekte olup A ve Y nadirdir (18). Son dönemde serogrup X sekans tip 767 ile ilişkili bir vaka ve taşıyıcılık bildirilmiştir (19).

Klinik özellikleri

Çalışmalarda *N. meningitidis*'in ABD'de ikinci sıklıkla toplum kaynaklı menenjitlere neden olduğu gösterilmiştir. ABD'de menenjitlere bağlı mortalite oranı %13'tür (6).

N. meningitidis insanlarda çeşitli klinik tablolara neden olabilir. Eğer menenjit şiddetli değilse hastada ateş ve genel enfeksiyon bulguları vardır. Çok küçük çocuklarda sadece ateş, kusma gibi özgül olmayan belirtiler olabilmektedir. Eklem bulguları ve peteşial döküntüler genel olarak meningokokal enfeksiyonlarda oluşmaktadır. Birkaç saatlik ateş ve halsizlik sonunda şiddetli baş ağrısı, sert boyun, kusma, parlak ışığa karşı hassasiyet gibi tipik menenjit semptomları ortaya çıkmaktadır (18). Bu hastalarda işitme hasarı ve artritis sık olarak bildirilirken nörolojik sekel sıklığı düşüktür.

Meningokok sağlıklı bireylerde 12 saatten daha az bir zamanda hayatı tehdit eden sepsis tablosuna neden olabilmektedir. Yaklaşık olarak menenjitli hastaların %30'unda fulminant sepsis tablosu oluşmaktadır (7). Hastalığın tipik bir klinik belirtisi birden fazla organı da içeren küçük damarların trombozudur. Gövde ve alt ekstremitelerde sık görülen küçük peteşiyal deri lezyonları birleşerek büyük hemorajik lezyonları oluşturabilmektedir. İlerleyen dönemlerde şok ile seyreden şiddetli yaygın damar içi pıhtılaşma özellikle genç hastalarda çift taraflı adrenal bez harabiyetine (Waterhouse Friderichsen sendromu) neden olabilmektedir (6,20)

N. meningitidis ek olarak pnömoni, artrit, supraglottitis ve üretrit gibi klinik tablolar oluşturabilmektedir. Meningokokkal pnömoni 80 yıldan daha uzun bir zamandan beri bilinmektedir. Fakat sepsis ile birlikte nadir olarak görülmektedir (21). Supraglottit meningokokun nadir klinik görünümüdür (22). Meningokoklar üretrit etkeni olarak üretradan da izole edilmişlerdir ve etkenin oral seks ile kazanıldığı düşünülmektedir. Organizma homoseksüel erkeklerde orofarinks örneklerinden %93, rektal sürüntülerden %6 ve üretradan %1 oranında izole edilmiştir (23).

Mikrobiyolojik tanısı

Menenjit şüphesinde tanıda ilk seçenek BOS'un incelenmesidir. Bakteriyel menenjitli olgularda BOS'un incelenmesine dayalı tipik BOS bulguları Tablo 1'de özetlenmiştir (24).

Meningokokkal hastalık şiddetli seyredebilen "acil" bir klinik durumdur. Menenjit şüpheli bir hastadan BOS örneği de klinik laboratuvarlar için "acil" örnek olarak tanımlanmaktadır. Örneğin bir an önce işleme alınması, etiyolojik ajanı saptamak üzere özgül mikrobiyolojik tanı sürecinin bir an önce başlatılması kuraldır (25).

Meningokokkal hastalık şüphesinde, BOS ve kan öncelikle seçilecek örneklerdir. Varsa, peteşiyal döküntülerden kazıntı veya aspirat örnekleri de tanıda çok değerlidir. Gerekirse lokalize enfeksiyonların tanısı için eklem sıvısı ve biyopsi örnekleri de incelenebilir. Mikroorganizma her ne kadar nazofarinkse yerleşip buradan yayılabiliyorsa da menenjit vakalarının tanısında nazofarinks veya orofarinks örnekleri kullanılmaz.

Tablo 1. Bakteriyel menenjitli olgularda tipik BOS bulguları (24).

BOS için parametre	Tipik bulgu
Basınç	200–500 mm H ₂ O
Beyaz kan hücresi sayısı	1000–5000/mm ³ (range, <100 to >10.000)
Nötrofillerin oranı	≥ 80%
Protein	100–500 mg/dL
Glikoz	≤40 mg/dL
BOS/serum glikoz oranı	≤0.4
Gram boyama	Pozitif %60-%90
Kültür	Pozitif %70-%85

Mikroskopi

BOS'un Gram boyalı yaymalarının incelenmesi bakteriyel menenjitli hastaların %60-90'ında organizmanın hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasına izin verir ve yaklaşık %100 bir özgüllüğe sahiptir (24). Gram boyamanın duyarlılığı (organizmanın saptanması olasılığı) BOS'taki bakteri yoğunluğu ile yakından ilişkilidir; eğer mililitrede 10^3 veya daha az bakteri mevcut ise Gram yaymaların ancak %25 kadarı pozitif bulunabilirken, bakteri yoğunluğu 10^5 ve daha fazla olduğunda pozitif sonuç elde edilen vakaların oranı %97'ye kadar yükselmektedir (Tablo 1).

Gram boyamanın klinik yararlılığı aynı zamanda bakteriyel patojene de bağlıdır: *S.pneumoniae*'nin neden olduğu menenjit vakalarının %90'ında, *H. influenzae* vakalarının %86'sında, *N. meningitidis* vakalarının %75'inde, gram negatif basillerin neden olduğu vakaların ise %50'sinde BOS'un Gram yaymasında bakteriler gözlenirken bu oran *L. monocytogenes* menenjitli vakaların %50'den azında pozitifdir (24). Eğer antimikrobiyal tedavi başlanmış ise bakterinin Gram yaymasında görülme olasılığı da kültürden izolasyon oranı da hızla düşmektedir.

Özetle, meningokok menenjit şüphesinde BOS'un Gram yayması mutlaka incelenmelidir. Döküntü ile seyreden hastalıkta peteşiyal örneklerden yaymalar da Gram boyası ile boyanmalıdır. Ayrıca ve eğer mümkünse, bir BOS yayması da Loeffler'in metilen mavisi ile boyanmalıdır. Özellikle *H.influenzae* gibi naif ve Gram boya ile zayıf boyanabilen bakteriler BOS'un sıvısal ve hücrel matriksi içinde kolay ayırt edilemeyeceği için gözden kaçabilmektedirler. Metilen mavisi bu olasılığı bertaraf etmek için iyi bir alternatiftir. Fagositlerin içinde ve/veya dışında gram negatif diplokokların görülmesi tanıyı güçlü bir şekilde destekler.

İnflamatuvar hücrelerin varlığı tanısal değere sahip olduğundan (ör., fulminan, hızlı fatal hastalıkta; çok sayıda organizma ve az sayıda inflamatuvar hücre mevcuttur) klinisyene Gram boyamanın sonucunun yanında inflamatuvar hücrelerin niceliği hakkında da bilgi verilmelidir.

Antijen saptama

BOS, serum ve idrarda meningokokların kapsüler polisakkaritlerinin saptanması temeline dayanan direkt testler mevcuttur. Fakat bu testlerin duyarlılık problemleri yeterince çözülmemiştir. Gram boyama ile karşılaştırıldıklarında klinik yararlılıkları tartışmalıdır. Bu testler uygulanıyor olsa bile mikroskopik incelemenin yerine konamayacağı, örneklerden mikroskopik incelemenin de yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (20).

Kültür

Bakteriyel menenjit şüphesinde patojen ajanın izolasyonu için öncelikle BOS (ve invaziv enfeksiyon şüphesi de varsa kan) örneklerinin kültürleri yapılır.

Kültürler için seçilecek besiyerleri potansiyel mikroorganizmaların en büyük kısmının (mümkünse hepsinin) izolasyonunu sağlamayı hedeflemelidir. Bir diğer ifade ile başlangıçta etkenin ne olduğu bilinmediğine göre, öyle bir besiyeri kombinasyonu kullanılmalıdır ki başta olguların %80'inden sorumlu üçlü (*N.meningitidis*, *H. influenzae* ve *S.pneumoniae*) rahatlıkla izole edilebildiği gibi diğer bakteriyel patojenlerin çoğu da yakalanabilsin (1).

Bu temel strateji ile hareket edildiğinde başlıca şu hususların dikkate alınması gerekir. Öncelikle BOS'da bulunan organizma yoğunluğu çok düşük olabileceği için örneğin -eğer örnek yeterli miktarda ise- konsantre edildikten sonra ekilmesi önerilir (1).

N. meningitidis güç üreyen bir bakteridir ve en iyi kanlı veya çikolata agar gibi zengin besiyerlerinde ve CO₂'li ortamda ürer. *H. influenzae* daha zor bir bakteridir ve üremek için ortamda hemin (X faktör) ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD, V faktör) bulunması gerekir. Standart besiyeri at kanı ile hazırlanmış çikolata agardır ve bakteri için bu faktörleri temin eder. Eğer ticari olarak temin edilebilen IsoVitaleX, Supplement B veya Vitox gibi maddeler de eklenebilirse besiyeri *H. influenza* izolasyonu için ideal hale gelir. *S. pneumoniae* ise hem kanlı agarda hem de çikolata agarda rahat üreyebilen bir bakteridir. Özetle, kanlı ve çikolata agar birlikte kullanıldığında bakteriyel menenjit patojenlerinin yakalanması için asgari en iyi besiyeri kombinasyonu kullanılmış olur (1).

N. meningitidis tanısında kültür 'altın standart'tır. BOS ve benzeri steril vücut sıvıları çikolata agar ve koyun kanlı agara ekilir ve 35°C'de %5-7 CO₂'li ortamda (CO₂ inkübatörü, mumlu jar) inkübe edilir. Plaklar 24, 48. ve 72. saatlerde üreme varlığı bakımından incelenir ve eğer şüpheli koloniler varsa tanımlama için kan ve çikolata agara pasajlar yapılarak sonraki tanımlama basamaklarına geçilir (20).

N. meningitidis enfeksiyonu dolaşım sisteminin invazyonu ile de seyredebildiği için hastalardan kan kültürü tanıda diğer önemli seçenektir. Ancak, besiyerlerinde bulunan antikoagülan SPS (sodyum polyanetol sulfonat) *Neisseria*'ların üremesini engelleyebileceğinden dolayı meningokokkal enfeksiyon şüphesinde kan kültürü yapılacaksa besiyerine steril jelatin (son konsantrasyon %1 olacak şekilde) eklenerek ya da kan örneğinin lizis-santrifügasyonu ile nötürlenmesi gerektiği akılda tutulmalıdır. Kan kültürü şişeleri de aynı inkübasyon şartlarında inkübe edilirler ve üreme sinyalini takiben çikolata agar ve koyun kanlı agara pasajlanarak takip edilirler.

N. meningitidis kolonileri gonokok kolonileri ile karşılaştırıldığında daha büyüktür ve genellikle 18-24 saatlik inkübasyon sonrası 1 mm'lik çapa ulaşırlar. Koloniler alçak ve konvektir, düz, nemli kenarları ve parlak yüzeyleri vardır. Koyun kanlı agarda, koloni görünimleri genellikle gri iken, kalın kapsüllü kökenler mukoid görünümde olabilirler. Kolonilerin ürediği bölgede yoğun üremeye bağlı olarak gri-yeşil bir renk oluşumu görülür. Taze kültürlerin görünümü düzgün olmasına rağmen, eski kültürler otolizden dolayı yapışkandırılar.

N. meningitidis'in şüpheli kolonilerden tanımlanmasında asit üretimi testi veya kromojenik enzim substrat testleri kullanılmaktadır. *N. meningitidis* glikoz ve maltoza etki ederken, sukroz, früktoz veya laktoza etki etmez.

Serogruplandırma için lam aglütinasyon testi kullanılmaktadır. *N. meningitidis* izolatları, OMP ve LOS antijenleri temel alınarak serotiplendirilebilir ve alt-serotiplendirilebilir. Meningokok izolatları, sınıf 2 ve 3 dış membran proteini veya Por B antijenleri temel alınarak 20 serotipe, sınıf 1 dış membran proteini antijenleri (PorA) temel alınarak 10 serosubtype ve LOS antijenleri temel alınarak 13 immunotipe ayrılabilir (20).

Nazofaringeal sürüntü örneklerinin klinik vakaların tanısında değeri yoktur. Eğer epidemiyolojik amaçlar için taşıyıcılık araştırması yapılacaksa nazofarinks sürüntü örneklerinin kültürleri yapılabilir. Böyle örneklerin kültürleri için florada bulunan bakterileri baskılayacak uygun antibiyotikleri içeren besiyerleri kullanılır (20).

Moleküler yöntemler

Mikroskopi ve antijen saptama testleri genel olarak duyarlılıkları düşük yöntemlerdir. Örnek alınmadan önce çoğu hastaya antibiyotik başlandığı için mikroskopi ve kültürün başarısı hayli azalmaktadır. Bu yüzden son yıllarda PCR gibi DNA temelli tanı yöntemlerinin önemi artmıştır. PCR ile örnekteki organizma canlı olmasa bile DNA'sı tespit edilebilmektedir. Öte yandan henüz meningokok nükleik asitlerinin klinik örneklerde saptanmasına yönelik standardizasyonu tamamlanmış ve klinik laboratuvarlarda rutin uygulanabilen bir yöntem mevcut değildir. Bazı real-time PCR uygulamaları vardır (20,26).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Neisseria meningitidis

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Neisseria meningitidis türü bakteriler Risk Grubu 2 organizmalardır ve çalışmalar, asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalıdır. Epidemik menenjit veya invaziv *N.meningitidis* enfeksiyonu şüpheli örneklerin kültürden izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili tüm laboratuvar çalışmaları sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır. Önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

N.meningitidis primer olarak solunum yolu (aerosol kaynağı olan işlemler) ile bulaşır. Fatal seyirli laboratuvar kaynaklı enfeksiyonları rapor edilmiştir (20). Bu nedenle *N. meningitidis* kültürleri ile uğraşan laboratuvar personeline dörtlü meningokok aşısı (serogrup A,C,Y,W135 içeren) uygulanması tavsiye edilir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen epidemik menenjitte veya invaziv meningokokal hastalıktan şüpheleniyorsa **kültür için** örnekleri laboratuvara göndermeden önce, laboratuvarın gerekli hazırlığı yapabilmesi için laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reagen, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Epidemik menenjit veya meningokoksik invaziv hastalık tanısında örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir.

Bakteriyel menenjitlerde veya majör bakteriyel menenjit patojenlerinin (meningokok, pnömokok ve *H.influenzae*) neden olduğu invaziv hastalık tanısında hemen hemen aynı örneklerden belli bir akış şeması izlenerek tanıya gidildiği hatırlanmalıdır (27).

Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Örnekler mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır.
- BOS ve kan örnekleri tanıda ilk seçenektir. Petesiyal aspirat, biyopsi örneği, eklem sıvısı incelenebilecek diğer örneklerdir.

ÖNEMLİ NOT: Bakteriyel menenjit veya invaziv enfeksiyon tanısı için alınan BOS ve kan örnekleri laboratuvarda işleme alınincaya kadar geçen süre boyunca oda sıcaklığında taşınmalı ve saklanmalıdır; kesinlikle buzdolabına konmamalıdır (20,27).

- BOS'da alınabilen örnek miktarı sonraki işlemleri belirler. Laboratuvara hemen ulaşamayacaksa tüplerden birindeki BOS örneği (~1 ml) tercihen bifazik T-I besiyeri içeren şişeye; yoksa bir pediatrik kan kültür şişesine inoküle edilip gönderilmelidir. Hib şüphesi varsa şişelere (T-I, kan kültürü) Isovitalax veya Vitox eklenmelidir.

NOT: T-I, yatık agar ve sıvı olmak üzere iki fazlı bir besiyeridir (28).

- Kan kültürü besiyerlerinde bulunan antikoagülan SPS meningokokların besiyerinde üretilmesini etkileyebilir. Besiyerine steril jelatin (son konsantrasyonda %1 olacak şekilde) eklenerek ya da kan örneğinin lizis-santrifügasyonu ile bu etki önlenir.
- T-I veya kan kültürü şişelerine konan örnekler (pediatrik olanlar dahil) bir gece 35°C'de inkübe edildikten sonra ve/veya 24 saat içinde oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılabilir. Taşıma esnasında örneklerin aşırı sıcaklık değerlerine (<18°C veya >37°C) maruz kalmasına kesinlikle izin verilmemelidir.

Besiyeri / Reaktif

- KKA – Triptik soya agar baz ile hazırlanmış %5 koyun veya at kanlı agar idealdir. Piyasadan hazır temin edilebilir; laboratuvar da hazırlanabilir. *N. meningitidis* ve *S.pneumoniae* KKA'da ürerler. KKA'da *H. influenzae* üremesi için ise satellit fenomeninden (ekim bölgesini çaprazlayan *Staphylococcus aureus* inokülasyonu) yararlanılabilir ya da X ve V faktör diskleri kullanılır.

NOT: KKA yerine insan kanlı agar kullanımı kesinlikle önerilmez!

- Çikolata agar - Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvar da hazırlanabilir. Her üç meningeal patojen de bu besiyerinde ürer.
- Triptik soya buyyon (TSB) veya beyin-kalp infüzyon buyyonu (BHI) – ticari kan kültürü şişesi mevcut değilse bu sıvı besiyerleri kullanılabilir.

NOT: Modifiye Thayer-Martin, New York City agar, Martin Lewis agar gibi özgül *Neisseria* besiyerleri başlıca flora içeren bölgelerden izolasyonda tercih edilen besiyerleridir. Üretrit, proktit, orofarenjit gibi gonokokkal ve meningokokkal lokal enfeksiyonlardan şüpheleniliyorsa bu besiyerlerinden yararlanılabilir. Menenjit tanısında kullanılmaları önerilmez. Ticari olarak piyasadan temin edilerek kullanılabilir.

- Biyotiplendirme için reaktifler – oksidaz reaktifi, katalaz reaktifi (%3'lük ve %30'luk H₂O₂), Gram boya ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri, X, V ve XV diskleri veya *Staphylococcus aureus* suşu (bkz. "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- CTA (Sistin triptikaz agar; %1 şeker içeren) – şeker kullanım (karbonhidrat utilizasyon) testi besiyeri
- Lam aglütinasyon testi – izole edilen *N. meningitidis* suşunun serogruplandırılması için. Piyasada değişik ticari kitler mevcuttur.
- Direkt antijen arama testleri - BOS'tan (veya diğer vücut sıvılarından) antijen aranmasında kullanılan testlerdir. Piyasada her üç meningeal patojen için değişik ticari kitler mevcuttur (opsiyonel).

Diğer gereç, donanım

Besiyeri hazırlamak için

- Erlen (10 mL, 25 mL, 500 mL, 2 L)
- Manyetik karıştırıcı/ısıtıcı ve manyetik balıklar
- pH metre
- Petri kabı, steril, tek kullanımlık
- Pastör pipeti, steril pipetler; pipetleme ekipmanı
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Tüpler steril, vida kapaklı

Kültür, mikroskopi ve diğer testler için

- Biyogüvenlik kabini, sınıf-IIA
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

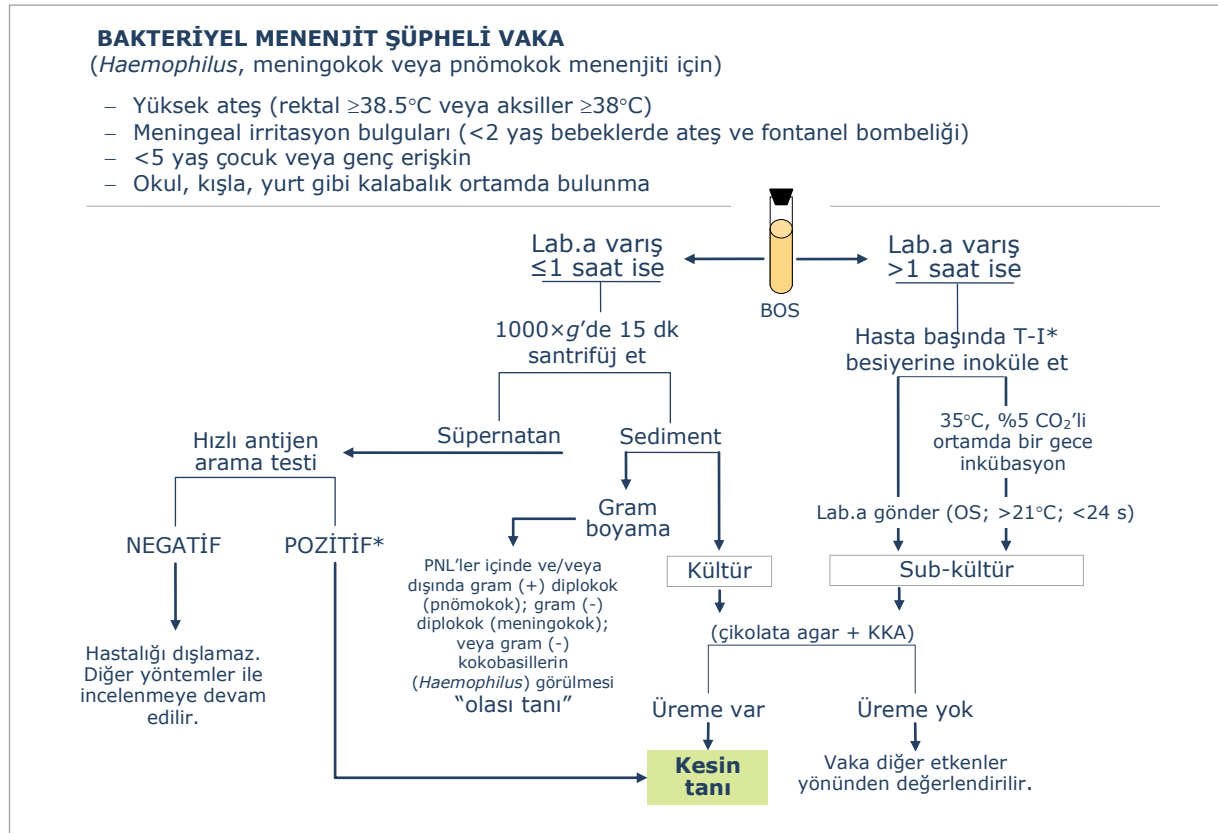
NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (29).

- İnkübatör, 36°C, CO₂'li inkübatör veya mumlu jar
- Öze, steril, tek kullanımlık
- Rotator (opsiyonel)
- Santrifüj – 50 ml tüp santrifüjüne uygun
- Vorteks (tüp ataçmanlı)
- Zaman alarmı (timer)

2.4. Kalite kontrol

- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyerinde kuruma, çatlak v.b. gözlenirse, kullanılmamalıdır. Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarında standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Kitler kullanılırken kontrol örnekleri de kitle verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer bütün donanımın kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır.
- Bütün kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Bakteriyel menenjitlerde tanı için genel akış şeması



Şekil 1. Bakteriyel menenjit şüpheli vakanın BOS örneğinin laboratuvara iletilmesi, mikrobiyolojik incelemeler ve olası sonuçları için akış şeması (27 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

* Pozitif sonuç gerekirse diğer testlerle desteklenmelidir!

OS, oda sıcaklığı; s, saat; dk, dakika; Lab., laboratuvar

3.1. Örneklerin incelemeye hazırlanması

- Bakteriyel menenjit şüphesinde patojen ajanın tanısı için öncelikle BOS (ve invaziv enfeksiyon şüphesi de varsa kan) örnekleri incelemeye alınır (1,30).
- Menenjit ve meningokoksesemi gibi klinik tablolar hızlı ilerler ve ölüme neden olabilir. Bu nedenle en hızlı, doğru ve kesin tanıya ulaşılması önem kazanmaktadır.
- Eğer gelen BOS örneği <1 mL ise santrifüj işlemi yapılmadan ve doğrudan KKA ve ÇA'ya inoküle edilir ve Gram boyama yapılır.
- Eğer gelen BOS örneği ≥1 mL ise boyama ve ekim işlemlerinin yoğunlaştırılmış örnekten yapılması duyarlılığı artırır. Bu nedenle BOS 1000 × g'de 15-20 dk santrifüj edilmelidir.
- Santrifüj sonunda süpernatant kısmı Pastör pipeti ile alınır ve antijen saptama testleri için kullanılabilir.
- Çökelti kısmı ise kuvvetlice karıştırıldıktan sonra 1-2 damlasından Gram boyama (ve yeterli ise metilen mavisi ile) için yayma hazırlanır ve birer damla da KKA ve ÇA'ya inoküle edilir (30) (Şekil 1).

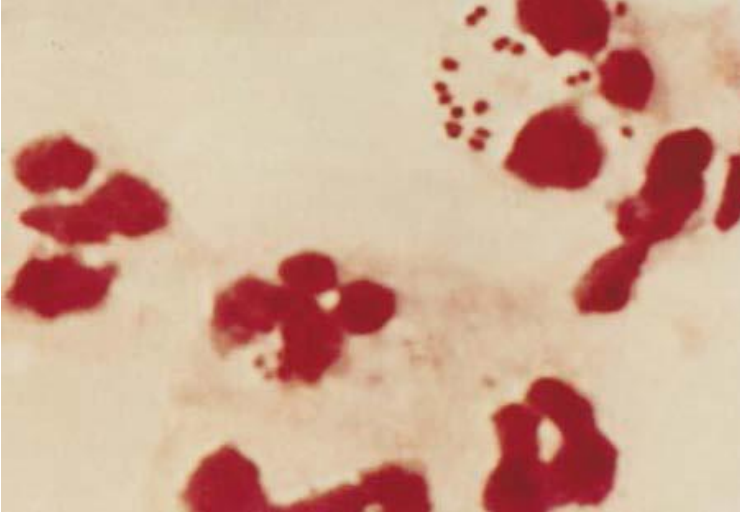
4 Örneklerin direkt incelenmesi

4.1. Gram boyama

- Santrifüj edilmiş BOS örneği çökeltisinin 1-2 damlası kullanılarak yayma hazırlanır ve Gram boya ile boyanır (bkz. UMS-B-TP-03).
- Santrifüj edilmemiş örnek kullanılacaksa temiz bir lamın üzerine bir damla BOS konup yaymadan kuruması beklenir.
NOT: Eğer örnekteki bakteri yoğunluğunun düşük olduğu tahmin ediliyorsa, kurumuş damlanın üzerine bir damla daha BOS ilave edilerek daha yoğun bir damla elde edilebilir ve bakterilerin görülme olasılığı artırılabilir.
- Gram boyama işleminde pozitif ve negatif kalite kontrol örnekleri de kullanılmalıdır.
- BOS'un Gram boyamasında bol polimorf nüveli lökositler ve kahve çekirdeği morfolojisinde hücre içi ve/veya hücre dışı gram negatif diplokoklar görülmesi meningokokkal menenjit için olası tanı olarak değerlendirilir (Şekil 2) (30).

4.2. Lateks aglütinasyon testi

- BOS'da *N. meningitidis*'in kapsüler polisakkaritini gösteren hızlı lateks aglütinasyon testleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanır ve değerlendirilir (30).
- BOS örnekleri haricindeki örnekler için duyarlılık düşük olduğundan, kullanılması önerilmemektedir.



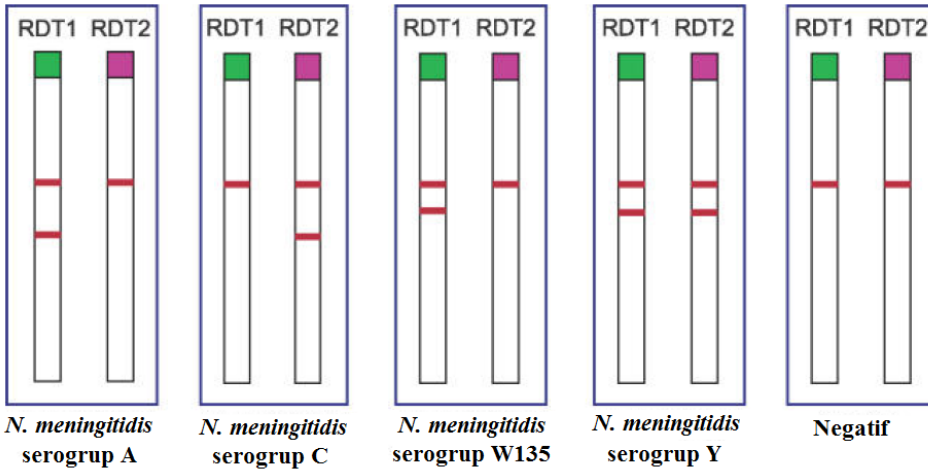
Şekil 2. BOS'ta Gram boyama ile PNL'ler içindeki *N. meningitidis* bakterileri (30).



Negatif reaksiyon

Pozitif reaksiyon

Şekil 3. BOS örneğinden direkt antijen saptama testinde negatif ve pozitif lateks aglütinasyon sonuçları (30).



N. meningitidis
serogrup A

N. meningitidis
serogrup C

N. meningitidis
serogrup W135

N. meningitidis
serogrup Y

Negatif

Şekil 4. *N. meningitidis* serogrup A, C, Y, W135 için ve negatif kontrol için hızlı tanı testi ('dipstick') sonuçları (30).

- Piyasada çok çeşitli ticari ürün mevcuttur. Üründen ürüne uygulamanın değişebileceği göz önünde tutulmalıdır.
- Test için santrifüj edilmiş BOS örneğinin süpernatant kısmı kullanılır.
- Süpernatant 100°C'de 3 dk ısıtıldıktan sonra, 30-50 µL örnek ile 20 µL lateks test ve kontrol reaktifi lamda karşılaştırılır.
- 2-10 dk dairesel hareketler ile elde çevrildikten sonra (rotator kullanılacaksa 100 rpm'de) gözle görülebilen küme aglütinasyon sonucun pozitif olduğunu gösterir (Şekil 3).
- Bu testlerin yalancı negatif ve yalancı pozitif sonuçlar verebildikleri hatırlanmalıdır (30).

4.3. Hızlı direk test (İmmünokromatografik test; ICT) (30).

- BOS örnekleri için kullanılır.
- Isıtma ve santrifüj işlemi yapılmaz.
- Test vertikal akış immünokromatografi temelinde çalışmaktadır.
- Test *N. meningitidis*'in 4 serogrubunu (A, C, W135 ve Y) tanımlayan 2 ölçüm çubuğu içerir:
 - (a) birinci ölçüm çubuğu olan RDT1 ile serogrup A ve W135/Y;
 - (b) ikinci ölçüm çubuğu olan RDT2 ile de serogrup C ve Y tanımlanmaktadır.
- Ölçüm çubuklarında kırmızı çizgilerin görülmesi serogruplardan birinin olduğunu gösterir (Şekil 4).
- Üst çizgiler pozitif kontrol içindir ve her zaman olması gerekir. Altta kırmızı çizgilerin görülmesi ise özgül serogrupların varlığının göstergesidir.
- Sadece üst kısımda kırmızı çizgi görülmesi testin negatif olduğunu gösterir (30).

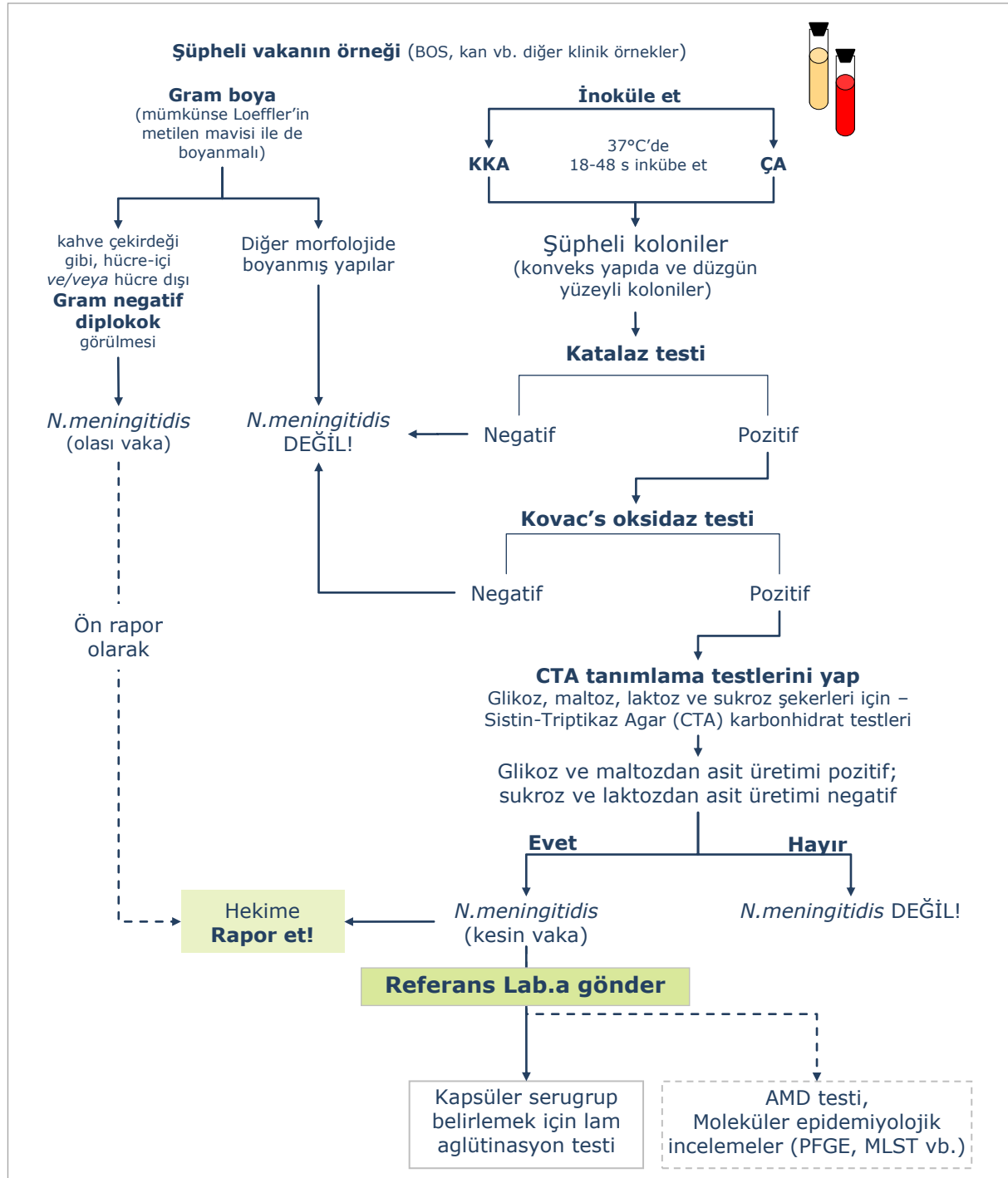
5 Kültür

5.1. Prensiptir

- Kültürler için seçilen besiyerleri **KKA** ve **ÇA**'dır ve potansiyel meningeal patojenlerin en büyük kısmının izolasyonunu sağlayabildikleri için tercih edilirler (1,30).
- KKA özellikle triptik soya agar bazı veya benzeri zengin bir baz ile hazırlanmış olmalı ve %5 oranında koyun kanı veya at kanı içermelidir.
NOT: Bakteriyel menenjit etkenlerinin izolasyonunda kullanılacak kanlı agarda **kesinlikle** insan kanı kullanılması önerilmez! (inhibitörler içeriyor olabileceği için) (1,30).
- ÇA (çikolata agar) her üç meningeal patojen de bu besiyerinde ürettiği için tercih edilir. Standart besiyeri at kanı ile hazırlanmış ÇA'dır ve özellikle *H. influenza* için X ve V faktörlerini temin eder.

- *N. meningitidis* ve *S.pneumoniae* KKA'da ürerler.
- KKA'da *H. influenzae* üremesi için ise satellit fenomeninden (ekim bölgesini çaprazlayan *S.aureus* inokülasyonu) yararlanılabilir ya da X ve V faktör diskleri kullanılır.

5.2. Kültürden izolasyon ve tanımlama için akış şeması



Şekil 5. *N.meningitidis* - kültürlerden izolasyon ve tanımlama basamakları (31 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

5.3. *N.meningitidis*'in kültürlerden izolasyonu

Besiyerlerine ekimler

- BOS ve steril vücut bölgesi örnekleri ÇA ve KKA'ya inoküle edilir (Şekil 5). Örnek <1 mL ise doğrudan; ≥1 mL ise santrifüj edildikten sonra çöktikten KKA ve ÇA'ya ekim yapılmalıdır (bkz. "3.1 Örneklerin incelemeye hazırlanması") (30).
- Ekim plakları 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde 40-48 saat inkübe edilmelidir.

NOT: Yüksek nem oranı inkübatörün tabanına geniş bir cam tepsi ile distile su konarak elde edilir. Tepsinin kuru kalmasına izin verilmemeli, düzenli aralarla kontrol edilerek su eklenmelidir.

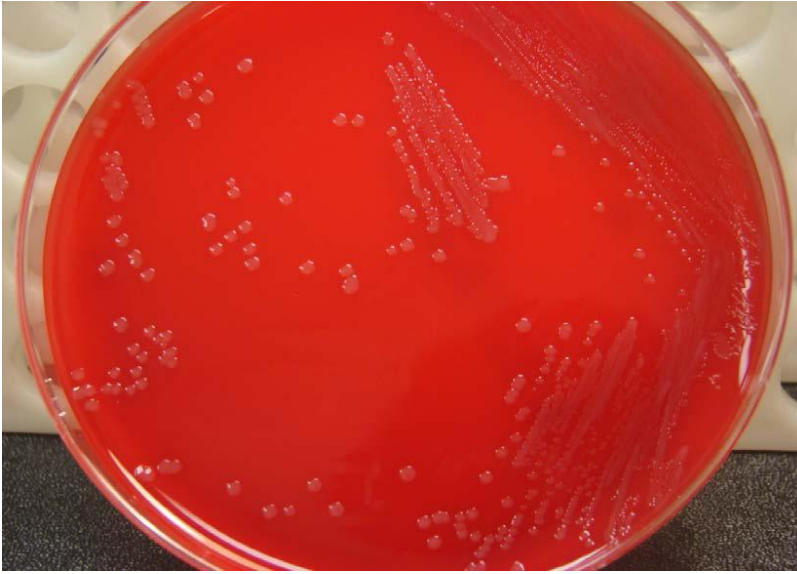
- 18 saatten itibaren plaklar üreme varlığı açısından kontrol edilir. Bakteriyel menenjit şüpheli örneklerin KKA ve ÇA'daki ilk üremelerinin değerlendirilmesinde ön tanımlama için Tablo 2'den yararlanılabilir.
- Konveks, düzgün yüzeyli, nemli, KKA'da hemoliz yapmamış koloniler *N.meningitidis* yönünden ileri incelemeye alınır (Şekil 6). Kanlı agarda kolonilerin zemininde gri-yeşilimsi bir renk değişimi olabilir.
- Tanımlama için kolonilerden Gram boyanır ve Şekil 5'de verilen adımlar takip edilir. Bazı laboratuvarlar son tanımlama işlemlerinde bu şemaya ek olarak API NH (bioMérieux's) gibi mikrobiyolojik tanımlama sistemleri ile tanıya gidebilmektedirler (20,31).

Kan kültürleri veya diğer bifazik besiyerlerine ekimler

- BOS (ya da steril vücut sıvıları) şehirlerarası mesafeden geliyorsa T-I besiyeri içine alınmış ve taşınmış olması gerekir (ideal olarak oda sıcaklığında veya 35°C taşınabilir inkübatörde; %5-10 CO₂'li ortamda)
- Kan örnekleri ise;
 - (a) Ticari kan kültür şişelerine; veya
 - (b) TSB veya BHI kullanılarak hazırlanmış geleneksel bifazik –ve IsoVitaleX veya Vitox ile desteklenmiş- kan kültürü şişesine; veya
 - (c) Bifazik ve IsoVitaleX ya da Vitox ile desteklenmiş T-I besiyerine alınmış ve gönderilmiş olabilir. Kan kültürü örnekleri eğer şehirlerarası mesafeden gönderiliyorsa ideal olarak oda sıcaklığında veya 35°C taşınabilir inkübatörde, %5-10 CO₂'li ortamda taşınmış olmalıdırlar.
- Ticari kan kültürü şişeleri kendi inkübatöründe, 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde inkübe edilirler.
- Bifazik geleneksel şişeler veya T-I şişeleri de 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde inkübe edilirler.
- Üreme bulgusu ticari otomatik kan kültürü sistemlerinde üreme sinyali ile, diğerlerinde bulanıklık ile değerlendirilir.
- Üreme gözlenen şişelerden hemen KKA ve ÇA pasajları yapılmalıdır. Bu pasajlardaki üremeler yukarıda tarif edildiği gibi ve Şekil 5'deki adımlar takip edilerek tanımlanırlar.

Tablo 2. Primer kültürlerden *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* ve *H. influenzae* için ön tanımlama kriterleri (30)

Üreme		Gram boyama	Ön tanımlama
ÇA'da	KKA'da		
+	+	Gram-negatif diplokoklar	<i>N. meningitidis</i>
+	+	Gram-pozitif diplokoklar	<i>S. pneumoniae</i>
+	–	Gram-negatif pleomorfik kokobasiller	<i>H. influenzae</i>

**Şekil 6.** Uygun çizgi ekimi yapılmış KKA plak besiyerinde *N. meningitidis* kolonilerinin görünümü

5.4. Tanımlama testleri

Katalaz testi

- Neisseria* spp için katalaz testi %30'luk H₂O₂ kullanılarak yapılır (32). Bakterinin katalaz enzimi varsa hidrojen peroksitin (H₂O₂) yıkılması ile oksijenin açığa çıkışı kabarcık oluşumu ile gözlenir (*bkz.* UMS-B-TP-10).

Güvenlik uyarısı! *N. meningitidis* şüphesinde katalaz testi mutlaka tüpte ve biyogüvenlik kabini içinde çalışılmalıdır!

- N. meningitidis* katalaz pozitifdir. KKA veya ÇA'da üremiş koloniler katalaz pozitif bulunmuş ise sonraki adıma geçilir; oksidaz testi yapılır.

Kovac's oksidaz testi

- Oksidaz testi, solunumlarında oksidatif fosforilasyon yapan bakterilerin sitokrom oksidaz enziminin etkinliğinin saptanması temeline dayanır. Testin yapılışı için *bkz.* UMS-B-TP-16.
- N. meningitidis* oksidaz pozitifdir. KKA veya ÇA'da üremiş koloniler oksidaz pozitif bulunmuş ise sonraki adıma geçilir; karbonhidrat kullanım (utilizasyon) testleri yapılır.

CTA'da (sistin triptikaz agar) karbonhidrat kullanım testi

- Şüpheli kolonilerin *N. meningitidis* olup olmadıklarının belirlenmesinde karbonhidrat (şeker) kullanım testlerinden yararlanılır.
- *Neisseria* türleri şekerleri oksidasyon yolu ile kullanarak asit üretirler (fermentasyon ile değil). *N. meningitidis* tipik olarak sadece glikoz ve maltozu katabolize eder ve diğerlerinden bu özelliği ile ayrılır.
- *Neisseria* türlerinin şeker kullanım testleri için CTA kullanılır. Şekerler besiyerine her birinin son konsantrasyonu %1 olacak şekilde eklenir. Besiyeri içinde indikatör olarak fenol kırmızısı bulunur; ortamda asidik ürünler oluştuğunda, pH 6.8 veya daha düşükse renk sarıya dönüşür (besiyerinin hazırlanması için bkz. Ek-2).
- İzolatın test edilmesi için dört şeker (glikoz, maltoz, laktoz ve sukroz) tüpünden bir set oluşturulur (Şekil 8).
- *N. meningitidis* glikoz ve maltoz içeren tüplere etki ederek sarı renk oluştururken, sukroz ve laktoz içeren besiyerinde renk değişimi olmaz (Şekil 8) (Tablo 3).

Bulguların değerlendirilmesi, yorumlanması

- Buraya kadarki adımlarda şüpheli kolonilerin incelenmesi sonucunda katalaz ve oksidaz pozitif, şeker reaksiyonları glikoz ve maltozda asit oluşturmuş (diğerleri negatif) gram negatif diplokoklar *N. meningitidis* olarak tanımlanır ve "*N. meningitidis* üredi" şeklinde rapor edilir.
- İzolatların en büyük kısmı bu testler ile tanımlanabilirse de özellikle şeker reaksiyonları vermeyen bazı kökenlerde tanının başka testlerle de (kromojenik enzim-substrat testleri vb.) desteklenmesi gerekir.
- Bunlardan γ -**glutamil amino peptidaz** testi (bu testi içeren bir hazır ticari kit ile çalışılır) eğer pozitif ise klinik izolat "*N. meningitidis*" olarak rapor edilir.

Serogruplandırma için lam aglütinasyon testi

- İzolatlardan ayrıca serotiplendirme yapılması gereklidir. *N. meningitidis* kapsüler polisakkarid antijenlerine göre serogruplara ayrılır (testin yapılışı için bkz. Ek-3). Testler üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanır ve değerlendirilir. Ürüne göre uygulamanın değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (31).
- Test edilen *N. meningitidis* izolatları bir dakika içerisinde 3+ veya daha büyük aglütinasyon reaksiyonu verirler (Şekil 9).
- Eğer klinik laboratuvar serotiplendirme yapamıyorsa izolat Referans laboratuvara gönderilmelidir.

5.5. Antibiyotik duyarlılıkları

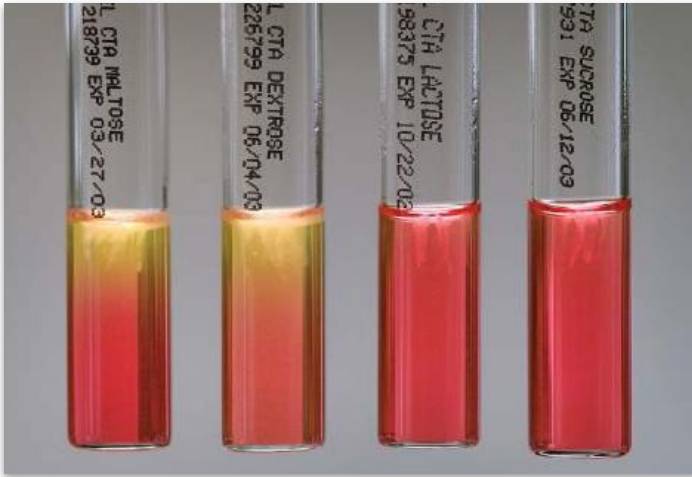
- *N. meningitidis* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı için MİK değerlerinin saptanması gereklidir.
- CLSI, *N. meningitidis*'in penisilin, ampicilin ve rifampin için duyarlılık durumunun MİK testi ile test edilmesini; bunun da sıvı mikrodilüsyon veya agar dilüsyon yöntemi ile yapılmasını önermektedir.



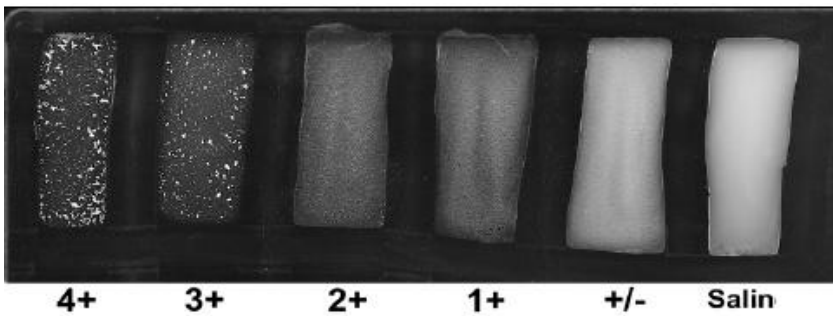
Şekil 7. Süzgeç kağıdında oksidaz pozitif ve negatif sonuçların görünümü (1).

Tablo 3. *Neisseria* ve *Moraxella* türlerinin şekerleri kullanması (1,20,31).

Organizmalar	Glukoz	Maltoz	Laktoz	Sukroz
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	-	-
<i>Neisseria lactamica</i>	+	+	+	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	-	-	-
<i>Neisseria sicca</i>	+	+	-	+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-



Şekil 8. CTA şeker besiyerinde *N.meningitidis* için maltoz ve glikozdan asit üretimi (renk sarıya dönmüş), laktoz ve sukrozdan asit üretiminin olmadığı görülmektedir (31).



Şekil 9. Lam aglütinasyon testinin değerlendirilmesi (31).

- Bu yöntemler için katyon eklenmiş ya da %2.5-5 lize at kanı içeren sıvı Mueller-Hinton besiyeri ya da %5 koyun kanı içeren Mueller-Hinton agar kullanılır (bkz. "UMS, AMD-TP-01 AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması").
- Eğer laboratuvar agar dilüsyon testi yapmıyorsa ve hasta uygun antimikrobiyal kemoterapiye yanıt vermiyorsa izolat kromojenik sefalosporin testi (Sefinaz nitrosefin diskleri, BD Biosciences) ile β -laktamaz üretimi yönünden test edilmeli ve Referans laboratuvarına agar veya sıvı dilüsyon duyarlılık testleri için gönderilmelidir (20).

5.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Kapsüller tipinin belirlenmesi izolatu doğru larken, diğer yandan da özellikle epidemiyolojik amaçlar için önemli veri sağlar. Bu nedenle izolatlar Referans laboratuvara gönderilmelidir.
- Referans laboratuvar serotiplendirme ve serosubtiplendirme yapabilir. Ayrıca moleküler tiplendirme yöntemleri ile farklı bölgelerden gelen *N.meningitidis* izolatlarının epidemiyolojik ilişkisi olup olmadığını analiz edebilir ve bir salgınla ilişkileri olup olmadığını ortaya koyabilir (33).
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (34) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler.
- KKA ve ÇA besiyerlerinde *N.meningitidis* en fazla 3-4 gün canlı kalabilir. Bu yüzden kısa ve uzun dönem saklama yöntemlerine ihtiyaç duyulur.
- Dorset Egg transport besiyeri, yatık ÇA ve silika-jel paketleri kısa süreli saklamalar için elverişlidirler. Bu besiyerleri bilhassa izolatların Referans laboratuvara gönderilmesi süresince korunması sağlamak bakımından kullanışlıdır. *N.meningitidis* izolatları;
 - (a) Dorset Egg transport besiyerinde oda sıcaklığında 3 hafta,
 - (b) Yatık ÇA'da oda sıcaklığında 1 hafta,
 - (c) Silika jelde +4°C'de 2 hafta, oda sıcaklığında daha kısa süre saklanabilirler.
- Uzun süreli saklama için *N. meningitidis* izolatlarının steril 'skim-milk' ya da gliserol içeren besiyeri içinde yoğun süspansiyonu da yapılabilir (yöntem uygulaması için bkz. UMS, B-TP-01).
- Yoğun *N. meningitidis* süspansiyonunun -80°C derin dondurucuda veya daha düşük sıcaklıklarda (likit nitrojen tankında) yıllarca saklanabilir.
- -20°C derin dondurucu da kullanılabilir; ancak canlılık kaybı hızlıdır ve birkaç hafta ya da aylık saklamalar için elverişli olabilir (33).
- Bazı laboratuvarlar izolatlarını liyofilize ederek saklayabilmektedirler. Liyofilizasyon için ise 'skim milk', serum temelli bir besiyeri veya polivinil-pirolidon kullanılır.
- Pozitif bulunan klinik örnekler de -80°C'de saklanmalıdır (33).

6 Tanıda diğer yöntemler

6.1. Moleküler yöntemler

- Son yıllarda PCR gibi DNA temelli tanı yöntemlerinin önemi artmıştır. PCR ile örnekteki organizma canlı olmasa bile DNA'sı tespit edilebilir.
- Öte yandan henüz meningokok nükleik asitlerinin klinik örneklerde saptanmasına yönelik testlerin standardizasyonu tamamlanmamıştır ve klinik laboratuvarlarda rutin uygulanabilen ticari PCR kitleri mevcut değildir (20,26). PCR dünya genelinde halen az sayıda laboratuvar da ve *in-house* tekniklerle çalışılmaktadır. Bazı gerçek-zamanlı PCR uygulamaları da vardır (26).

7 Raporlama ve bildirim

- Normalde steril vücut bölgelerinden (kan, BOS, sinovial-eklem, perikardial ve plevral sıvı) alınan örneklerin boyalı direkt mikroskopik incelemelerinde gram negatif diplokokların görülmesi "olası tanı" bulgusudur ve "ön tanı" olarak hızla klinisyene rapor edilmeli veya telefon vb. ile bilgi verilmelidir.
- Normalde steril vücut bölgelerinden örneklerin kültürlerinden *N.meningitidis* izolasyonu "kesin tanı" bulgusudur ve "kesin tanı" olarak hızla klinisyene rapor edilmelidir.
- BOS'da *N.meningitidis* antijenlerinin gösterilmesi de (mevcut standart vaka tanımına göre) "kesin tanı" bulgusudur ve sonuçlar hemen klinisyene rapor edilir. Ancak yanlış pozitiflik olasılığına karşı dikkatli olunmalı; mutlaka örnekten Gram boyama ve kültür de yapılmalıdır.
NOT: BOS haricindeki klinik örneklerde antijen saptama testleri, hatalı pozitif sonuç olasılığı yüksek olduğu için, yapılmamalıdır.
- Bütün negatif kültür sonuçları inkübasyon süresi ile birlikte rapor edilmelidir: *ör.*, "7 günlük inkübasyon sonucunda üreme olmadı" gibi.
- Meningokok menenjit ve meningokokseminin bildirimi zorunludur (3,4). Epidemiyotansiyeli nedeniyle uygun kontrol önlemlerinin bir an önce alınmasını gerektirir. Mevcut bildirim sistemine göre Halk Sağlığı Müdürlüğüne bildirim yapılır ve bu klinisyenin sorumluluğudur (4). Bununla birlikte (başka bir ifade ile hastalığın *laboratuvar dan bildirimi* zorunlu olmasa da) pozitif sonuç elde edilmez laboratuvarın ilgili birime haber vermesi (*ör.*, telefon ile) uygun kontrol önlemleri için harekete geçme süresini kısaltması nedeniyle değerlidir.

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Antibiyotik tedavisi başladıktan sonra alınan örneklerin kültüründe izolasyon şansı oldukça azdır.

- *N.meningitidis*, dış ortam koşullarına oldukça duyarlı bir bakteridir. Bu nedenle BOS örneği alınır alınmaz besiyerlerine ekilmesi gereklidir. Bu mümkün değilse BOS örneğinin mutlaka T-I besiyerine veya pediatrik kan kültür şişesine alınması gerekir.

9 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr

Tel: 0312 565 5508

e-posta: usypri@saglik.gov.tr

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden bakteriyel menenjit etkenlerinin (*N.meningitidis*, *S.pneumoniae* ve *H.influenzae*) tanı, doğrulama, serotiplendirme ve moleküler epidemiyolojik tiplendirmelerinin yapılması, antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması; bölgesel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması.

Ekler

Ek-1 Trans-Isolate (T-I) besiyeri hazırlanması

Materyal

Katı faz için

Aktif kömür	2 g
Nişasta (eriyebilir)	2.5 g
Agar	10 g
0.1M MOPS* tampon (pH 7.2)	500 mL

Sıvı faz için

Triptik soya buyyon bazı	30 g
Gelatin	10 g
0.1M MOPS tampon (pH 7.2)	500 mL
SPS	250 mg
Vitox veya Isovitalex	10 mL

Besiyerinin yapılışı

0.1M MOPS tamponun (pH 7.2) hazırlanması

- 1 MOPS tampon tozu (analitik saflıkta) 20.93 g tartılır; 900-950 mL distile su ilave edilir, eritilir; 1N NaOH ile pH 7.2'ye ayarlanarak su ile hacim 1000 mL'ye tamamlanır.

Katı fazın hazırlanması

- 2 Aktif kömür, eriyebilir nişasta ve agar tartılır; 500 mL MOPS tampon ilave edilir. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak ısıtılır. Agarın ve nişastanın erimesi sağlanır.
- 3 20 mL'lik serum şişelerine 5'er ml dağıtılır.
- 4 121°C de 30 dk otoklavlanır. Otoklavdan çıkarılan şişeler sepeti ile birlikte, agarın tepesi şişenin omzuna gelecek şekilde eğik konumda soğumaya bırakılır.

Sıvı fazın hazırlanması

- 1 Triptik soya buyyon bazı ve jelatin tartılır. Üzerine 500 mL MOPS tampon ilave edilir. Jelatinin çözünmesi için besiyeri ısıtılır, koagüle olmamasına dikkat edilir.
- 2 121°C de 15 dk otoklavlanır. Otoklavdan çıkarılınca oda sıcaklığına gelmesi beklenir.

T-I besiyerinin yapılması (28)

- 1 Bu aşama için şu olasılıklar vardır:
 - (a) Katı fazı içeren şişelere 5'er mL sıvı faz besiyeri aseptik koşullarda ilave edilir.
 - (b) Eğer besiyeri kan kültürü için kullanılacaksa **önce** sıvı faza SPS eklenir. Bunun için SPS tartılır. Bir miktar (≤ 5 mL) MOPS tampon içinde kuvvetli bir şekilde çalkalanarak çözülür. Membran filtre (0.22 μ m) ile steril edilir ve sıvı faza ilave edilir. Sonra "(a)" adımı gerçekleştirilir.
 - (c) Eğer T-I besiyeri *H. influenzae* izolasyonu için de kullanılacaksa **önce** sıvı faza (aseptik olarak) 10 mL IsoVitaleX veya Vitox gibi bir üreme destekleyici de eklenir. Sonra "(a)" adımı gerçekleştirilir.

* MOPS: 3- (N-morfolino) propan sülfonik asit

- (d) Alternatif olarak üreme destekleyici katmadan T-I besiyeri tamamlanır. Kullanma aşamasında ihtiyaç duyulan sayıda şişeye üreme destekleyici eklenir ki, bu durumda aseptik olarak bir şişeye 0.1 mL Vitox veya IsoVitaleX eklenmelidir.
- 2 Şişeler steril bir kauçuk tıpa ve alüminyum kapaklar ile kapatılmalıdır. Otomatik bir sistem mevcut değilse, alüminyum kapakları tutturmak için bir el ile sıkma aracı kullanılmalıdır.
 - 3 Bu şekilde hazırlanmış T-I şişelerinin üzeri etiketlenerek hazırlama ve son kullanma tarihleri yazılır. Eğer kapakları iyi sıkı kapatılmış ise +4°C'de raf ömrü en az 2 yıldır.
 - 4 Buzdolabında saklama esnasında sıvı fazı jelatinöz hale gelebilir, ancak oda sıcaklığına getirildiğinde yeniden erir.
 - 5 Şekil 10'da bifazik T-I besiyeri şişeleri görülmektedir.



Şekil 10. T-I besiyeri şişelerinin görünümü (1,27).

Besiyerinin kalite kontrolü

- 1 Kullanmadan önce; (i) sterilite kontrolü için 2-3 şişe inoküle edilmeksizin 35°C'de inkübe edilmelidir; (ii) üreme kontrolü için de aşağıda verilen standart suşlar ile test edilmelidir.
- 2 **Kontrol organizmaları** (alternatifi biyokimyasal olarak tam tanımlanmış laboratuvar suşları kullanılabilir).
Neisseria meningitidis (ATCC13090)
Haemophilus influenzae type b (ATCC 10211)
Streptococcus pneumoniae (ATCC 6305)
- 3 **Üreme kontrolü için**, kontrol organizmalarından hazırlanan 10^4 - 10^5 cfu/mL yoğunluğundaki süspansiyonlardan şişelere 0.1'er mL ekim yapılır. Oda sıcaklığında 18-48 saat inkübe edilir. Bulanıklık gözlenmesi üreme göstergesidir; ancak şişelerde ÇA plaklarına da çizgi ekimler yapılarak teyit edilmelidir.
- 4 **Beklenen sonuç** bütün kontrol suşlarının izole edilebilmesidir.

Ek-2 CTA şeker kullanım besiyeri ve test

Stok şeker solüsyonu hazırlanması

- 1 %10'luk şeker solüsyonları hazırlamak için; glikoz, maltoz, laktoz ve sukrozun her birinden ayrı ayrı 1 g tartılır ve her biri ayrı ayrı 10 mL distile suda eritilir.
- 2 Sonra her biri 0.22 µm filtre ile steril tüplere aktarılarak steril edilir (stok şeker).

Besiyeri bazı için maddeler

L-Sistin	0.5 g
Tritikaz	20 g
NaCl	5 g
Sodyum sülfat	0.5 g
Fenol kırmızısı	17 mg
Agar	2.5 g
Distile su	900 mL

Besiyerinin hazırlanması

- 1 CTA baz besiyeri için yukarıda listelenen maddeler karıştırılır. pH 7.3'e ayarlanır ve 90 mL alikotlar halinde ağız burgu kapaklı şişelere bölünür. 121°C de 15 dk otoklavlanır.
- 2 Şişeler 55°C su banyosuna konarak soğutulur. Şişelerden 4 tanesi* ayrılır ve aseptik olarak pH'ları ölçülür; gerekiyorsa 7.3'e yeniden ayarlanır.
- 3 Bu şişelerin her birine bir **stok şeker** solüsyonu (10 mL) aseptik şartlarda ilave edilir; karışması sağlanır. Böylece %1 şekerli CTA elde edilmiş olur.
- 4 Önceden şekerin adı yazılarak etiketlenmiş steril tüplere (16×125 mm, vidalı kapaklı, cam) %1 şekerli CTA'dan 7'şer mL dağıtılır.
- 5 Besiyerleri dik konumda katılaşmaya bırakılır.

* *Kalan şişeler CTA baz olarak buzdolabında saklanır ve yeniden şekerli CTA gerektiğinde sıcak su banyosunda eritilip şeker eklenerek kullanılabilir.*

Testin yapılışı

- 1 Her test edilecek *Neisseria* izolatı için, glikoz, maltoz, laktoz ve sukroz olmak üzere %1 şekerli CTA tüplerinden bir set hazırlanır.
- 2 İzolatın KKA veya ÇA'daki bir gecelik kültürden öze ile koloni alınır.
- 3 Tüp besiyerinin üstteki 1/3'lük bölümüne birkaç kez batırma ekimi yapılır. Her bir şekerin ekiminde farklı öze kullanılır. Bir tüpten diğerine madde taşınmamalıdır!
- 4 Ekimler 35°C'de ve normal atmosferde 72 saat inkübe edilir.

Testin değerlendirilmesi

- 5 Üreyerek ekildiği tüpteki karbonhidratı kullanan *Neisseria* tüpteki ortamı asite dönüştürdüğünden fenol kırmızısının rengi sarıya dönüşür; besiyerinin üst kısmında gözle görülebilir sarı renk oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir.
- 6 İnokülasyonu takiben 24 saat içinde reaksiyon gözlemlenebilir; ancak bazı reaksiyonlar gecikebilir. Bu nedenle 72 saat dolmadan sonuç negatif olarak değerlendirilmemelidir.

Ek-3 *N.meningitidis* lam aglütinasyon testi

Materyal

Çikolata agara pasajlanmış 24 saatlik taze saf bakteri kültürü
 Polivalan A, B, C antiserumu
 Polivalan X, Y, Z antiserumu
 Monovalan antiserumlar
 W135 ve Z antiserumları
 Temiz lamlar
 Steril cam tüpler
 Steril pipet uçları
 Steril %0.85 NaCl (SF)
 McFarland No 3 bulanıklık standardı

Hazırlık

- 1 Tüm malzemeler oda ısısına gelmeleri için önceden buzdolabından çıkarılır.
- 2 Biyogüvenlik kabini en az 5 dk önceden çalıştırılır. Çalışılacak tüm malzemeler biyogüvenlik kabinine önceden yerleştirilir. Uygun KKD (önlük, eldiven) giyilir.
- 3 Steril bir cam tüpe 500 µL SF konulur ve taze pasajdan McFarland No 3 yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanır.
- 4 Lam alkol ile temizlenir ve cam kalem ile 3 bölmeye ayrılır.

Testin yapılışı

- 1 Bölmelere 10'ar µL bakteri süspansiyonu konulur.
- 2 İlk bölmeye herhangi bir antiserum konulmaz.
- 3 İkinci bölmeye polivalan A, B, C antiserumu, üçüncü bölmeye polivalan X, Y, Z antiserumundan 10'ar µL eklenir.
- 4 Lam bir dakika süreyle elde sürekli olarak hafif dairesel hareketlerle çevrilir.

Testin değerlendirilmesi

- 1 Bir dakika sonra aglütinasyon varlığı değerlendirilir.
- 2 Lamin ilk bölmesinde "otoaglütinasyon" gözlenmemelidir.
- 3 Aglütinasyon bir antiserumla gerçekleşmelidir.
- 4 Polivalan antiserumlardan biriyle aglütinasyon oluşması durumunda test monovalan antiserumlar ile tekrarlanır.
- 5 Polivalan antiserumlar ile herhangi bir reaksiyon gözlenmediyse W135 ve Z antiserumları ile işlem tekrarlanır.
- 6 Sonuçlar aşağıdaki gibi yorumlanır ve kaydedilir:
 - 4+ %100 aglütinasyon (berrak ila hafif bulanık zemin)
 - 3+ %75 aglütinasyon (hafif bulanık zemin)
 - 2+ %50 aglütinasyon (orta derecede bulanık zemin)
 - 1+ %25 aglütinasyon (bulanık zemin)
 - Aglütinasyon yok

Kalite kontrol

Test edilen izolat ile birlikte daha önceden serogrubu belirlenmiş meningokok suşları da teste alınır ve pozitif kontrol olarak kullanılır. Bu amaçla A, B, C, X, W135, Y, Z ve Z' serogrubu *N.meningitidis* suşlarından faydalanılır.

Sınırlılıklar

- 1 Otoaglutinasyon oluşuyorsa, kültür R tipi ve antijenik değerlendirme için uygun değil demektir.
- 2 Otoaglutinasyon varlığında ya da kalite kontrol suşu ile aglutinasyon olmaması halinde test tekrarlanmalıdır.
- 3 Her iki durumda da yeni pasaj yapılmalı ve aglutinasyon işlemi tekrarlanmalıdır.
- 4 Çeşitli antiserumlar ile birden fazla aglutinasyon gözlenmemelidir.
- 5 Herhangi bir antiserum ile aglutinasyon oluşmaması suşun serogruplandırılmayacağı anlamına gelir.
- 6 Test edilen izolat ve pozitif kontrol suşu ile +3 değerinde reaksiyon gözlenmelidir.
- 7 Negatif kontrol aglutinasyon göstermemelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (*Neisseria meningitidis* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-14	Loeffler'in metilen mavisi
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, B-TP-23	X, V ve XV faktör gereksinimi (satellit fenomeni için)
UMS, B-MT-04	<i>Haemophilus influenzae</i> invaziv enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-05	<i>Streptococcus pneumoniae</i> invaziv enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-04	MIK saptama yöntemleri
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C et al. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* serotype Typhi, *Shigella*, and *Vibrio cholera*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and World Health Organization (WHO), 2003.
- 2 Popovic T, Ajello G, Facklam R. Laboratory manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO/CDS/CSR/EDC/99.7, 1999.
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 Brooks Gf, Carroll KC, Butel J, Morse S, Mietzner T. The *Neisseriae*. In: Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA (eds). *Medical Microbiology*. 25th ed. McGraw-Hill Medical, New York. 2010.
- 6 Apicella MA. *Neisseria meningitidis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed.). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th Edition. Elsevier, Philadelphia. 2010, p. 2737-2752.
- 7 Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. *Neisseriae*. In: *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. 2nd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2007, p.101-109.
- 8 Janda W, Gaydos C. *Neisseria*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH(eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed., ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 601-620
- 9 Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine* 2012;30 (Suppl 2):B26-36.
- 10 Caugant DA, Nicolas P. Molecular surveillance of meningococcal meningitis in Africa. *Vaccine* 2007; 3: 8-11.
- 11 Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis* 2002;185:1596-1605.
- 12 World Health Organization. Meningococcal disease, serogroup W135 (update). *Wkly Epidemiol Rec* 2001;76:213-214.
- 13 Kilic A, Urwin R, Li H, Saracli MA, Stratton CW, Tang YW. Clonal spread of serogroup W135 meningococcal disease in Turkey. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 222-224.
- 14 Kilic A, Jolley KA, Gul HC, et al. Genetic and antigenic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from Turkish recruits in 2006. *Intern Med* 2008;47:1949-1950.
- 15 Ercis S, Köseoğlu Ö, Salmanzadeh-Ahrabi S, Ercis M, Akın L, Haşcelik G. Ankara ili Çankaya ilçesi okullarındaki sağlıklı çocuklarda nazofaringeal *Neisseria meningitidis* taşıyıcılık prevalansı, serogrup dağılımı ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bul* 2005;39(4):411-20.
- 16 Kılıç A, Jolley KA, Beşirbellioğlu B, Koçak N, Bedir O, Eyigün CP, Başustaoglu AC. Bir askeri hastanede fatal menenjit etkeni olarak izole edilen *Neisseria meningitidis* serogrup W-135 suşlarının genotipik özellikleri. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43: 515-517.
- 17 Punar M, Çağatay AA, Özsüt H, Eraksoy H, Çalangu S, Dilmener M. İstanbul'da bir ilkokulda asemptomatik *Neisseria meningitidis* taşıyıcılığı. *Klimik Derg* 2001;14(1):17-18.
- 18 Dinleyici EÇ. Yeni meningokok aşıları. *ANKEM Derg* 2012;26(Ek 2):50-60.

- 19 Kilic A, Bedir O, Basustaoglu AC, et al. *Neisseria meningitidis* serogroup X sequence type 767 in Turkey. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):4340-1.
- 20 Elias J, Frosch M, Vogel U. *Neisseria*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 559-573
- 21 Marrazzo JM, Handsfield HH, Sparling PF. *Neisseria gonorrhoeae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed., Elsevier, Philadelphia. 2010, p. 2753-2770
- 22 Schwam E, Cox J. Fulminant meningococcal supraglottitis: An emerging infectious syndrome? *Emerg Infect Dis* 1999;5:464-467.
- 23 Salet IE, Frasch CE. Seroepidemiologic aspects of *Neisseria meningitidis* in homosexual men. *Can Med Assoc J* 1982;126:38-41.
- 24 Tunkel AR, Scheld WM. Acute meningitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone, Chapter 80; 2005
- 25 York MK. Cerebrospinal Fluid Cultures. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.7.1 - 3.7.7
- 26 CDC. Chapter 10: PCR for detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. Second edition, CDC and WHO. 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html> (son erişim tarihi 06.01.2014).
- 27 CDC. Chapter 5. Collection and transport of clinical specimens. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC ve WHO. 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt05-collect-transport-specimens.html> (son erişim tarihi 03.03.2014).
- 28 Ajello GW, Feeley JC, Hayes PS et al. Trans-isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1984;20(1):55-8
- 29 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 30 CDC. Chapter 6. Primary culture and presumptive identification of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC and WHO, 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt06-culture-id.html> (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 31 CDC. Chapter 7: Identification and characterization of *Neisseria meningitidis*. Second edition, CDC and WHO. 2011 <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt07-id-characterization-nm.html> (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 32 York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Catalase Test. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.17.11.
- 33 CDC. Chapter 14: Storage and shipping of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Second ed., CDC and WHO. 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt14-storage-shipping.html> (son erişim tarihi 06.01.14)
- 34 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Haemophilus influenzae İnvaziv Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-04
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Mikroorganizmanın özellikleri	4
Mikrobiyolojik tanısı	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 <i>H. influenzae</i> tanısı için genel yaklaşım	9
4 Örneklerin direkt incelenmesi	11
5 Kültür	12
6 Tanıda diğer yöntemler.....	20
7 Raporlama ve bildirim	21
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	21
9 Referans Laboratuvar	21
EKLER.....	22
Ek-1 <i>H. influenzae</i> serogruplandırma testi	22
Ek-2 <i>H. influenzae</i> için β -laktamaz testi	24
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	25
KAYNAKLAR.....	25

Kapsam ve Amaç

Haemophilus influenzae küçük, gram negatif, fakültatif anaerob kokobasillerdir. Doğal hayvan konağı yoktur, yalnızca insanda hastalık yapar. Bakterinin en dışında bulunan polisakkarit yapıdaki kapsülü başlıca virülans faktörü olup organizmayı fagositozdan korur. Kapsül polisakkarit yapısına göre altı farklı serotipi (a, b, c, d, e, f) bulunmaktadır (1,2,3,4).

Haemophilus influenzae menenjit, pnömoni, sepsis, epiglottit, septik artritis, perikardit, osteomyelitis gibi invaziv enfeksiyonların ve otitis media, sinüzit, bronşit ve konjunktivit gibi mukozal enfeksiyonların oldukça yaygın bir nedenidir. *H. influenzae* menenjiti neredeyse sadece 5 yaşından küçük çocuklarda meydana gelir ve bu en invaziv *H. influenzae* hastalığına b tipi kapsüle sahip olan kökenler (Hib olarak kısaltılır) neden olurlar. Genel olarak invaziv hastalıktan sorumlu kökenlerin çoğunluğu da (%95) tip b kapsüle sahiptir ve olguların %85'i beş yaş altı çocuklar olup 6-12 aylık bebeklerde risk en yüksek düzeydedir (5).

Bakteriyel menenjitler dünya genelinde halen en önemli enfeksiyöz hastalıklardır. En sık rastlanan üç meningeal patojen olan *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* vakaların %80'den fazlasını oluşturur. Erken ve özgül tanı hasta yönetiminde ve hastalığın kontrolünde önemlidir. DSÖ bu bakteriyel patojenlerin neden olduğu menenjitlerin ya da invaziv hastalıkların dünya genelinde azaltılması ile ilgili yaygın program yürütmektedir (3,4). Ülkemizde de bu üç patojenin invaziv hastalıkları bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır (6,7).

Bazı klinik özellikleri ile olası etiyoloji akla getirilebilirse de bu hastalıkların kesin tanısı mikrobiyolojik incelemeye dayanır. "Tanı stratejisi"ni ise laboratuvara gelen klinik örneklerden bu üç patojen dahil bütün olası bakterilerin yakalanabileceği ortak bir tanı akış şemasının izlenmesi oluşturur (3,8).

Hastalığın seyri ölümcül olabileceğinden **bakteriyel menenjit** etkenlerinin tanısı ve daha özel olarak da **Hib invaziv enfeksiyonlarının** tanısı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının önemli tanı fonksiyonlarından biridir. Bu nedenlerle bu UMS belgesinde, Hib invaziv enfeksiyonlarının tanısı için izlenecek akış şeması ile başta kültürlerden izolasyonu olmak üzere, doğru ve güvenilir tanı için geçerli prosedürlerin verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇA	Çikolata agar
Hib	<i>H. influenzae</i> tip b
KKA	%5 Koyun kanlı agar
MIK	Minimal inhibitör konsantrasyon
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NTHi	Tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> (kapsülsüz <i>H. influenzae</i>)
T-I	Trans-Isolate (besiyeri)

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

H. influenzae pnömoni, menenjit, otitis media ve konjunktivit gibi hastalıkların sık karşılaşılan bir etkenidir. *H. influenzae*'ya bağlı gelişen menenjit özellikle beş yaş altı çocuklarda görülmekte olup sıklıkla tip b polisakkarid kapsülüne sahip kökenler enfeksiyondan sorumludur (8). *Haemophilus influenza* tip b (Hib) pek çok organ sistemlerini etkileyebilen bir invaziv hastalık etkeni bakteridir. İnvaziv hastalığın en sık rastlanan tipleri pnömoni, bakteremi, menenjit, epiglottit, septik artrit, sellülit ve otitis mediadır. Daha az sıklıkla endokardit ve osteomyelitte neden olabilir. Hib enfeksiyonlarında kaynak insan olup enfeksiyon taşıyıcı veya hastaların solunum yolundan saçılan damlacıklara maruz kalma sonucu gelişir.

Hib tüm dünyada sıklıkla 5 yaş altı çocuklarda özellikle 2 ay-3 yaş arasında görülen bakteriyel menenjitlerin önde gelen nedenidir. Gelişmekte olan ülkelerde insidans özellikle 6 aydan küçük bebeklerde yüksektir. Dünya çapında her yıl küçük çocuklarda en az 3 milyon ciddi hastalık olgusu ve 400 000 - 700 000 ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir (1,9).

Ülkemizde çocukluk çağı menenjitlerinde etkenleri belirlemeyi amaçlayan henüz tamamlanmamış çok merkezli bir çalışmada Hib, menenjitlerin %13'ünde etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Hib'in daha sık görülen meningokok ve pnömokokdan en önemli farkı etkin olduğu gösterilmiş ve gelişmiş ülkelerin hepsinde rutin uygulamaya konmuş bir aşısının bulunmasıdır (10). Hib'e karşı geliştirilmiş konjuge aşılar dünyada yaygın olarak kullanılmakta olup ülkemizde de 2006 yılından bu yana çocukluk çağı rutin aşılama programına dahil edilmiştir (11). Bununla beraber diğer serotiplere karşı ya da kapsülsüz türler için geliştirilmiş bir aşı bulunmamaktadır (12).

Özellikle aşılanmamış 4 yaş altı çocuklarda Hib enfeksiyonu geçirmekte olan bir kişi ile temas sonrası etkene maruziyet ve ikincil olarak Hib menenjitinin ortaya çıktığı bildirilmektedir. Aşılama bu şekilde ortaya çıkan ikincil enfeksiyonları da önlemektedir. *H. influenzae* kökenlerinde beta laktam antibiyotiklere karşı direnç sıktır. Etkenin laboratuvara dayalı sürveyansı ile antimikrobiyal duyarlılığı ve yayılımı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Laboratuvarlardan elde edilecek bu veriler, hem ampirik antibiyotik tedavisinin seçiminde hem de aşılama etkinliğinin izlenmesinde önemli bir yere sahiptir (8).

Mikroorganizmanın özellikleri

Haemophilus cinsi bakteriler *Pasteurellaceae* ailesinde bulunan, 0.2-0.3 x 1.0-2.0 µm boyutlarında fakültatif anaerop, gram negatif, pleomorfik kokobasillerdir (8).

H. influenzae güç üreyen bir mikroorganizmadır. üremek için ortamda hemin (X faktör) ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD/V faktör) maddelerine ihtiyaç duyar ve bu maddeleri içeren besiyerlerinde en iyi 35-37°C'de ve ~%5 CO₂'li ortamda ürer. *H. influenzae* bu büyüme faktörlerinin her ikisine birden olan gereksinimi nedeniyle aynı zamanda diğer *Haemophilus* türlerinden de ayrılır (8).

H. influenzae kapsüllü ya da kapsülsüz olabilir. Kapsülsüz *H. influenzae* kökenleri tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) olarak adlandırılırken, kapsüllü türler polisakkarid kapsülün yapısına göre 6 farklı serotipe ayrılır. Bunlardan en sık invaziv hastalığa neden olan tür *H. influenzae* tip b (Hib)'dir. Kapsül içermeyen NTHi kökenler de invaziv hastalığa neden olabilirler (1,8).

Haemophilus türlerinin hücre duvarında endotoksin aktivitesine sahip lipopolisakkaridler ve dış membranında da kökene ve türe özgü proteinler bulunmaktadır. Hem kapsüllü hem de kapsülsüz suşlarda bulunan fimbrialar ağız ve üst solunum yolu epiteline ve insan adenoid epiteline tutunmada rol oynar ve kolonizasyonu sağlarlar. Diğer bir virülans faktörü olan IgA proteaz ise insanda IgA1'i parçalayarak musin içinde bakterilerin tutunmasını önler (1).

Mikrobiyolojik tanısı

H. influenzae invaziv hastalığının kesin tanısı steril vücut sıvılarından etkenin izolasyonu ile konur. Örnekten yapılan Gram boyama tanıda yönlendirici olmakla birlikte organizmanın boyalı preparatta görülebilmesi için BOS veya kanda yüksek konsantrasyonda (yaklaşık 10^4 bakteri/mL) olması gerekir (13).

Kültür

H. influenzae genel kullanım besiyerlerinde genellikle güç ürer. İzolasyon için hemin ve NAD içeren zenginleştirilmiş besiyerlerine ihtiyaç duyar ki, çikolata agar (ÇA) *H. influenzae* için bu özellikleri karşılayan standart besiyeridir. ÇA hemin (X faktör) ve NAD (V faktör) için iyi bir kaynak olan ısı ile lize edilmiş at kanı veya koyun kanı ile hazırlanır. Ayrıca NAD, hazır bazı *H. influenzae* "büyüme destekleyici" maddelerde de bulunur. Bakterinin üremesini desteklemek için bu hazır büyüme destekleyici maddeler de ÇA'ya eklenebilir (8).

H. influenzae ÇA'da, büyük, düzgün yüzeyli, konveks, renksiz veya grimsi, opak koloniler oluşturur. Kapsüllü kökenler daha mukoid görünümlüdür ve daha küçük, gri koloniler olarak görülürler. Koloniler hemolizsizdir. *H. influenzae* kolonilerinin kendine özgü bir keskin indol kokusu olmakla beraber kültür plakları asla koklanmamalıdır.

H. influenzae, büyüme faktörleri içermeyen KKA'da üreyemez. ÇA'nın temin edilemediği durumlarda *H. influenzae*'nin koyun kanlı agarda üremesi; *S. aureus* ile yapılan çizgi ekim veya X ve V faktörleri ile emdirilmiş filtre kağıtlarının (ya da disklerinin) besiyeri yüzeyine yerleştirilmesi suretiyle artırılabilir. *H. influenzae* çizgi ekimdeki stafilocok üremesinin etrafında "satellit (uydu) koloni" veya disk/strip çevresinde bir üreme zonu (hale) şeklinde ürer.

BOS örneklerinin ilk ekimlerinde ve kan kültürlerinin pasajlarında KKA ve ÇA birlikte kullanılır. Tek bir plağın kullanılması durumunda ÇA tercih edilmelidir (8).

H. influenzae'nin hali hazırda kapsül antijenlerine göre belirlenmiş 6 serotipi bulunmaktadır; a, b, c, d, e, ve f. Serotiplendirme yapılırken tüm serotiplere ait anitiserumların kullanılması gerekemeyebilir. Serotiplendirme akış şeması oluşturulurken ülkede *H. influenzae* tip b aşılamaının yapıp yapılmadığına göre karar verilmelidir (8).

Antijen testi

H. influenzae'nin BOS ve diğer steril vücut sıvılarından doğrudan saptanmasına yönelik kullanılan ticari kitler vardır. Hızlı tanıyı sağlasa da bu teknikler Gram boyama ile karşılaştırıldıklarında düşük özgüllük ve duyarlılığa sahiptir. Bu nedenle direkt antijen testlerinin Hib tanısındaki klinik değeri düşüktür (13).

Antijen saptama testinde sonucun "negatif" bulunması hastalığı dışlamaz. Yanlış pozitiflik, özellikle idrar incelemelerinde, olasılık dahilindedir. Hastanın klinik ve epidemiyolojik özellikleri ile birlikte değerlendirilmeli ve sonuç mümkünse kültür ile doğrulanmalıdır.

Moleküler testler

Nükleik asit amplifikasyon teknikleri de BOS, serum, plazma gibi klinik örneklerden direkt *H. influenzae* tanısının konulmasında kullanılabilir. Bu yöntemlerin duyarlılıkları yapılan çalışmalarda genellikle farklılık göstermekle beraber özgüllükleri çok iyidir.

Haemophilus türlerinin etken olduğu bakteriyemilerde klinik örnekte organizma sayısının çok az olması nedeniyle duyarlılık düşmekte, duyarlılığın artırılması için çalışılan kan ve BOS miktarlarının artırılmasının da düşük bir klinik yarar sağladığı ifade edilmektedir. Buna ek olarak tedaviyi takiben kültür negatifleştikten sonra en az iki hafta kan ve BOS'da bakteri DNA'sının tespit edilebiliyor olması gibi hatalı pozitiflikler de tanıyı güçleştirmekte, karmaşık hale sokmaktadır (13).

Son yıllarda birçok geleneksel ve gerçek-zamanlı PCR testleri geliştirilmiştir. Dünya genelinde invaziv klinik örneklerden etkenlerin direkt tanımlandığı pek çok valide edilmiş test değerlendirilmiştir ve bu testlerin tanıda kullanılan diğer yöntemlerin tamamlayıcısı olarak kullanılabilecekleri kabul edilmiştir (13).

Ayrıca serogrup/serotiplendirmeye yönelik gerçek-zamanlı PCR testleri de bulunmaktadır. Özellikle Hib aşısının yaygın kullanıma girmesiyle Hib dışındaki diğer serotiplerin de saptanması önem kazanmaktadır.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Haemophilus influenzae

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

H. influenzae Risk Grubu 2 organizmadır. Tüm laboratuvar işlemleri BGD2 laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve standart güvenlik önlemleri alınmalıdır. BGD2 düzey, çalışma koşulları ve dikkat edilmesi gereken konular için bkz. Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen menenjit veya invaziv Hib hastalığından şüpheleniyorsa **kültür için** örnekleri laboratuvara göndermeden önce, laboratuvarın gerekli hazırlığı yapabilmesi için laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reajen, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Bakteriyel menenjitlerde veya majör bakteriyel menenjit patojenlerinin (meningokok, pnömokok ve *H.influenzae*) neden olduğu invaziv hastalık tanısında hemen hemen aynı örneklerden belli bir akış şeması izlenerek tanıya gidildiği hatırlanmalıdır (14).

Hib menenjiti veya invaziv hastalığı tanısında örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve "Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberleri"nden edinilebilir (15). Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Örnekler mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır.
- BOS ve kan örnekleri tanıda ilk seçenektir. Eklem sıvısı, plevra, perikard, peteşiyal aspirat incelenebilecek diğer örneklerdir.
ÖNEMLİ NOT: Bakteriyel menenjit veya invaziv enfeksiyon tanısı için alınan BOS, kan veya diğer klinik örnekler laboratuvarda işleme alınincaya kadar geçen süre boyunca oda sıcaklığında veya 35°C'de taşınmalı ve saklanmalıdır; kesinlikle buzdolabına konmamalıdır (3,14).
- Kan - Kültür için aseptik koşullarda alınmalıdır. Hib şüphesi varsa kan Isovitalax veya Vitox eklenmiş kan kültürü şişesine aktarılır ve yumuşakça çevrilerek karışması sağlanır. Kan kültürü örnek yönetimi için bkz. Kaynak 16.
- BOS – BOS'da alınabilen örnek miktarı sonraki işlemleri belirler. Laboratuvara hemen ulaşamayacaksa tüplerden birindeki BOS örneği (~1 ml) tercihen bifazik T-I besiyeri içeren şişeye; yoksa bir pediatrik kan kültür şişesine inoküle edilip gönderilmelidir. Hib şüphesi varsa şişelere (T-I, kan kültürü) Isovitalax veya Vitox eklenmelidir.
NOT: T-I, yatık agar ve sıvı olmak üzere iki fazlı bir besiyeridir (17).
- Steril vücut bölgesinden sıvı örnekleri de BOS gibi işlem görmeli, örnek steril bir tüpe aktarılarak hemen laboratuvara gönderilmelidir. Bu mümkün değilse bifazik, Isovitalax veya Vitox eklenmiş T-I besiyerine; T-I besiyeri yoksa bir pediatrik kan kültürü şişesine aseptiye dikkat edilerek inoküle edilir (15).

- Plevral sıvı ÇA veya ve triptikaz soya bazlı KKA'ya doğrudan ekilmelidir. Kan kültürü şişesine alınması önerilmez.
- T-I veya kan kültürü şişelerine konan örnekler (pediyatrik olanlar dahil) bir gece 35°C'de inkübe edildikten sonra ve/veya 24 saat içinde oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılabilir. Taşıma esnasında örneklerin aşırı sıcaklık değerlerine (<18°C veya >37°C) maruz kalmasına kesinlikle izin verilmemelidir.

Besiyeri / Reaktif

- KKA – Triptik soya agar baz ile hazırlanmış %5 koyun veya at kanlı agar idealdir. Piyasadan hazır temin edilebilir; laboratuvarında da hazırlanabilir. *N. meningitidis* ve *S. pneumoniae* KKA'da ürerler. KKA'da *H. influenzae* üremesi için ise satellit fenomeninden (ekim bölgesini çaprazlayan *S. aureus* inokülasyonu) yararlanılabilir ya da X ve V faktör diskleri kullanılır.

NOT: KKA yerine insan kanlı agar kullanımı kesinlikle önerilmez!

- Çikolata agar - Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvarında da hazırlanabilir. Her üç meningeal patojen de bu besiyerinde ürer. X/V faktör (Isovitalex vb) içeren ticari besiyerleri de kullanılabilir.
- *Haemophilus* test medium (HTM) – antibiyotik duyarlılık testi için
- Triptik soya buyyon (TSB) veya beyin-kalp infüzyon buyyonu (BHI) – ticari kan kültürü şişesi mevcut değilse bu sıvı besiyerleri kullanılabilir.
- Biyotiplendirme için reaktifler – oksidaz reaktifi, Gram boya ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri, X, V ve XV diskleri veya *Staphylococcus aureus* suşu (bkz. "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- Serotiplendirme için antiserum(lar)
- Antimikrobiyal duyarlılık diskleri/stripleri

Diğer gereç, donanım

Besiyeri hazırlamak için

- Erlen (10 mL, 25 mL, 500 mL, 2 L)
- Manyetik karıştırıcı/ısıtıcı ve manyetik balıklar
- pH metre
- Petri kabı, steril, tek kullanımlık
- Pastör pipeti, steril pipetler; pipetleme ekipmanı
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Tüpler steril, vida kapaklı

Kültür, mikroskopi ve diğer testler için

- Biyogüvenlik kabini, sınıf-IIA
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (18).

- İnkübatör, 36°C, CO₂'li inkübatör veya mumlu jar
- Öze, steril, tek kullanımlık
- Rotator (opsiyonel)
- Santrifüj – 50 ml tüp santrifüjüne uygun
- Vorteks (tüp ataçmanlı)
- Zaman alarmı (timer)

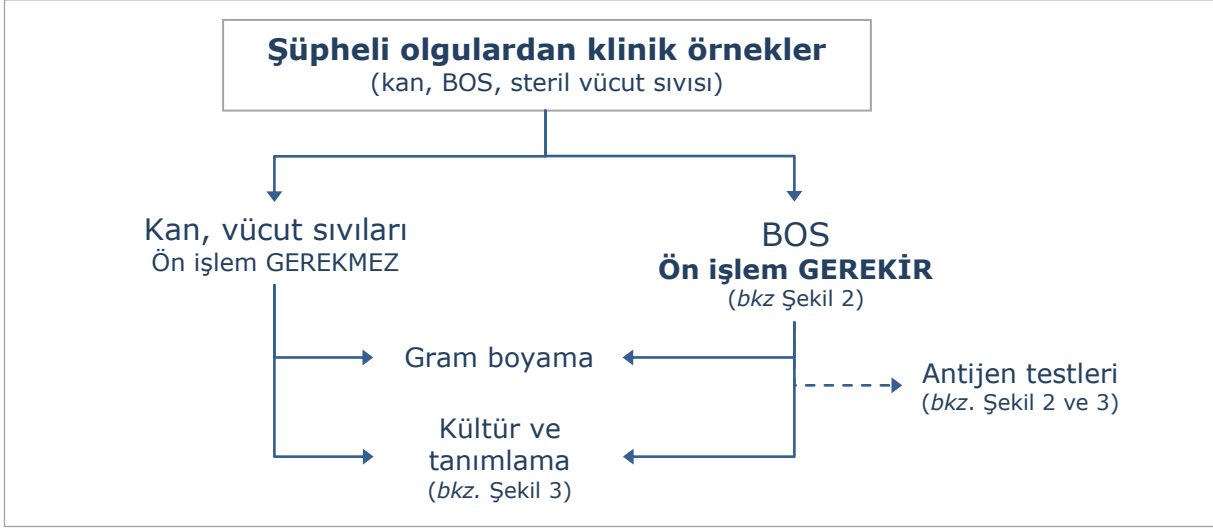
2.4. Kalite kontrol

- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır. Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarında standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.
 - (a) Sterilite kontrolü için; yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
 - (b) Üremenin kontrol edilmesinde *H.influenzae* ATCC 49247, *H.influenzae* ATCC 49766 suşları kullanılır.
- Kitler kullanılırken kontrol örnekleri de kitte verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır.
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kullanılan kitin/besiyerinin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.

3 *H. influenzae* tanısı için genel yaklaşım

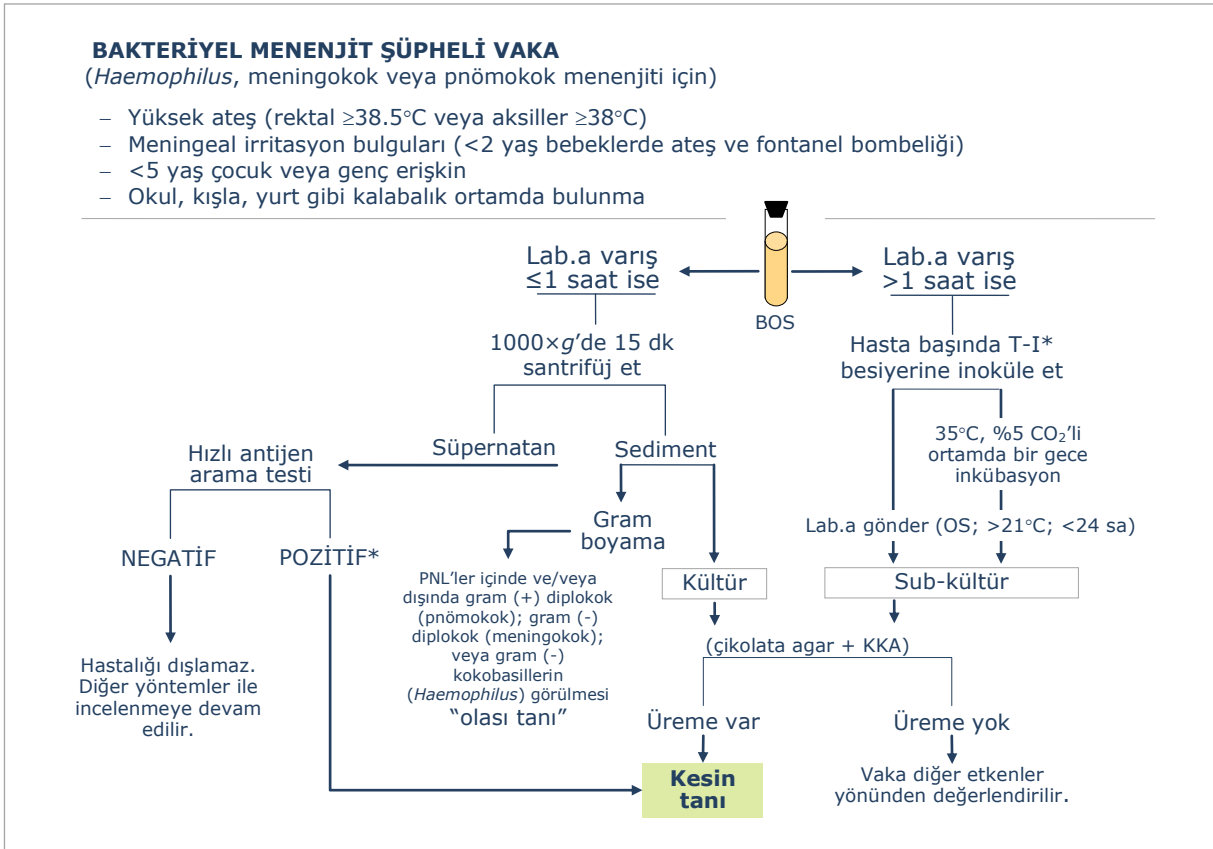
- *H.influenzae* invaziv enfeksiyonlarının tanısında başlıca kan ve BOS örnekleri kullanılır.
- Kan, BOS ve diğer klinik örneklerinin incelemeye alınmasında belli başlı adımlara ilişkin akış şeması Şekil 1'de verilmektedir.
- BOS örnekleri için ön işlem gerekirken kan kültürleri için ön işleme gerek yoktur (bkz. Şekil 1). BOS örneklerinin işlenmesi örnek miktarına göre değişiklik gösterir. BOS örneğinin işlenmesine ilişkin akış çizelgesi de Şekil 2'de verilmektedir.

3.1. *H.influenzae* şüphesinde laboratuvar iş akış şeması



Şekil 1. *H.influenzae* invaziv enfeksiyonu olasılığında klinik örneklerden mikrobiyolojik tanı için laboratuvarın genel iş akışı şeması

3.2. Bakteriyel menenjit tanısı için genel akış şeması



Şekil 2. Bakteriyel menenjit şüpheli vakanın BOS örneğinin laboratuvara iletilmesi, mikrobiyolojik incelemeler ve olası sonuçları için akış şeması (14 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

* Pozitif sonuç gerekirse diğer testlerle desteklenmelidir! OS, oda sıcaklığı; sa, saat; dk, dakika; Lab., laboratuvar

3.3. Örneklerin incelemeye hazırlanması

- Menenjit "acil" bir klinik durumdur. Şüpheli bir hastadan BOS örneği de klinik laboratuvarlar için "acil" örnek olarak tanımlanmaktadır. Örneğin bir an önce işleme alınması, etiyolojik ajanı saptamak üzere özgül mikrobiyolojik tanı sürecinin bir an önce başlatılması kuraldır (19).
- Bakteriyel menenjit şüphesinde patojen ajanın tanısı için öncelikle BOS (veya invaziv enfeksiyonda kan) örnekleri incelemeye alınır (3,20).
- Eğer gelen BOS örneği <1 mL ise santrifüj işlemi yapılmadan ve doğrudan KKA ve ÇA'ya inoküle edilir ve Gram boyama yapılır.
- Eğer gelen BOS örneği ≥1 mL ise boyama ve ekim işlemlerinin yoğunlaştırılmış örnekten yapılması duyarlılığı artırır. Bu nedenle BOS 1000 × g'de 15-20 dk santrifüj edilmelidir (20).
- Santrifüj sonunda supernatan kısmı Pastör pipeti ile alınır ve antijen saptama testleri için kullanılabilir.
- Çökelti kısmı ise kuvvetlice karıştırıldıktan sonra 1-2 damlasından Gram boyama (ve yeterli ise metilen mavisi ile) için yayma hazırlanır ve birer damla da KKA ve ÇA'ya inoküle edilir (20) (Şekil 2).

NOT: Özellikle menenjit şüphesinde BOS sedimentinden Gram boya ile birlikte mutlaka metilen mavisi boyama da yapılmalıdır. Gram boyama ile pembe-kırmızı boyanan ve genellikle pembe zeminde ayırt edilmesi güç olabilen *H. influenzae* gibi gram negatif organizmalar, metilen mavisi kullanılması halinde açık gri zeminde koyu mavi boyanmış hücreler şeklinde görüleceklerinden kolayca ayırt edilebilirler (21).

4 Örneklerin direkt incelenmesi

4.1. Boyalı yaymaların incelenmesi (Gram boyama)

- Santrifüj edilmiş BOS örneği çökeltisinin 1-2 damlası kullanılarak yayma hazırlanır ve Gram boya ile boyanır (bkz. UMS-B-TP-03). Diğer steril vücut sıvılarından da benzer şekilde yaymalar hazırlanmalıdır.
 - Santrifüj edilmemiş örnek kullanılacaksa temiz bir lamin üzerine bir damla BOS konup yaymadan kuruması beklenir.
- NOT: Örnekteki bakteri miktarının az olduğu tahmin ediliyorsa, kurumuş damlanın üzerine bir damla daha BOS eklenerek daha yoğun bir damla elde edilebilir ve bakteri görülme olasılığı artırılabilir.
- Pozitif ve negatif kalite kontrol örnekleri de Gram ile boyanmalıdır.
 - BOS'un Gram boyamasında polimorf nüveli lökositler ve pleomorfik gram negatif kokobasiller görülmesi *H. influenzae* menenjitli için olası tanı olarak değerlendirilir (bkz. Şekil 2 ve Şekil 3) (20).
 - BOS'un Gram boyalı yaymalarının incelenmesi bakteriyel menenjitli hastaların %60-90'ında organizmanın hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasına izin verir ve yaklaşık %100 bir özgüllüğe sahiptir (22).

- Gram boyamanın duyarlılığı BOS'ta bulunan bakteri yoğunluğu ile yakından ilişkilidir; eğer mililitrede 10^3 veya daha az bakteri mevcut ise Gram yaymaların ancak %25 kadarı pozitif bulunabilirken, bakteri yoğunluğu 10^5 ve daha fazla olduğunda pozitif sonuç elde edilen vakaların oranı %97'ye kadar yükselmektedir (22).
- Gram boyamanın klinik yararlılığı aynı zamanda bakteriyel patojene de bağlıdır: *S.pneumoniae*'ya bağlı menenjit vakalarının %90'ında, *H.influenzae* kaynaklı vakaların %86'sında, *N. meningitidis* ilişkili vakaların %75'inde, gram negatif basillerin neden olduğu vakaların ise %50'sinde BOS'un Gram yaymasında bakteriler gözlenirken bu oran *L. monocytogenes* menenjitli vakalarda %50'nin altındadır (22). Eğer antimikrobiyal tedavi başlanmış ise bakterinin Gram yaymasında görülme olasılığı da kültürden izolasyon oranı da hızla düşmektedir.
- Kısacası, bakteriyel menenjit şüphesinde BOS'un Gram yayması mutlaka incelenmelidir. Eğer mümkünse, bir BOS yayması da Loeffler'in metilen mavisi ile boyanmalıdır. Özellikle *H.influenzae* gibi Gram ile zayıf boyanabilen bakteriler BOS'un sıvısal ve hücresel matriksi içinde kolay ayırt edilemeyeceği için gözden kaçabilirler. Metilen mavisi bu olasılığı bertaraf etmek için iyi bir alternatiftir (21).
- İnflamatuvar hücrelerin varlığı tanısal değere sahip olduğundan (ör., fulminan, hızlı fatal hastalıkta; çok sayıda organizma ve az sayıda inflamatuvar hücre mevcuttur) klinisyene Gram boyamanın sonucunun yanında inflamatuvar hücrelerin niceliği hakkında da bilgi verilmelidir.

4.2. Antijen saptama testleri

- BOS örneklerinden antijen testleri diğer testlerle kombine edilmesi gereken testlerdir. Antijen testinin negatif bulunması hastalığı ekarte ettirmez; diğer laboratuvar incelemeleri yapılmalıdır. Pozitif test ampirik tedaviye erken başlanmasını sağlar.
- Örneklerin hemen çalışılması gereklidir. Çalışılmayacaksa 2-8°C de kısa süreli (saatler) ya da -20°C'de uzun süreli saklanabilir. Antijen testlerinin değerlendirilmesi Şekil 4'de izlenmektedir.

5 Kültür

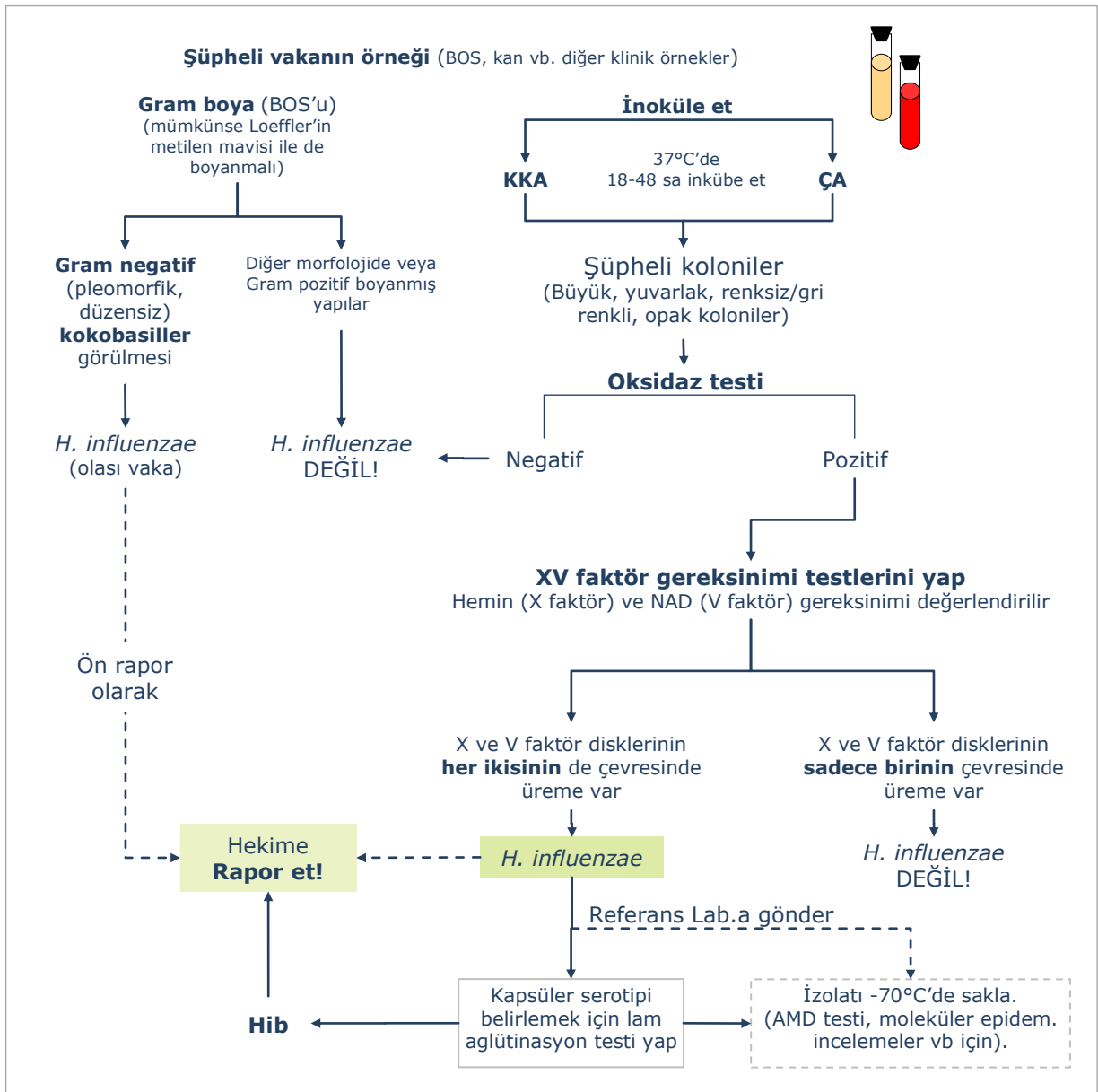
5.1. Prensiptir

- Kültürler için seçilen besiyerleri **ÇA** ve **KKA**'dır ve menenjit söz konusu ise potansiyel meningeal patojenlerin en büyük kısmının izolasyonunu sağlayabildikleri için tercih edilirler (3,20).
- ÇA (çikolata agar) her üç meningeal patojen de bu besiyerinde ürettiği için tercih edilir. Standart besiyeri at kanı ile hazırlanmış ÇA'dır ve özellikle *H.influenza* için X ve V faktörlerini temin eder.
- KKA ise özellikle triptik soya agar bazı veya benzeri zengin bir baz ile hazırlanmış olmalı ve %5 oranında koyun kanı veya at kanı içermelidir.

NOT: Bakteriyel menenjit etkenlerinin izolasyonunda kullanılacak kanlı agarda **kesinlikle** insan kanı kullanılması önerilmez! (inhibitörler içeriyor olabileceği için) (3,20).

- *N. meningitidis* ve *S.pneumoniae* KKA'da kolaylıkla ürerler.
- KKA'da *H. influenzae* üremesi için ise satellit fenomeninden (ekim bölgesini çaprazlayan *S.aureus* inokülasyonu) yararlanılabilir ya da X ve V faktör diskleri kullanılır.

5.2. Kültürden izolasyon ve tanımlama için akış şeması



Şekil 3. *Haemophilus influenzae* - kültürlerden izolasyon ve tanımlama basamakları (23 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

5.3. *H.influenza*'nın kültürlerden izolasyonu

Besiyerlerine ekimler

- BOS ve steril vücut bölgesi örnekleri ÇA ve KKA'ya inoküle edilir (bkz. Şekil 3). Örnek <1 mL ise doğrudan; ≥1 mL ise santrifüj edildikten sonra çökeltiden KKA ve ÇA'ya ekim yapılmalıdır (bkz. "3.3 Örneklerin incelemeye hazırlanması").
- Ekim plakları 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde 48 saate kadar inkübe edilmelidir.

NOT: Yüksek nem oranı inkübatörün tabanına geniş bir cam tepsi ile distile su konarak elde edilir. Tepsinin kuru kalmasına izin verilmemeli, düzenli aralarla kontrol edilerek su eklenmelidir.

- 18 saatten itibaren plaklar üreme varlığı açısından kontrol edilir. Bakteriyel menenjit şüpheli örneklerin KKA ve ÇA'daki ilk üremelerinin değerlendirilmesinde ön tanımlama için Tablo 1'den yararlanılabilir.
- ÇA'da konveks, düzgün yüzeyli, büyük, renksiz veya grimsi opak koloniler (Şekil 5) *H.influenzae* yönünden ileri incelemeye alınır.

NOT: KKA'da üreme yoktur. Ancak her ihtimale karşın eğer ilk ekim plaklarına satellit fenomeni için *S.aureus* inoküle edildiyse veya XV faktör dikleri konduysa *S.aureus* ekim çizgisi veya XV dikleri etrafında çok yüksek olasılıkla üreme gözlenmelidir (bkz. Şekil 6).

- Tanımlama için kolonilerden Gram boyanır ve Şekil 3'de verilen adımlar takip edilir.

Kan kültürleri veya diğer bifazik besiyerlerine ekimler

- BOS (ya da steril vücut sıvıları) şehirlerarası mesafeden geliyorsa T-I besiyeri içine alınmış ve taşınmış olması gerekir (ideal olarak oda sıcaklığında veya 35°C taşınabilir inkübatörde; %5-10 CO₂'li ortamda)
- Kan örnekleri ise *H.influenzae* şüphesinde;
 - (a) Ticari kan kültürü şişelerine veya TSB veya BHI kullanılarak hazırlanmış geleneksel bifazik –ve IsoVitaleX veya Vitox ile desteklenmiş- kan kültürü şişesine; veya
 - (b) IsoVitaleX ya da Vitox ile desteklenmiş bifazik T-I besiyerine alınmış ve gönderilmiş olabilir. Kan kültürü örnekleri eğer şehirlerarası mesafeden gönderiliyorlarsa ideal olarak oda sıcaklığında veya 35°C taşınabilir inkübatörde, %5-10 CO₂'li ortamda taşınmış olmalıdırlar.
- Ticari kan kültürü şişeleri kendi inkübatöründe, 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde inkübe edilirler.
- Bifazik geleneksel şişeler veya T-I şişeleri de 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde inkübe edilirler.
- Üreme bulgusu ticari otomatik kan kültürü sistemlerinde üreme sinyali ile, diğerlerinde bulanıklık ile değerlendirilir.
- Üreme gözlenen şişelerden hemen KKA ve ÇA pasajları yapılmalıdır. Bu pasajlardaki üremeler yukarıda tarif edildiği gibi ve Şekil 3'deki adımlar takip edilerek tanımlanırlar.



Şekil 4. BOS örneğinden direkt antijen saptama testi. Solda negatif, sağda ise pozitif reaksiyon izlenmektedir (3).

Tablo 1. Primer kültürlerden *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* ve *H. influenzae* için ön tanımlama kriterleri (20 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır.)

Üreme		Gram boyama	Ön tanımlama
ÇA'da	KKA'da		
+	+	Gram-negatif diplokoklar	<i>N. meningitidis</i>
+	+	Gram-positif diplokoklar	<i>S. pneumoniae</i>
+	-	Gram-negatif pleomorfik kokobasiller	<i>H. influenzae</i>



Şekil 5. *H.influenzae*'nin çikolata agardaki kolonileri.

http://panji1102.blogspot.com/2009_11_30_archive.html



Şekil 6. *H.influenzae*'nin stafilokok çizgi ekiminde satellit/uydu koloni şeklinde üremesi.

<http://www.studyblue.com/notes/note/n/tes/deck/2488362>

5.4. Tanımlama testleri

Gram boyama

- Üreme olan plaklardan yapılan Gram boyamada (UMS-B-TP-03) küçük, düzensiz yerleşimli, gram negatif basil ve kokobasiller görülür (Şekil 7).

Oksidaz testi

- *H.influenzae* tanısında Kovaks oksidaz testi UMS-B-TP-16 belgesinde tanımlandığı gibi yapılır. Oksidaz testinin negatif olması *H.influenzae*'yı dışlar. *H. influenzae* ile birlikte diğer *Haemophilus* türleri de pozitif reaksiyon verebilir (Şekil 8).
- Testin kalite kontrolü mutlaka yapılmalıdır.

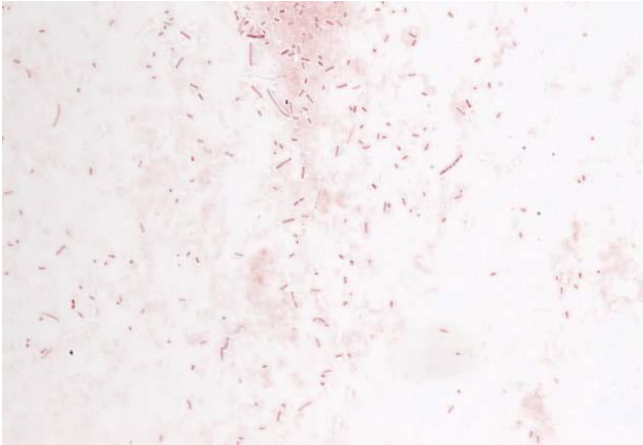
X ve V faktör gereksinimlerine göre tanımlama

- X faktör ve V faktör gereksinimlerinin değerlendirilmesi çalışması UMS-B-TP-23 belgesinde tanımlandığı gibi yapılır.
- *H. influenzae* diğer birçok *Haemophilus* türlerinden farklı olarak X ve V faktörlerinin ikisine birden gereksinim duyar (Şekil 8).
- *Haemophilus* türlerinin kanlı agardaki beta hemoliz özellikleri ile X faktör ve V faktör gereksinimlerine göre tanımlanması Tablo 2'de özetlenmektedir.

Bulguların değerlendirilmesi, yorumlanması

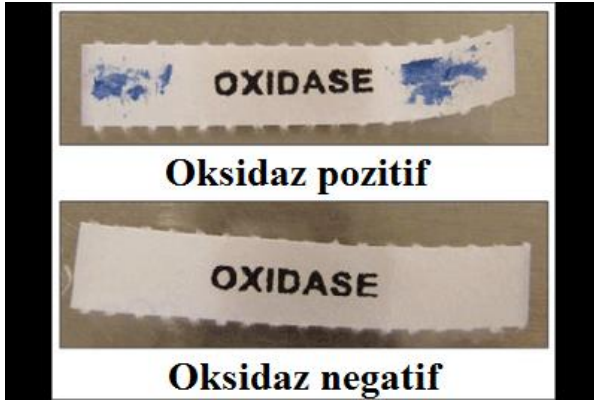
- Buraya kadarki adımlarda şüpheli kolonilerin incelenmesi sonucunda oksidaz pozitif ve üremek için hem X faktöre hem de V faktöre gereksini olan gram negatif basil/kokobasil görünümünde izolatlar *H.influenzae* olarak tanımlanırlar. İnvaziv enfeksiyonlu vakalar için bu aşamada bulgular "ön rapor" olarak hekime bildirilir.
- Ancak kesin tanı için mutlaka **serotiplendirme** yapılmalı ve "kesin rapor" ondan sonra verilmelidir!

ÖNEMLİ: Bu nedenle serotiplendirme yapamayan klinik laboratuvarlar mutlaka izolatlarını Referans laboratuvara göndermelidirler!

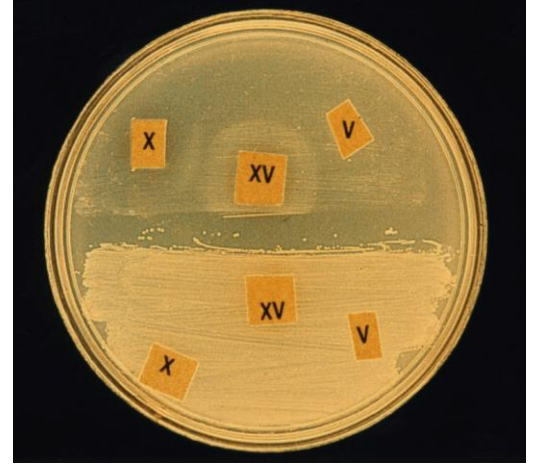


Şekil 7.

H.influenzae'nin Gram boyalı preparatta görünümü (23).



Şekil 8. Süzgeç kağıdında oksidaz pozitif ve negatif sonuçların görünümü (3,4).

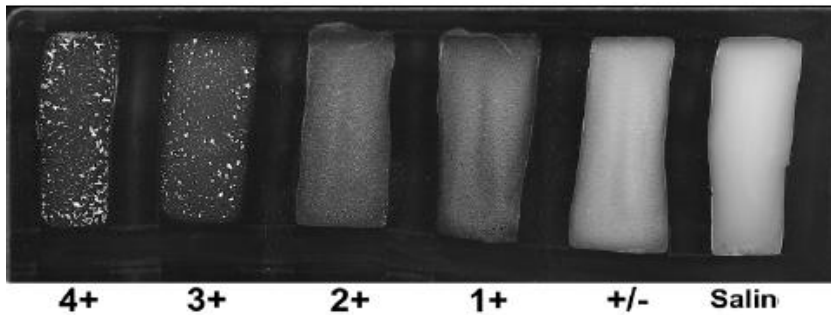


Şekil 9. Üreme faktörleri gereksinimi: agar plakta bakteri ekim alanlarının üzerine yerleştirilmiş X, V ve XV faktör diskleri. Üstteki izolat sadece XV diskinin etrafında üremiş olup *H. influenzae* ön tanısı konabilir (3,4).

Tablo 2. Üreme gereksinimlerine göre *Haemophilus* türlerinin tanımlanması (4).

Tür	X ve V Faktör gereksinimi		At veya tavşan kanlı agarda β -hemoliz
	X	V	
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i> *	-	+	-
<i>H. paraphrophilus</i> *	-	+	-

**H. paraphrophilus* ve *H. parainfluenzae* ornitin testi ile ayrılır; ilki negatif iken ikincisi pozitifdir.



Şekil 10. Lam aglütinasyon testinin değerlendirilmesi (23)

Serogruplandırma için lam aglütinasyon testi

- İzolatlardan ayrıca serotiplendirme yapılması gereklidir.
- *H.influenzae* kapsüller polisakkarid antijenlerine göre serogruplara ayrılır (testin yapılışı için bkz. Ek-1). Testler üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanır ve değerlendirilir. Ürüne göre uygulamanın değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.
- Test edilen izolatlar 2 dakika içerisinde 3+ veya daha büyük aglütinasyon reaksiyonu verirler (Şekil 10).
- Eğer klinik laboratuvar serotiplendirme yapamıyorsa izolat Referans laboratuvara gönderilmelidir.
- Serotiplendirme yapılırken tüm serotiplere ait antiserumların kullanılması gerekmez. Serotiplendirme akış diyagramına ülkede *H.influenzae* tip b aşılmasının yapıp yapılmadığına göre karar verilmelidir. Hib aşılması rutin uygulanıyorsa tüm serotipler için spesifik antiserumların test edilsini önerilir. Hib aşılması uygulanmayan popülasyonlarda *H.influenzae* invaziv enfeksiyonu şüphesinde aglütinasyona tip b antiserumu ile başlanır, negatif bulunması durumunda diğer antiserumlarla serotiplendirmeye devam edilir.
- Elde edilen izolat hiçbir antiserumla aglütinasyon vermiyorsa "tiplendirilemeyen" *H.influenzae* olabilir ya da *H.influenzae* tanımlaması yanlıştır. Tanımlama basamakları tekrar gözden geçirilir.

5.5.Antimikrobiyal duyarlılık

- Çoğunlukla *H.influenzae* için antimikrobiyal duyarlılık testi olarak **beta-laktamaz testinin** yapılması yeterlidir.
- β -laktamaz pozitif kökenler ampisilin ve amoksisiline dirençli kabul edilir, bu kökenlerin 128 mg/mL MIC değerleri olduğu kabul edilir. Başka bir ifade ile β -laktamaz testinin negatif bulunması süşun ampisiline duyarlı olduğu anlamına gelir. β -laktamazı negatif olup ampisilin dirençli olan kökenler olmakla beraber bu kökenler ile karşılaşılma oranlarının düşük olması nedeniyle rutin olarak test edilmeleri önerilmemektedir. Eğer yapılacaksa ampisilin disk difüzyon testi veya MIK testi yapılabilir (13).

β -laktamaz testi

- β -laktamaz testi hızlı sonuç verdiğiinden *H. influenzae* tanımlanır tanımlanmaz hemen çalışılmalıdır. Nitrosefin temelli β -laktamaz testi tercih edilmelidir. Testin kalite kontrolünde pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve negatif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanılır (8).
- Testin yapılışı için bkz. Ek-2.

Disk difüzyon testi

- Disk difüzyon testi için ideal besiyeri HTM besiyeridir. Plaklar 16-18 saat süreyle 35°C de %5-7 CO₂'li ortamda inkübe edilir.
- MIK değerleri için yine "HTM buyyon" kullanılır.

- HTM'nin kullanılamaması durumunda %3-5 oranında steril lize at kanı ve 10 mg/mL NAD eklenmiş Mueller-Hinton buyyon kullanılabilir (13).
- H. influenzae*'nin antimikrobiyal duyarlılığının araştırılmasında kullanılan diskler, disk içerikleri ve sonuçların yorumlanmasına yönelik CLSI kriterleri Tablo 3'de, EUCAST kriterleri ise Tablo 4'de özetlenmektedir.

Difüzyon gradient test

- Difüzyon gradient testler (ör., E-test) ile MIK değerlerinin saptanmasına ilişkin veri oldukça kısıtlıdır.

Tablo 3. *H. influenzae* için CLSI tarafından önerilen disk difüzyon zon çapları ile MIC değerlendirme standartları (24)

Antimikrobiyal Etken/Sınıf	Disk içeriği	Zon çapı (mm)			MIK değerlendirme standardı (µg/mL)		
		S	I	R	S	I	R
PENİSİLİNLER							
Ampisilin ¹	10 µg	≥ 22	19-21	≤ 18	≤ 1	2	≥ 4
SEFEMLER							
Sefotaksim ²	30 µg	≥ 26	-	-	≤ 2	-	-
Seftriakson ²	30 µg	≥ 26	-	-	≤ 2	-	-
FENİKOLLER							
Kloramfenikol	30 µg	≥ 29	26-28	≤ 25	≤ 2	4	≥ 8

¹ Çoğu vakada, ampisilin ve amoksisilin direnci direk beta laktamaz testi ile hızlı bir şekilde saptanabilir. Ampisilin ve amoksisiline dirençli *H. influenzae* izolatlarının çoğunluğu TEM tipi beta laktamaz üretir.

² Bazı antimikrobiyallere dirençli suşların olmayışı veya direncin seyrek gözlenmesi nedeniyle "duyarlı" dışındaki kategorilerin tanımlanması güçleşir.

Tablo 4. *H. influenzae* için EUCAST tarafından önerilen disk difüzyon zon çapları ile MIC değerlendirme standartları (25)

Antimikrobiyal Etken/Sınıf	Disk içeriği	Zon çapı (mm)		MIK değerlendirme standardı (µg/mL)	
		S	R	S	R
PENİSİLİNLER					
Ampisilin ^{1,2}	2 µg	≥16	≤16	≤1	>1
SEFEMLER					
Sefotaksim ³	5 µg	≥22	<22	≤0.125	-
Seftriakson ³	30 µg	≥27	<27	≤0.125	-
FENİKOLLER					
Kloramfenikol	30 µg	≥30	≤26	≤1	>2

¹ Beta laktamaz pozitif izolatlar, beta laktamaz inhibitörsüz penisilinlere karşı dirençli rapor edilir.

² Breakpoint'ler yalnızca beta laktamaz negatif kökenlerle ilişkilidir. Suşlar, penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklikler nedeniyle penisilinlere, aminopenisilinlere, sefolosporinlere ve/veya karbepenemlere dirençli olabilirler.

³ Bu antimikrobiyaller için klinik başarısızlık veya direnç rapor edilmemiştir.

5.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Menenjit veya invaziv enfeksiyon vakalarından izole edilen suşlar; ileri tanımlama, moleküler epidemiyolojik analiz ve antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları için Ulusal Referans Laboratuvara gönderilir (26).
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (27) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler. Dolayısı ile kısa ve uzun dönem saklama yöntemlerine ihtiyaç duyulur.

Kısa süreli saklama

- *H. influenzae* izolatlarının bir haftadan kısa süre ile korunması için vida kapaklı tüpte yatık ÇA'nın yatık kısmına ekim yapılır, %5 CO₂'li ortamda, 35°C'de bir gece inkübe edilir. Bu tüp 1 haftaya kadar, kapağı sıkıca kapalı halde (nem kaybı önlenerek) +4°C'de tutulabilir.
- İzolatlar, silika jel içeren paket veya tüp içinde +4°C'de 2 hafta, oda sıcaklığında daha kısa süre saklanabilirler.
- Dorset yatık taşıma besiyerinde ise; yatık kısma ekim yapıp, bir gece 35°C'de, %5CO₂'li ortamda inkübe edilir; oda sıcaklığında 3 hafta süre ile canlılıklarını korurlar.
- Bu ortamlar bilhassa izolatların Referans laboratuvara gönderilmesi süresince korunması sağlamak bakımından kullanışlıdır.

Uzun süreli koruma

- Uzun süreli saklama için *H. influenzae* izolatlarının steril 'skim-milk' ya da gliserol içeren sıvı besiyeri içinde yoğun süspansiyonu da yapılabilir (yöntem uygulaması için bkz. UMS, B-TP-01).
- Yoğun *H. influenzae* süspansiyonu -80°C derin dondurucuda veya daha düşük sıcaklıkta (likit nitrojen tankında, -120°C) yıllarca saklanabilir. Bir -20°C derin dondurucu da kullanılabilir; ancak canlılık kaybı hızlıdır ve birkaç hafta ya da aylık saklamalar için elverişli olabilir (26).
- Bazı laboratuvarlar izolatlarını liyofilize ederek saklayabilmektedirler. Liyofilizasyon için ise 'skim milk', serum temelli bir besiyeri veya polivinil-pirolidon kullanılır.
- Pozitif bulunan klinik örnekler de -80°C'de saklanmalıdır (26).

6 Tanıda diğer yöntemler

6.1. Moleküler yöntemler

- Tüm *H. influenzae*'larda bulunan ve bakterinin yüzey lipoproteini olan protein D 'yi kodlayan *hpd* geni oldukça korunan bir gen bölgesi olup tanıda birçok moleküler test için hedef bölge olarak kullanılmaktadır.

- Yakın zamanda geliştirilen ve valide edilen HPD gerçek zamanlı PCR testi *H.influenzae*'nin 6 serotipi (a-f) ve NTHi türler için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (13).

7 Raporlama ve bildirim

- **İnvaziv *H.influenzae* enfeksiyonlarında;** BOS, kan veya diğer steril vücut sıvılarının kültüründe etken bakterinin izolasyonu, steril vücut sıvılarında lateks aglütinasyon, immünelektroforez vb yöntemlerden biri ile özgül antijenlerin gösterilmesi, steril vücut sıvılarında nükleik asit saptama teknikleri ile özgül genetik materyalin saptanması "kesin tanı" koydurucudur (6,7).
- İnvaziv *H. influenzae* enfeksiyonlarının bildirimi zorunludur (6,7). Halk Sağlığı Müdürlüğüne bildirim yapılması gerekmektedir. Bildirim klinisyenin sorumluluğudur. Bununla birlikte (*laboratuvar*dan *bildirim* zorunlu olmasa da) pozitif sonuç elde edilir edilmez laboratuvarın ilgili birime haber vermesi (ör., telefon ile) önerilir.

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- *H.influnzae*, dış ortam koşullarına oldukça duyarlı bir bakteridir. Bu nedenle BOS örneği alınır alınmaz besiyerlerine ekilmesi gereklidir. Bu mümkün değilse BOS örneğinin mutlaka T-I besiyerine veya pediatrik kan kültür şişesine alınması gerekir.
- Bakteri, üremek için X ve V faktörlerine gereksinim duyar.
- Bakterinin en kısa sürede tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarının yapılması gerekir.

9 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,

Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı

Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı

Refik Saydam Yerleşkesi, Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr; e-posta: usypri@saglik.gov.tr

Tel: 0312 565 5508

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden bakteriyel menenjit etkenlerinin (*N.meningitidis*, *S.pneumoniae* ve *H.influenzae*) tanı, doğrulama, serotiplendirme ve moleküler epidemiyolojik tiplendirmelerinin yapılması; antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması; bölgesel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması.

Ekler

Ek-1 *H. influenzae* serogruplandırma testi

Materyal

Çikolata agara pasajlanmış 24 saatlik taze saf bakteri kültürü
Polivalan a,b,c,d,e,f antiserumu
Temiz lamlar
Steril cam tüpler
Steril pipet uçları
Steril %0.85 NaCl (SF)
McFarland No 3 bulanıklık standardı

Hazırlık

- 1 Tüm malzemeler oda ısısına gelmeleri için önceden buzdolabından çıkarılır.
- 2 Biyogüvenlik kabini en az 5 dk önceden çalıştırılır. Çalışılacak tüm malzemeler biyogüvenlik kabinine önceden yerleştirilir. Uygun KKD (önlük, eldiven) giyilir.
- 3 Steril bir cam tüpe 500 µL SF konulur ve taze pasajdan McFarland No 3 yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanır.
- 4 Lam alkol ile temizlenir ve cam kalemi ile 2 bölmeye ayrılır.

Testin yapılışı

- 1 Bölmelere 10'ar µL bakteri süspansiyonu konulur.
- 2 İlk bölmeye herhangi bir antiserum konulmaz.
- 3 İkinci bölmeye a,b,c,d,e,f polivalan antiserumundan 10 µL eklenir.
- 4 Lam bir dakika süreyle elde sürekli olarak hafif dairesel hareketlerle çevrilir.

Testin değerlendirilmesi

- 1 Bir dakika sonra aglütinasyon varlığı değerlendirilir.
- 2 Lamın ilk bölmesinde "otoaglütinasyon" gözlenmemelidir.
- 3 Lamın ikinci bölümünde aglütinasyon oluşması durumunda teste monovalan antiserumlar ile devam edilir.
- 4 Aglütinasyon bir antiserumla gerçekleşmelidir.
- 5 Sonuçlar aşağıdaki gibi yorumlanır ve kaydedilir:
 - 4+ %100 aglütinasyon (berrak ila hafif bulanık zemin)
 - 3+ %75 aglütinasyon (hafif bulanık zemin)
 - 2+ %50 aglütinasyon (orta derecede bulanık zemin)
 - 1+ %25 aglütinasyon (bulanık zemin)
 - Aglütinasyon yok

Kalite kontrol

Test edilen izolat ile birlikte daha önceden serogrubu belirlenmiş *Haemophilus* izolatları da teste alınır ve pozitif kontrol olarak kullanılır.

Sınırlılıklar

- 1 Otoaglutinasyon oluşuyorsa, kültür R tipi ve antijenik değerlendirme için uygun değil demektir.
- 2 Otoaglutinasyon varlığında ya da kalite kontrol suşu ile aglutinasyon olmaması halinde test tekrarlanmalıdır.
- 3 Her iki durumda da yeni pasaj yapılmalı ve aglutinasyon işlemi tekrarlanmalıdır.
- 4 Çeşitli antiserumlar ile birden fazla aglutinasyon gözlenmemelidir.
- 5 Herhangi bir antiserum ile aglutinasyon oluşmaması suşun serogruplandırılamayacağı anlamına gelir.
- 6 Test edilen izolat ve pozitif kontrol suşu ile +3 değerinde reaksiyon gözlenmelidir.
- 7 Negatif kontrol aglutinasyon göstermemelidir.

Ek-2 *H. influenzae* için β -laktamaz testi

Nitrosefin testi

Bu test β -laktamaz taraması için disk üzerine konan koloniye reaktif damlatılarak yapılır (4).

Testin yapılışı:

- 1 Nitrosefin diski steril forseps yardımıyla temiz bir lam üzerine konur; bir damla distile su eklenir.
- 2 Steril silgiç veya öze ile saf taze kültürden bir koloni alınır.
- 3 Silgiç veya öze ile alınan koloni nemlendirilmiş diske sürülür.
- 4 Renk değişimi açısından disk beş dakika süre ile gözlenir.
- 5 β -laktamaz üreten izolatları içeren disklerde karakteristik kırmızı/pembe renk değişimi gözlenir.

Modifiye asidometrik agar plak metodu

H. influenzae izolatlarının β -laktamaz aktivitelerinin araştırılması için kullanılan ayırt edici bir agar plak metodudur. Penisilin ve fenol kırmızısı besleyici özelliği olmayan bir agar plakta birleştirilir. β -laktam halkasının penisilinden ayrılması sonucu oluşan penisiloik asit ile ortamın asiditesi artar. Bu değişiklik pH indikatörünce saptanır ve agarda renk değişimi gözlenir (4).

Testin yapılışı:

- 1 β -laktamaz agar plağının farklı noktalarına *H. influenzae* kolonileri konur. Bir plakta aynı anda çok sayıda koloni test edilebilir. Kolonilerin doğru bir şekilde işaretlenmiş olmasına özen gösterilir.
- 2 β -laktamaz pozitif ve β -laktamaz negatif olduğu bilinen kontrol suşları da teste alınır.
- 3 Agar plaklar, 35°C'de 15 dakika inkübe edilir.
- 4 Agar plakları, koloniler etrafında renk değişimi olup olmaması açısından değerlendirilir.
- 5 Pozitif kontrol suşuna ait kolonilerin etrafındaki agar sarı renkte iken negatif kontrol suşu kolonilerini çevreleyen agarda herhangi bir renk değişimi gözlenmez.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (*Haemophilus influenza* İnvaziv Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-14	Loefflerin metilen mavisi
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, B-TP-23	X, V ve XV faktör gereksinimi (satellit fenomeni için)
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-04	MIK saptama yöntemleri
UMS, B-MT-03	<i>Neisseria meningitidis</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı (üreme destekleyici eklenmiş T-I besiyerinin hazırlanması için)
UMS, B-MT-05	<i>Streptococcus pneumoniae</i> invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Kilian M. *Haemophilus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 636–648.
- 2 Budak F. Yayılmacı *Haemophilus influenzae* hastalıklarının mekanizması. *Flora*. 2013;18(1):4-10.
- 3 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C et al. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella* serotype Typhi, *Shigella*, and *Vibrio cholera*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and World Health Organization (WHO), 2003.
- 4 Popovic T, Ajello G, Facklam R. Laboratory manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO/CDS/CSR/EDC/99.7; 1999
- 5 Ödek ve ark. *Haemophilus influenzae* tip b Aşılması Yapılan İki Çocukta İnvaziv *Haemophilus influenzae* Enfeksiyonları. *Çocuk Enf Derg* 2010; 4: 76-8.
- 6 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 7 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 8 CDC. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. 2nd edition. CDC and WHO, 2011.
<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/> (son erişim tarihi 25.12.2013).
- 9 Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 2000;13;302-317
- 10 <http://asicalismagrubu.org/d13.asp> (son erişim tarihi 25.12.2013).

- 11 <http://www.thsk.saglik.gov.tr/duyurular/etkinlikler/579-1-dunya-asi-haftasi.html>
- 12 *Haemophilus influenzae* diseases including Hib vaccine. <http://www.cdc.gov/hidisease/about/prevention.html> (son erişim tarihi 25.12.2013).
- 13 Ledebor NA, Doern GV. *Haemophilus*. In: Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 588-602.
- 14 CDC. Chapter 5. Collection and transport of clinical specimens. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC ve WHO, 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt05-collect-transport-specimens.html> (son erişim tarihi 03.03.2014).
- 15 Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberleri: Steril Vücut Sıvıları Örnekleri. KLİMUD, Ankara, 2013.
- 16 Başustaoğlu A. Kan kültürü Uygulama Kılavuzu. Ankara 2013.
- 17 Ajello GW, Feeley JC, Hayes PS et al. Trans-isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1984;20(1):55-8
- 18 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 19 York MK. Cerebrospinal fluid cultures. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007; p. 3.7.1 - 3.7.7
- 20 CDC. Chapter 6. Primary culture and presumptive identification of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC and WHO, 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt06-culture-id.html> (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 21 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). Introduction to microbiology Part I: guidelines to practice and management: Microscopic examination. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 15-26.
- 22 Tunkel AR, Scheld WM. Acute meningitis. Chapter 80 In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed., Churchill Livingstone. 2005.
- 23 CDC. Chapter 9: Identification and characterization of *Haemophilus influenza*. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC and WHO 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt09-id-characterization-hi.html> (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 24 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23. CLSI 2013.
- 25 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1. EUCAST 2013. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf (son erişim tarihi 06.01.14)
- 26 CDC. Chapter 14: Storage and shipping of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Second ed., CDC and WHO. 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt14-storage-shipping.html> (son erişim tarihi 06.01.14)
- 27 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Streptococcus pneumoniae **İnvaziv Enfeksiyonlarının** **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-05
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikler.....	5
Mikrobiyolojik Tanı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 İnvaziv pnömokokkal hastalık tanısı için genel yaklaşım	10
4 Örneklerin direkt incelenmesi	12
5 Kültür	14
6 Tanıda diğer yöntemler.....	20
7 Raporlama ve bildirim	21
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	21
9 Referans Laboratuvar	21
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	22
KAYNAKLAR.....	22

Kapsam ve Amaç

İnvaziv pnömokokkal hastalıklar başta pnömoni olmak üzere, bakteremi, menenjit ve diğer steril vücut bölgelerinin enfeksiyonu şeklinde ortaya çıkabilir. İnvaziv pnömokokkal hastalık dünyanın hemen her yerinde çocuk ve erişkinlerde ciddi seyreden hastalıkların başında gelmektedir. Etken *Streptococcus pneumoniae* (pnömokok) sağlıklı kişilerin üst solunum yolu florasında yaygın bulunan bir mikroorganizmadır.

Bakteriyel menenjitler dünya genelinde halen en önemli enfeksiyöz hastalıklardır. En sık rastlanan üç meningeal patojen olan *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* vakaların %80'den fazlasını oluşturur. Erken ve özgül tanı hasta yönetiminde ve hastalığın kontrolünde önemlidir. DSÖ bu bakteriyel patojenlerin neden olduğu menenjitlerin ya da invaziv hastalıkların dünya genelinde azaltılması ile ilgili yaygın program yürütmektedir (1,2). Ülkemizde de bu üç patojenin invaziv hastalıkları bildirim zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır (3,4).

Bazı klinik özellikleri ile olası etiyoloji akla getirilebilirse de bu hastalıkların kesin tanısı mikrobiyolojik incelemeye dayanır. "Tanı stratejisi"ni ise laboratuvara gelen klinik örneklerden bu üç patojen dâhil bütün olası bakterilerin yakalanabileceği ortak bir tanı akış şemasının izlenmesi oluşturur (1,5).

İnvaziv pnömokok hastalıklarının laboratuvar tanısında kullanılan geleneksel yöntem kültürdür. Antijen testleri ve nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin tanı değeri netlik kazanmamıştır. Tanı yöntemlerinin enfeksiyon bölgesine göre duyarlılığı da değişkendir.

Bu belge yöntemlerin invaziv pnömokok hastalıklarının kesin tanısındaki yerini güncel bilgilerle değerlendirmek, yöntem seçiminde dikkat edilmesi gereken unsurlara dikkat çekmek ve bildirim esas doğru ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için uygulama prosedürleriyle ilgili pratik bilgiler sunmak amacıyla hazırlanmıştır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- AMD** Antimikrobiyal duyarlılık (testi)
- ÇA** Çikolata agar
- Hib** *Haemophilus influenzae* tip b
- İPH** İnvaziv pnömokokkal hastalık
- KKA** %5 Koyun kanlı agar (NOT: Tanıda %5 at kanlı agar da kullanılabilir ve bu belgede her ikisi de KKA kısaltması ile geçmektedir.)
- MIK** Minimum inhibitör konsantrasyon
- T-I** Trans-Isolate (besiyeri). Bakteriyel menenjit olasılığında BOS örneklerinin uzun mesafeye taşınmasında hem taşıma hem de kültür ortamı olarak kullanılan bifazik besiyeri (yapılışı için bkz. UMS B-MT-03)

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

İnvaziv pnömokokkal hastalık terimi, pnömokokların neden olduğu pnömoni, menenjit, bakteriyemi ve diğer steril vücut bölgelerinin enfeksiyonlarını ifade eder (6,7).

Pnömokokkal **pnömoni**, ani başlayan ve titremeyeyle yükselen ateş, plöretik göğüs ağrısı, dispne, takipne, öksürük ve pürülan balgamla karakterizedir. Bebek ve küçük çocuklarda hastalık kendini ateş, kusma ve konvülsiyonla da gösterebilir. Yaşlılarda ise ateş, dispne ve bilinç durumundaki değişiklikler ilk bulgular olabilir. Hastalığın seyri esnasında olguların %25-30'unda bakteriyemi gelişebilir ve kan kültüründe *S.pneumoniae* bulunabilir (6,8). Bakteriyemide ortalama vaka-ölüm oranı %20 kadardır fakat özellikle yaşlı vakalarda %60 kadar yüksek olabilmektedir (6).

En sık saptanan toplum kaynaklı pnömoni etkeni olmasına rağmen, pnömokokkal pnömoninin mikrobiyolojik tanısı bazı güçlükler gösterir. Tanıda 'altın standart' kabul edilen kültürün duyarlılığı %65'dir. Hızlı ve doğru tanı öncelikle örneğin kalitesine bağlıdır (5,9).

Pnömokokkal **menenjit**, diğer akut bakteriyel menenjitler gibi ani yükselen ateş, letarji veya koma ve meningeal irritasyon bulguları ile karakterizedir. Bilinen risk gruplarının dışında, kohlear implantı veya baziler kırığı olan hastalar da invaziv pnömokokkal hastalık için yüksek risk grubundadırlar. *S.pneumoniae*; osteomyelit, septik artrit, endokardit, perikardit, peritonit veya neonatal invaziv enfeksiyonlara da neden olabilir (6,7).

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre her yıl 1.6 milyon insan İPH nedeniyle kaybedilmekte ve bunların yaklaşık 1 milyonunu, 5 yaşından küçük çocuklar oluşturmaktadır (9). Etkili bir konjugat aşısı bulunması nedeniyle, İPH aşısı ile önlenabilir enfeksiyonlar arasında yer almaktadır (10).

1980'lerin ortalarından itibaren önce penisiline sonra da çoklu ilaca dirençli pnömokokların saptanması, etkenin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanıp, duyarlılık testleriyle birlikte raporlanmasının önemini arttırmıştır. *S.pneumoniae*'nin giderek artan bu antibiyotik direnci nedeniyle, İPH'nin kontrolünde aşılara olan gereksinim ön plana çıkmıştır (7,10).

Türkiyede konjuge pnömokok aşısı 2008 yılında ulusal bağışıklama programına dahil edilmiş ve uygulanmaya başlanmıştır. Bu aşının İPH'leri önlemedeki başarısını belirleyebilmek gerektiğinden, sürveyans çalışmaları önem kazanmıştır. Ayrıca toplumumuzda yaygın serotiplerin belirlenmesi ile uygulanmakta olan aşı içeriklerine katkı sağlamak mümkün olabilir.

Mikroorganizmanın özellikleri

S.pneumoniae klinik örneklerde çoğunlukla hücre içi veya dışında Gram pozitif lanset şeklinde diplokoklar şeklinde görülür. Nadiren tek tek veya kısa zincirler şeklinde de olabilir.

S. pneumoniae güç üreyen bakterilerden olup 35-37°C ve %5 CO₂'li ortam (mumlu jar da olabilir) üremesi için optimum koşullardır. Koloni morfolojisini de gösterdiği için çoğunlukla kanlı agarda üretilmesi tercih edilir.

Kanlı agar plağında *S. pneumoniae* kolonileri alfa-hemolitik, küçük, gri renklidir ve yeni kültürlerde viridans streptokoklardan ayrılması zordur. 24-48 saatlik kültürlerde koloniler düzleşmeye ve ortası çökmeye başlar bu koloni morfolojisiyle viridans streptokoklardan ayrılabilir (Şekil 1).

Anaerob koşullarda ürediğinde -kapsül miktarına da bağlı olarak- daha büyük ve mukoid koloniler oluşturabilir.

Klinik özellikler

Pnömonokokkal **pnömoni**, ani başlayan ve titremeye yükselen ateş, plöretik göğüs ağrısı, dispne, takipne, öksürük ve pürülan balgamla karakterizedir. Bebek ve küçük çocuklarda hastalık kendini ateş, kusma ve konvülsiyonla da gösterebilir. Yaşlılarda ise ateş, dispne ve bilinç durumundaki değişiklikler ilk bulgular olabilir. Hastalığın seyri esnasında olguların %30'unun kan kültüründe *S. pneumoniae* bulunabilir (6).

Pnömonokokkal **menenjit**, diğer akut bakteriyel menenjitler gibi ani yükselen ateş, letarji veya koma ve meningeal irritasyon bulguları ile karakterizedir. Bilinen risk gruplarının dışında, kohlear implantı veya baziler kırığı olan hastalar da invaziv pnömonokokkal hastalık için yüksek risk grubundadırlar.

S. pneumoniae osteomyelit, septik artrit, endokardit, perikardit, peritonit veya neonatal invaziv enfeksiyonlara da neden olabilir. *S. pneumoniae* ayrıca akut otitis media, sinüzit, konjonktivit gibi çeşitli invaziv olmayan hastalıklara da neden olabilir. Akut otitis media en sık gözlenen pnömonokok enfeksiyonu olup, bu enfeksiyonu 6 yaşa kadar hemen her çocuğun geçirdiği tahmin edilmektedir (6,7).

Mikrobiyolojik Tanı

S. pneumoniae invaziv enfeksiyonlarının **kesin tanısı** steril vücut sıvılarından etkenin izolasyonuna dayanır. BOS ve diğer normalde steril vücut bölgelerinden klinik örneklerin direkt Gram boyaması tanıda yönlendiricidir, ancak, organizmanın boyalı preparatta görülebilmesi için BOS veya kanda hayli yüksek konsantrasyonda (yaklaşık 10⁴ bakteri/mL) olması gerekir (8).

Pnömonokoklar sıklıkla üst solunum yollarında hastalığa neden olmaksızın kolonize olabildiğinden steril olmayan vücut bölgelerinden (ör., balgam, konjonktiva) organizmayı izole etmenin klinik değeri şüphelidir. Böyle durumlarda balgam kültürlerinin değerlendirilmesine Gram boyama yardımcı olabilir; balgamın Gram yaymasında gram pozitif diplokokların üstünlüğü ile birlikte her mikroskop sahasında >25 lökosit ve <10 düz epitel hücresi gözlenmesi pnömonokokkal pnömoni tanısını destekler (7). Ancak bu tanı, **invaziv pnömonokokkal hastalık** vaka tanımına dahil etmek için yeterli değildir ve ulusal surveyanslar açısından bildirim esas olarak kabul edilmemektedir (3,7).

S. pneumoniae'nin mikrobiyolojik tanısında ayrıca pnömonokokkal kapsüler antijen saptama testleri ve moleküler yöntemler de kullanılabilir.

Kültür

Kültür tanıda 'altın standart'tır. Pnömonokoklar rutinde kullanılan KKA ve ÇA gibi besiyerlerinde kolay ürer. Üremek için özel atmosfer koşullarına veya besleyici faktörler ile zenginleştirilmiş besiyerine ihtiyaç göstermezler. Bakterinin izolasyonu gerçekleştiğinde, az sayıda fenotipik test ile tanımlanabilmesi bir avantajdır. Ayrıca kültür duyarlılık ve serotipleme işlemleri için de izolat elde edilmesini sağlaması ve sonucun kesin tanı kriteri olması nedeniyle gelişen test tekniklerine rağmen tanıda halen öncelikle tercih edilen yöntemdir (5,6,9).

Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi ve epidemiyolojik çalışmalar için de etkenin kültürlerden izolasyonu önem taşır. Kültürde üreyen pnömokok şüpheli kolonilere optokin duyarlılığı ve safrada erime testleri yapılarak bakteri tanımlanır (5,6,9).

Antijen testi

İnvaziv pnömokokkal hastalık tanısında bakterinin kapsüler antijenlerinin doğrudan steril vücut sıvılarında (idrar, BOS, serum vb.) aranmasına dayalı testler bulunmaktadır.

Bu testlerin tanı değeri enfeksiyon bölgesine ve konak özelliğine göre (yaş vb.) değişebilmektedir. Pozitif sonuçlar ampirik antimikrobiyal tedavisinin spektrumunu daraltacağı için önemlidir (6,5,9).

Moleküler yöntemler

S. pneumoniae'nin klinik örneklerde saptanması ve serotiplendirilmesi için PCR yöntemi kullanılabilir. Moleküler yöntemler kültür ile desteklenmelidir. Multipleks ve RT PCR yöntemleri için CDC kaynaklarından yararlanılabilir (5,11).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Streptococcus pneumoniae

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

S.pneumoniae Risk Grubu 2 organizmadır. Tüm laboratuvar işlemleri BGD2 laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler enfeksiyöz kabul edilmeli ve standart güvenlik önlemleri alınmalıdır. Menenjit veya invaziv enfeksiyon şüpheli örneklerden kültürler ve etkenin tanımlanması ile ilgili tüm laboratuvar işlemleri **sınıf-IIA biyogüvenlik kabini** içinde yapılmalıdır. Önlemler risk değerlendirmesi ile desteklenmelidir. BGD2 düzey, çalışma koşulları ve dikkat edilmesi gereken bütün konular için ayrıca *bkz.* "Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi".

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen menenjit veya invaziv pnömokokkal hastalıktan şüpheleniyorsa **kültür için** örnekleri laboratuvara göndermeden önce, laboratuvarın gerekli hazırlığı yapabilmesi için laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Bakteriyel menenjitlerde veya majör bakteriyel menenjit patojenlerinin (meningokok, pnömokok ve *H. influenzae*) neden olduğu invaziv hastalık tanısında hemen hemen aynı örneklerden belli bir akış şeması izlenerek tanıya gidildiği hatırlanmalıdır (12).

İnvaziv pnömokok hastalığı veya **menenjiti** tanısında örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden ve "Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberleri"nden edinilebilir (13). Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- BOS ve kan örnekleri tanıda ilk seçenektir. Plevra, perikard, peteşiyal aspirat ve eklem sıvısı incelenebilecek diğer örneklerdir.
ÖNEMLİ NOT: Bakteriyel menenjit veya invaziv enfeksiyon tanısı için alınan BOS, kan veya diğer klinik örnekler laboratuvarda işleme alınincaya kadar geçen süre boyunca oda sıcaklığında veya 35°C'de taşınmalı ve saklanmalıdır; kesinlikle buzdolabına konmamalıdır (1,12,). Ancak, pnömokokların **otolizin üretimi** nedeniyle örneklerin oda ısısında da uzun süre beklemesi sakıncalıdır!
- Kan - Kültür için aseptik koşullarda alınır; kan kültürü şişesine aktarılır ve yumuşakça çevrilerek karışması sağlanır. Kan kültürü örnek yönetimi için bkz. Kaynak 14.
- BOS - Alınabilen örnek miktarı sonraki işlemleri belirler. Laboratuvara hemen ulaşamayacaksa tüplerden birindeki BOS örneği (~1 ml) tercihen bifazik T-I besiyeri içeren şişeye; yoksa bir pediatrik kan kültür şişesine inoküle edilip gönderilmelidir.
- Steril vücut sıvısı örnekleri de BOS gibi işlem görmeli, örnek steril bir tüpe aktarılarak hemen laboratuvara gönderilmelidir. Bu mümkün değilse bifazik T-I besiyerine; T-I besiyeri yoksa bir pediatrik kan kültür şişesine aseptik dikkat edilerek inoküle edilir (13).
NOT: T-I, yatık agar ve sıvı olmak üzere iki fazlı bir besiyeridir (15). Hib şüphesi varsa örnek (BOS, kan, steril vücut sıvısı) Isovitalax veya Vitox eklenmiş şişelere (T-I, kan kültürü) aktarılmalıdır.

- Plevral sıvı ÇA veya ve triptikaz soya bazlı KKA'ya doğrudan ekilmelidir. Kan kültürü şişesine alınması önerilmez.
- Örnekler mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır.
- T-I veya kan kültürü şişelerine konan örnekler (pediatrik olanlar dâhil) bir gece 35°C'de inkübe edildikten sonra ve/veya 24 saat içinde oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılabilir. Taşıma esnasında örneklerin aşırı sıcaklık değerlerine (<18°C veya >37°C) maruz kalmasına kesinlikle izin verilmemelidir.
- Pnömonokoklar rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tanısı mümkün olan mikroorganizmalardır. Klinik örnekten bakterinin izolasyonu klinik mikrobiyoloji uzmanı olan tüm laboratuvarlarda yapılabilir. Ancak serotipleme veya moleküler testler için referans laboratuvarlara örnek göndermek gerekebilir. Örnekler referans laboratuvara gönderilecekse, uygun paketleme sağlanmalı ve yasal düzenlemelere uyulmalıdır (16).

Besiyeri / Reaktif

- KKA – Triptik soya agar baz ile hazırlanmış %5 koyun veya at kanlı agar idealdir. Piyasadan hazır temin edilebilir; laboratuvar da hazırlanabilir. *N. meningitidis* ve *S.pneumoniae* KKA'da ürerler. KKA'da Hib üremesi için ise satellit fenomeninden (ekim bölgesini çaprazlayan *Staphylococcus aureus* inokülasyonu) yararlanılabilir ya da X ve V faktör diskleri kullanılır.

NOT: KKA yerine insan kanlı agar kullanımı kesinlikle önerilmez!

- Çikolata agar - Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvar da hazırlanabilir. Her üç meningeal patojen de bu besiyerinde ürer. X/V faktör (Isovitalex vb) içeren ticari besiyerleri de kullanılabilir.
- *Haemophilus* test medium (HTM) – antibiyotik duyarlılık testi için
- Triptik soya buyyon (TSB) veya beyin-kalp infüzyon buyyonu (BHI) – ticari kan kültürü şişesi mevcut değilse bu sıvı besiyerleri kullanılabilir.
- Biyotiplendirme için – katalaz reaktifi, Gram boya ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri, optokin diski, safrada erime deneyi reaktifleri, X, V ve XV diskleri veya *S. aureus* suşu (bkz. "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- Serotiplendirme için pnömokok antiserumları
- Antimikrobiyal duyarlılık diskleri/stripleri

Diğer gereç, donanım

Besiyeri hazırlamak için

- Erlen (10 mL, 25 mL, 500 mL, 2 L)
- Manyetik karıştırıcı/ısıtıcı ve manyetik balıklar
- pH metre
- Petri kabı, steril, tek kullanımlık
- Pastör pipeti, steril pipetler; pipetleme ekipmanı
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Tüpler steril, vida kapaklı

Kültür, mikroskopi ve diğer testler için

- Biyogüvenlik kabini, sınıf-IIA
 - Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
 - Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
- NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (17).
- İnkübatör, 36°C, CO₂'li inkübatör veya mumlu jar
 - Öze, steril, tek kullanımlık
 - Rotator (opsiyonel)
 - Santrifüj – 50 ml tüp santrifüjüne uygun
 - Vorteks (tüp ataçmanlı)
 - Zaman alarmı (timer)

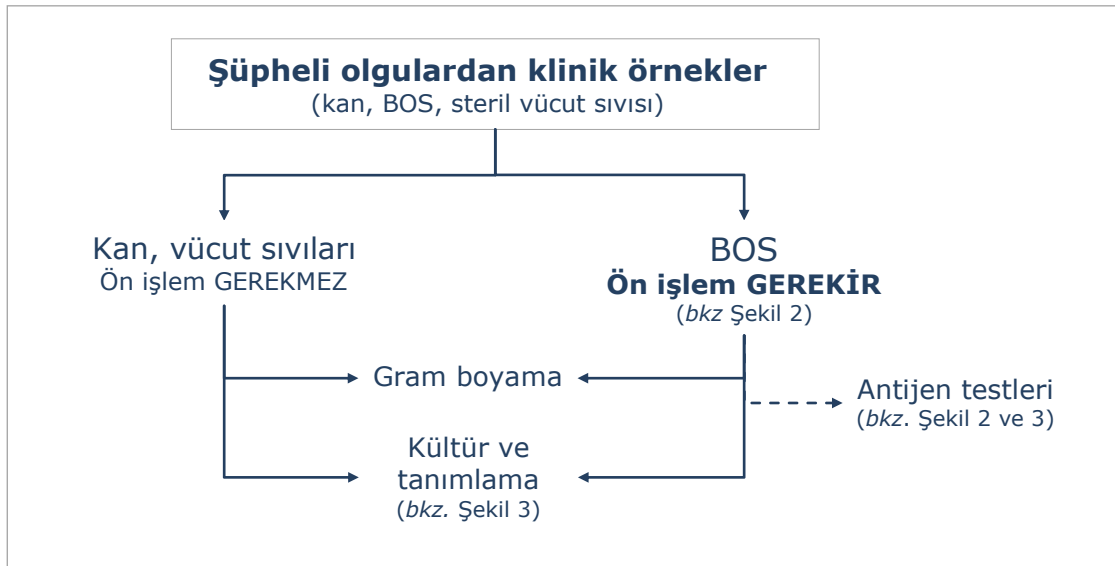
2.4. Kalite kontrol

- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır.
- Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarında standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.
 - (a) Sterilite kontrolü için; yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
 - (b) Üremenin kontrol edilmesinde *S. pneumoniae* ATCC 49619 kullanılır.
- Antimikrobiyal duyarlılık ve tanımlama testlerinde kalite kontrol izolatı olarak da *S. pneumoniae* ATCC 49619 kullanılır.
- Kitler kullanılırken kontrol örnekleri de kitte verilen prosedüre göre teste dâhil edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır.
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kullanılan kitin/besiyerinin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.

3 İnvaziv pnömokokkal hastalık tanısı için genel yaklaşım

- İnvaziv pnömokok enfeksiyonlarının tanısında başlıca kan ve BOS örnekleri kullanılır (18).
- Kan, BOS ve diğer klinik örneklerinin incelemeye alınmasında belli başlı adımlara ilişkin akış şeması Şekil 1’de verilmektedir.
- BOS örnekleri için ön işlem gerekirken kan kültürleri için ön işleme gerek yoktur (bkz. Şekil 1).
- BOS örneklerinin işlenmesi örnek miktarına göre değişiklik gösterir. BOS örneğinin işlenmesine ilişkin akış çizelgesi de Şekil 2’de verilmiştir.

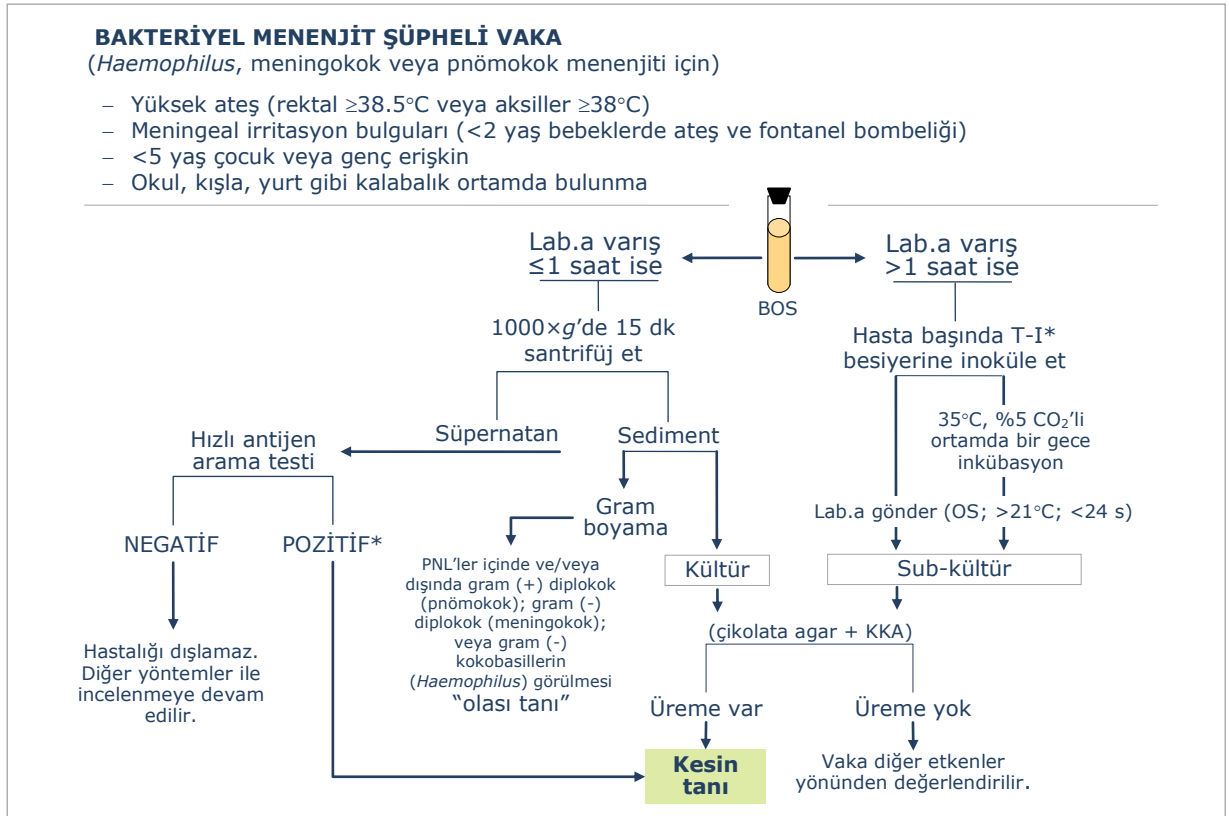
3.1. İPH şüphesinde laboratuvar iş akış şeması



Şekil 1. *S.pneumoniae* invaziv enfeksiyonu olasılığında klinik örneklerden mikrobiyolojik tanı için laboratuvarın genel iş akışı şeması

- Tanımlama testleri için saf kültürden çalışılması önemlidir. KKA’daki pnömokok şüpheli kolonilere Şekil 3’de özetlenen testler uygulanır.
- S. pneumoniae* şüpheli kolonilerin **tanımlanmasında** Gram boyama, katalaz ve optokin duyarlık testleri uygulanır; **doğrulama** için ise safrada erime deneyi kullanılır.
- Epidemiyolojik çalışmalar için serotipleme yapılabilir. Hem tanımlama hem de serotipleme için moleküler testler uygulanabilir. Serotipleme ve moleküler testler rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında tanı amacıyla kullanılacak testler olarak önerilmez. Bu testler daha çok Referans laboratuvarlarda veya araştırma laboratuvarlarında yapılması önerilen testlerdir (5,11).

3.2. Bakteriyel menenjit tanısı için genel akış şeması



Şekil 2. Bakteriyel menenjit şüpheli vakanın BOS örneğinin laboratuvara iletilmesi, mikrobiyolojik incelemeler ve olası sonuçları için akış şeması (12 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

* Pozitif sonuç gerekirse diğer testlerle desteklenmelidir!

OS, oda sıcaklığı; s, saat; dk, dakika; Lab., laboratuvar

3.3. Örneklerin incelemeye hazırlanması

- Menenjit "acil" bir klinik durumdur. Şüpheli bir hastadan BOS örneği de klinik laboratuvarlar için "acil" örnek olarak tanımlanmaktadır. Örneğin bir an önce işleme alınması, etiyolojik ajanı saptamak üzere özgül mikrobiyolojik tanı sürecinin bir an önce başlatılması kuraldır (19).
- Bakteriyel menenjit şüphesinde patojen ajanın tanısı için öncelikle BOS (veya invaziv enfeksiyonda kan) örnekleri incelemeye alınır (1,18,19).
- Eğer gelen BOS örneği <1 mL ise santrifüj işlemi yapılmadan ve doğrudan KKA ve ÇA'ya inoküle edilir ve Gram boyama yapılır.
- Eğer gelen BOS örneği ≥ 1 mL ise boyama ve ekim işlemlerinin yoğunlaştırılmış örnekten yapılması duyarlılığı artırır. Bu nedenle BOS $1000 \times g$ 'de 15-20 dk santrifüj edilmelidir (18).
- Santrifüj sonunda supernatan kısmı Pastör pipeti ile alınır ve antijen saptama testleri için kullanılabilir.
- Çökelti kısmı ise kuvvetlice karıştırıldıktan sonra 1-2 damlasından Gram boyama (ve yeterli ise metilen mavisi ile) için yayma hazırlanır ve birer damla da KKA ve ÇA'ya inoküle edilir (18) (Şekil 2 ve 3).

NOT: Özellikle menenjit şüphesinde BOS sedimentinden Gram boya ile birlikte mutlaka metilen mavisi boyama da yapılmalıdır. Gram boyama ile pembe-kırmızı boyanan ve genellikle pembe zeminde ayırt edilmesi güç olabilen *H. influenzae* gibi gram negatif organizmalar, metilen mavisi kullanılması halinde açık gri zeminde koyu mavi boyanmış hücreler şeklinde görüleceklerinden kolayca ayırt edilebilirler (20).

4 Örneklerin direkt incelenmesi

4.1. Boyalı yaymaların incelenmesi (Gram boyama)

- Santrifüj edilmiş BOS örneği çöktürülmesinin 1-2 damlası kullanılarak yayma hazırlanır ve Gram boya ile boyanır (bkz. UMS-B-TP-03). Diğer steril vücut sıvılarından da benzer şekilde yaymalar hazırlanmalıdır.
- Santrifüj edilmemiş örnek kullanılacaksa temiz bir lamın üzerine bir damla BOS konup yaymadan kuruması beklenir.
NOT: Eğer örnekteki bakteri yoğunluğunun düşük olduğu tahmin ediliyorsa, kurumuş damlanın üzerine bir damla daha BOS ilave edilerek daha yoğun bir damla elde edilebilir ve bakterilerin görülme olasılığı artırılabilir.
- Gram boyama işleminde pozitif ve negatif kalite kontrol örnekleri de kullanılmalıdır.
- BOS'un Gram boyamasında polimorf nüveli lökositler ve gram pozitif, lanset veya mum alevi şeklinde diplokoklar görülmesi *S.pneumoniae* menenjitisi için **olası tanı** olarak değerlendirilir (Şekil 4) (18).
- BOS'un Gram boyalı yaymalarının incelenmesi bakteriyel menenjitli hastaların %60-90'ında organizmanın hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasına izin verir ve yaklaşık %100 bir özgüllüğe sahiptir (21).
- Gram boyamanın duyarlılığı BOS'taki bakteri yoğunluğu ile yakından ilişkilidir; eğer mililitrede 10^3 veya daha az bakteri mevcut ise Gram yaymaların ancak %25 kadarı pozitif bulunabilirken, bakteri yoğunluğu 10^5 ve daha fazla olduğunda pozitif sonuç elde edilen vakaların oranı %97'ye kadar yükselmektedir (21).
- Gram boyamanın klinik yararlılığı aynı zamanda bakteriyel patojene de bağlıdır: *S.pneumoniae*'ya bağlı menenjit vakalarının %90'ında, *H.influenzae* kaynaklı vakaların %86'sında, *N. meningitidis* ilişkili vakaların %75'inde, gram negatif basillerin neden olduğu vakaların ise %50'sinde BOS'un Gram yaymasında bakteriler gözlenirken bu oran *L. monocytogenes* menenjitli vakalarda %50'nin altındadır (21). Eğer antimikrobiyal tedavi başlanmış ise bakterinin Gram yaymasında görülme olasılığı da kültürden izolasyon oranı da hızla düşmektedir.
- Kısacası, bakteriyel menenjit şüphesinde BOS'un Gram yayması mutlaka incelenmelidir. Eğer mümkünse, bir BOS yayması da Loeffler'in metilen mavisi ile boyanmalıdır. Özellikle *H.influenzae* gibi Gram ile zayıf boyanabilen bakteriler BOS'un sıvısal ve hücresel matriksi içinde kolay ayırt edilemeyeceği için gözden kaçabilirler. Metilen mavisi bu olasılığı bertaraf etmek için iyi bir alternatiftir.

- İnflamatuvar hücrelerin varlığı tanısal değere sahip olduğundan (ör., fulminan, hızlı fatal hastalıkta; çok sayıda organizma ve az sayıda inflamatuvar hücre mevcuttur) klinisyene Gram boyamanın sonucunun yanında inflamatuvar hücrelerin nicelliği hakkında da bilgi verilmelidir.
- Gram boyama yöntemiyle incelenen direkt mikroskopinin balgamda pnömokları saptama duyarlılığı ise %65 dolayındadır.
- Mikroskopide tipik görünümde bakterilerin görülmesi durumunda direkt inceleme raporuna "**pnömokok morfolojisinde**" ibaresi eklenmelidir. Ancak bakterinin antibiyotikle karşılaşması, boyama sırasında fazla renksizleştirme gibi durumlarda tipik görünüm saptanamayabilir ve bakteri yanlış bir şekilde gram negatif diplokok olarak raporlanabilir.
- Klinik örneklerde veya kültürdeki üremelerde pnömokokları göstermek için daha seyrek olarak **kapsül şişme reaksiyonu** da kullanılabilir (Şekil 5). Bu testin pnömokok için özgüllüğü oldukça yüksektir. Ancak diğer streptokoklarla çapraz reaksiyonlar olabilmektedir ve kapsülsüz pnömokoklar testin yalancı negatif olarak sonuçlanmasına neden olabilir (5,9).

4.2. Antijen saptama testleri

- Vücut sıvılarında pnömokok antijenlerini saptayan hızlı ticari testler mevcuttur. Bunlar lateks aglütinasyon ve immunokromotografik temele dayalı testlerdir. Örneklerin hemen çalışılması gereklidir. Çalışılmayacaksa 2-8°C de kısa süreli (saatler) ya da -20°C'de uzun süreli saklanabilir. Testler üretici firmanın talimatına göre kullanılır.
- Antijen testleri diğer testlerle kombine edilmesi gereken testlerdir.
- Özellikle çocuklarda nazofarinks taşıyıcılığı nedeniyle üriner antijen testinin yalancı pozitiflikleri söz konusudur. Ayrıca yetişkinde ve çocukta aşılama ya bağlı yalancı pozitiflik saptanabilir.
- Antijen testinin negatif bulunması hastalığı ekarte ettirmez. Bu nedenle diğer laboratuvar incelemeleri mutlaka yapılmalıdır. Pozitif test ampirik tedaviye dar spektrumlu antibiyotikle erken başlanmasını sağlar (5,9).

BOS'da antijen testi

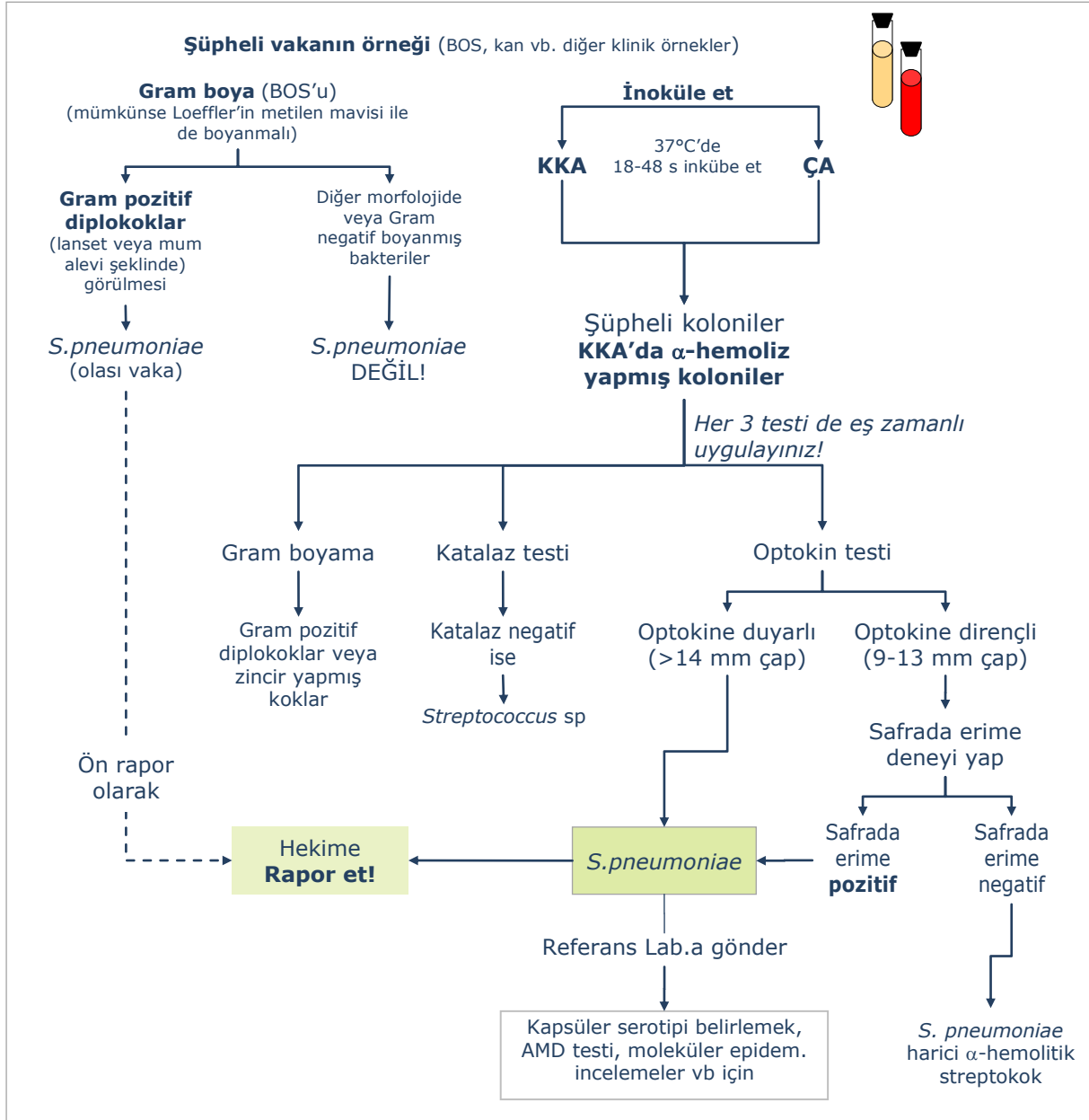
- Hızlı antijen arama kiti ile BOS veya diğer normal steril bir vücut sıvısında pnömokok antijeninin pozitif bulunması "kesin tanı" bulgusudur. Lateks aglütinasyon testinin pozitifliği BOS da Gram boya sonucu ile doğrudan ilişkilidir. İmmünokromatografik testin duyarlılığı daha yüksektir.

İdrarda (üriner) antijen testi

- Yalancı pozitiflik özellikle idrar örneklerinde sıktır. İdrarda antijen testi 6 yaşından küçük çocuklarda (özellikle bebeklerde) semptomsuz pnömokok antijenürisi olabileceğinden dolayı önerilmez, kullanılmaz!
- Erişkinlerde, geleneksel kültür yöntemlerine ek olarak ve özellikle kültür yapılmadan antimikrobiyal tedaviye başlanmış olanlarda üriner antijen testinin pozitifliği tanı için önemli bir ipucudur. Ancak kesin tanı kriteri değildir.

5 Kültür

5.1. Kültürden izolasyon ve tanımlama için akış şeması



Şekil 3. *S.pneumoniae* - kültürlerden izolasyon ve tanımlama basamakları (22 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır).

5.2. Prensiy

- Kültürler için seçilen besiyerleri **ÇA** ve **KKA**'dır ve menenjit söz konusu ise potansiyel meningeal patojenlerin en büyük kısmının izolasyonunu sağlayabildikleri için tercih edilirler (18).

- ÇA (çikolata agar) her üç meningeal patojen de bu besiyerinde ürediği için tercih edilir. Standart besiyeri at kanı ile hazırlanmış ÇA'dır ve özellikle *H. influenza* için X ve V faktör gereksinimini karşılar.
- KKA ise özellikle triptik soya agar bazı veya benzeri zengin bir baz ile hazırlanmış olmalı ve %5 oranında koyun kanı veya at kanı içermelidir.
NOT: Bakteriyel menenjit etkenlerinin izolasyonunda kullanılacak kanlı agarda **kesinlikle** insan kanı kullanılması önerilmez! (inhibitörler içeriyor olabileceği için) (18).
- *N. meningitidis* ve *S. pneumoniae* KKA'da kolaylıkla ürerler.
- KKA'da Hib üremesi için ise satellit fenomeninden (ekim bölgesini çaprazlayan *S. aureus* inokülasyonu) yararlanılabilir ya da X ve V faktör diskleri kullanılır.

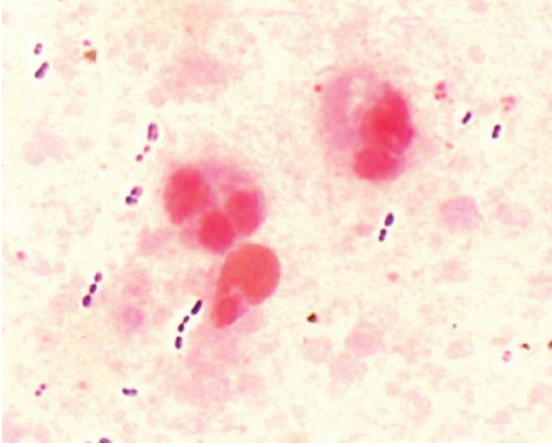
5.3. *S. pneumoniae*'nin kültürlerden izolasyonu

Besiyerlerine ekimler

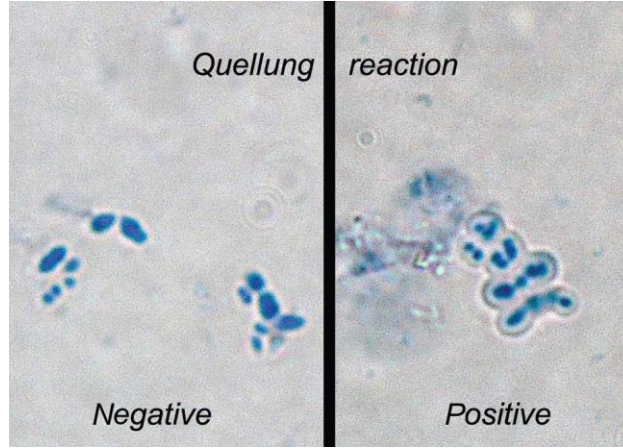
- BOS ve steril vücut bölgesi örnekleri ÇA ve KKA'ya inoküle edilir (bkz. Şekil 3). Örnek <1 mL ise doğrudan; ≥1 mL ise santrifüj edildikten sonra çökeltiden KKA ve ÇA'ya ekim yapılmalıdır (bkz. "3.3 Örneklerin incelemeye hazırlanması") (18).
- Ekim plakları 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde 48 saate kadar inkübe edilmelidir.
NOT: Yüksek nem oranı inkübatörün tabanına geniş bir cam tepsi ile distile su konarak elde edilir. Tepsinin kuru kalmasına izin verilmemeli, düzenli aralarla kontrol edilerek su eklenmelidir.
- 18 saatten itibaren plaklar üreme varlığı açısından kontrol edilir. Bakteriyel menenjit şüpheli örneklerin KKA ve ÇA'daki ilk üremelerinin değerlendirilmesinde ön tanımlama için Tablo 1'den yararlanılabilir.
- KKA'da α-hemoliz yapmış (uzamış inkübasyonda ortası çökük görünümlü) koloniler *S. pneumoniae* yönünden **ileri incelemeye** alınır (koloni görünümü için bkz. Şekil 6 ve 7).
- Tanımlama için kolonilerden Gram boyanır ve Şekil 3'de verilen adımlar takip edilir.

Tablo 1. Primer kültürlerden *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* ve *H. influenzae* için ön tanımlama kriterleri (18).

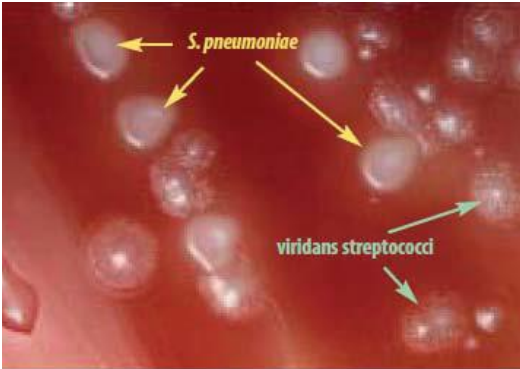
Üreme		Gram boyama	Ön tanımlama
ÇA'da	KKA'da		
+	+	Gram-negatif diplokoklar	<i>N. meningitidis</i>
+	+	Gram-positif diplokoklar	<i>S. pneumoniae</i>
+	-	Gram-negatif pleomorfik kokobasiller	<i>H. influenzae</i>



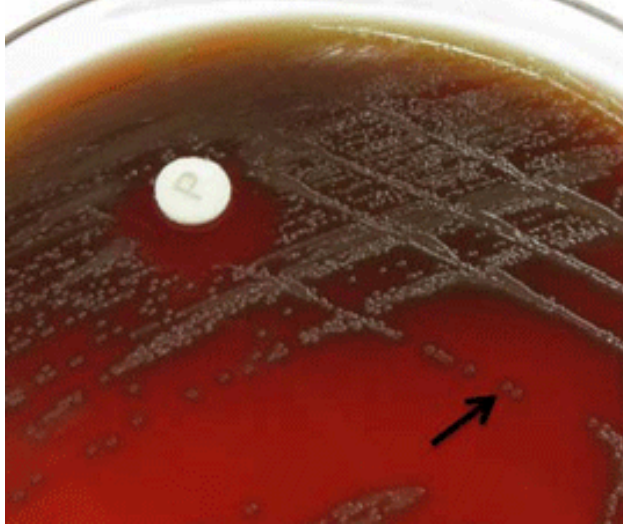
Şekil 4. Gram boyalı BOS yaymasında gram pozitif diplokoklar (18).



Şekil 5. Kapsül şişme reaksiyonu (18)



Şekil 6. Pnömonokok ve viridans streptokok kolonilerinin kanlı agarda görünümü (18)



Şekil 7. α -hemoliz yapmış pnömokok kolonilerinin kanlı agarda görünümü (18)

Kan kültürleri veya diğer bifazik besiyerlerine ekimler

- BOS (ya da steril vücut sıvıları) şehirlerarası mesafeden geliyorsa T-I besiyeri içine alınmış ve taşınmış olması gerekir (ideal olarak oda sıcaklığında veya 35°C taşınabilir inkübatörde; %5-10 CO₂'li ortamda)
- Kan örnekleri ise;
 - (a) Ticari kan kültürü şişelerine; veya
 - (b) TSB veya BHI kullanılarak hazırlanmış geleneksel bifazik kan kültürü şişelerine; veya
 - (c) Bifazik T-I besiyerlerine

alınmış ve gönderilmiş olabilir. Kan kültürü örnekleri eğer şehirlerarası mesafeden gönderiliyorsa ideal olarak oda sıcaklığında veya 35°C taşınabilir inkübatörde, %5-10 CO₂'li ortamda taşınmış olmalıdırlar.

NOT 1: Hib olasılığı için kan kültürü şişelerinin IsoVitaleX ya da Vitox ile desteklenmesi gereği hatırlanmalıdır.

NOT 2: BOS örneğinin rutin besiyerlerine (KKA, ÇA) direkt ekilmiş kültürlerinde pnömokoklar ürerler. Ancak pediatrik kan kültürü veya T-I şişeleri kullanılmış ise izolasyon oranı yükselmektedir (5,9).

NOT 3: Pnömokok otolizinleri, geleneksel yöntemlerle yapılan kan kültürlerinde bakterinin üretilmesini zorlaştırır. Antibiyotik kullanımı ve aralıklı bakteriyemilerde de izolasyon oranları düşer (5,9).

- Ticari kan kültürü şişeleri kendi inkübatöründe, 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde inkübe edilirler.
- Bifazik geleneksel şişeler veya T-I şişeleri de 35°C'da, %5-10 CO₂'li ve yüksek nem oranına sahip atmosferde inkübe edilirler.
- Üreme bulgusu ticari otomatik kan kültürü sistemlerinde üreme sinyali ile, diğerlerinde bulanıklık ile değerlendirilir.
- Üreme gözlenen şişelerden hemen KKA ve ÇA pasajları yapılmalıdır. Bu pasajlardaki üremeler yukarıda tarif edildiği gibi ve Şekil 3'deki adımlar takip edilerek tanımlanırlar.

5.4. Tanımlama testleri

- Örneklerin ilk ekim plakları veya kan kültürü (ya da T-I) şişelerinden yapılmış KKA pasajlarında α-hemolitik koloniler görülmesini takiben hemen ilk tanımlama testleri (Gram boyama, katalaz testi ve optokin duyarlılık testi) uygulanır (Şekil 3) (22).

Gram boyama

- Koloniden Gram boyalı preparatlarda gram pozitif diplokoklar veya kısa zincir oluşturan koklar görülmesi beklenir (bkz. UMS-B-TP-03).

Katalaz testi

- Katalaz testi gram pozitif kokların ayırımında (streptokok ve enterokok cinslerini stafilokoklardan ayırmak için) ilk basamak testidir. Pnömokoklar katalaz negatiftir. (Prosedür için bkz. UMS-B-TP-10).

Optokin testi

- Optokin (etil hidrokuprein hidroklorid) maddesine duyarlılık testi pnömokokların tanımlanmasında ilk basamak testidir. Genel olarak ise α-hemolitik streptokokların tanımlamasında kullanılır.
- *S.pneumoniae* izolatları optokine duyarlıdır.
- Kanlı agara yayma ekim yapıldıktan sonra üzerine optokin diski konur ve 35°C de 18-24 saat inkübasyon sonunda >14 mm inhibisyon zonu görülmesi izolataın *S. pneumoniae* olduğunun kanıtıdır (ayrıntılı bilgi ve testin yapılışı için bkz. UMS-B-TP-18).

- Viridans streptokoklarda zon oluşmaz.
- *S. pseudopneumoniae* olarak isimlendirilen bazı izolatlar optokin testinin değerlendirilmesini zorlaştırmıştır. Bu izolatlar artan CO₂ konsantrasyonunda inkübe edildiklerinde optokine dirençli, normal atmosfer koşullarında ise duyarlı saptanabilirler. Bu nedenle optokin testinin %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmesi ve tüm şüpheli izolatlar için **doğrulama testi** olarak safrada erime testinin yapılması önerilir (5,9).
- Mevcut moleküler testler ile *S.pneumoniae* ve *S.pseudopneumoniae* ayrımı yapmak mümkün değildir. Patojen olma potansiyeli ile ilgili bilgiler net olmamakla birlikte *S. pneumoniae* tanımlamasının doğru yapılabilmesi adına bu izolatlardan ayrımı önemlidir.
- *S. pneumoniae* izolatları arasında da %10'a ulaşan oranlarda optokine direnç bildirilmiştir. Ancak diğer α -hemolitik streptokokların tamamı dirençlidir. Bu nedenle duyarlı izolatlar pnömokok olarak tanımlanabilir.
- Optokine duyarlılığı azalmış olan izolatlar için **safrada erime testi** yapılmalıdır (23,24).

Safrada erime testi

- Safrada (sodyum dezoksikolat) erime özelliği *S. pneumoniae*'yı diğer α -hemolitik streptokokların tamamından ayırır.
- Sodyum dezoksikolat (%2) pnömokok hücre duvarını eritir. *S.pneumoniae* safrada erirken, diğer α -hemolitiklerin hepsi dirençlidir (ayrıntılı bilgi ve testin yapılışı için bkz. UMS-B-TP-20).

Ticari tanımlama kitleri

- Gram pozitif kokların tanımlamasında kullanılan tam veya yarı otomatize bakteri tanımlama kitleri mevcuttur.

Lam aglütinasyon testi

- Kanlı agardaki koloniden *S.pneumoniae* tanımlaması yapılmasında kullanılan bazı ticari kitler mevcuttur. Bu tanımlama kitleri, *S.pneumoniae* kapsül antijenlerine özgü tavşan antiserumlarıyla kaplı lateks partiküllerinin süspansiyonu şeklindedir.
- Uzun süre stoklanan kitler çapraz reaksiyonlar nedeniyle diğer streptokoklarla da pozitif sonuç verebileceği için kalite kontrol izolatı olarak pnömokok dışı bir α -hemolitik streptokok izolatı da mutlaka kullanılmalıdır (5,24).

Bulguların değerlendirilmesi, yorumlanması

- Buraya kadarki adımlarda şüpheli kolonilerin incelenmesi sonucunda
 - (a) KKA'da α -hemoliz yapmış
 - (b) gram pozitif diplokoklar veya zincirler şeklinde
 - (c) katalaz negatif
 - (d) optokine duyarlıizolatlar *S. pneumoniae* olarak tanımlanırlar.

- İnvaziv enfeksiyonlu vakalar için bu bulgularla sonuç “kesin rapor” olarak hekime bildirilir. Çünkü kan, BOS veya steril vücut sıvılarının kültüründe *S.pneumoniae* üremesi invaziv pnömokok hastalığı için “**kesin tanı**” bulgusudur.
- Pnömokoklar nadiren septisemi etkeni olarak saptanırlar. Ancak pnömokok pnömonisi ve pnömokok menenjitinde kandan izole edilebilirler. Bu nedenle kan kültüründe *S.pneumoniae* izole edilmesi “kesin tanı” bulgusudur.
- İzolatlardan ayrıca epidemiyolojik amaçlar için **serotiplendirme** yapılmalı ve mutlaka antibiyotik duyarlılıkları test edilmelidir. Bu nedenle bu testleri yapamayan klinik laboratuvarlar mutlaka izolatlarını Referans laboratuvara göndermelidirler!

Pnömokok serotiplendirmesi

- Serotiplerin belirlenmesi rutin tanı laboratuvarlarında sık yapılabilen bir işlem olmayıp, özellikle sürveyans amaçları için gereklidir. Bu nedenle serotiplendirme işlemi ulusal Referans laboratuvarında uygulanmaktadır.
- Testin yapılışı *H. influenzae* serogruplandırma testine benzer (bkz. UMS-B-MT-04).
- *S. pneumoniae*’nin kapsül polisakkarit antijenlerine göre 90’dan fazla serotipi olduğu bilinmektedir. Pnömokokların serotiplendirmesinde altın standart “kapsül şişme reaksiyonu”dur.
- Moleküler yöntemlerin sadece aşı kapsamındaki serotipleri belirlemesi ve bazı durumlarda çapraz reaksiyona yol açması dezavantajdır.

5.5. Antimikrobiyal duyarlılık testi

- *S.pneumoniae* antimikrobiyal duyarlılık testi için bkz. UMS-AMD-MT-03.

5.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Menenjit veya invaziv enfeksiyon vakalarından izole edilen suşlar; ileri tanımlama, serotiplendirme moleküler epidemiyolojik analiz ve antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları için Ulusal Referans Laboratuvara gönderilir (25).
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (26) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler. Dolayısı ile kısa ve uzun dönem saklama yöntemlerine ihtiyaç duyulur.

Kısa süreli saklama

- *S. pneumoniae* izolatlarının kısa süreli korunması için vida kapaklı tüpte yatık ÇA’nın yatık kısmına ekim yapılır, %5 CO₂’li ortamda, 35°C’de bir gece inkübe edilir. Ardından 1 haftaya kadar, kapağı sıkıca kapalı olarak (nem kaybı önlenerek) buzdolabında tutulabilir.

- İzolatlar, silika jel içeren paket veya tüp içinde +4°C'de 2 hafta, oda sıcaklığında daha kısa süre saklanabilirler.
- Dorset yatık taşıma besiyerinde ise; yatık kısma ekim yapıp, bir gece 35°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilir; oda sıcaklığında 3 hafta süre ile canlılıklarını korurlar.
- Bu ortamlar bilhassa izolatların Referans laboratuvara gönderilmesi süresince korunması sağlamak bakımından kullanışlıdır.

Uzun süreli koruma

- Uzun süreli saklama için *S. pneumoniae* izolatlarının steril 'skim-milk' ya da gliserol içeren besiyeri içinde yoğun süspansiyonu da yapılabilir (yöntem uygulaması için bkz. UMS, B-TP-01).
- Yoğun *S. pneumoniae* süspansiyonu -80°C dondurucuda veya daha düşük sıcaklıkta (likit nitrojen tankında, -120°C) yıllarca saklanabilir. Bir -20°C derin dondurucu da kullanılabilir; ancak canlılık kaybı hızlıdır ve birkaç hafta ya da aylık saklamalar için elverişli olabilir (25).
- Bazı laboratuvarlar izolatlarını liyofilize ederek saklayabilmektedirler. Liyofilizasyon için ise 'skim-milk', serum temelli bir besiyeri veya polivinil-pirolidon kullanılır.
- Pozitif bulunan klinik örnekler de -80°C'de saklanmalıdır (25).

6 Tanıda diğer yöntemler

- Nükleik asit temelli testlerin, kültüre göre avantajları; kısa sürede sonuçlanmaları, antibiyotik kullanımından etkilenmemeleri ve az miktardaki mikroorganizmaları saptayabilmeleridir.
- Steril vücut sıvılarında pnömokok nükleik asitlerinin pozitif bulunması invaziv pnömokok hastalık (İPH) için "kesin tanı" bulgusudur.
- Ancak nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin İPH tanısındaki performansı oldukça değişkendir.
- Pnömonili hastalarda, kanda pnömokok saptamak için yapılan PCR'ın duyarlılığının %29 ila %100 arasında değiştiği ve çocuklarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (9,27).
- Pnömokok menenjit tanısında BOS'da PCR duyarlılığı %92-100 olarak belirlenmiştir. Diğer steril vücut sıvıları için de PCR duyarlılığı yüksektir.
- PCR ile balgamda pnömokok saptanma oranı %68-100 olarak bildirilmiştir. Bu örneklerde pnömokok saptandığında nazofarinks taşıyıcılığı veya alt solunum yolu etkeni olduğu ayrımı yapılamaz! Bu nedenle balgam örneklerinden pnömokok PCR önerilmez.
- PCR pnömokokların serotipleme için altın standart olan immünolojik yöntemlere alternatif olabilir.

7 Raporlama ve bildirim

- Kan kültürü - *S. pneumoniae* üremesi durumunda kesin etken olarak kabul edilir ve penisilin duyarlılığı MİK ile çalışılır ve raporlanır (bkz. UMS AMD-MT-03).
- BOS kültürü - BOS da pnömokok ürettiğinde penisilin ve seftriakson duyarlılıkları MİK yöntemi ile çalışılır ve kültür sonucu ile birlikte raporlanır.
- Steril vücut sıvıları - *S. pneumoniae* ürettiğinde rapor edilir.
NOT: BOS, kan ve diğer steril vücut sıvılarında üreme olmadığı takdirde üremek için beklenen inkübasyon süresi de belirtilerek, "7 gün inkübasyon sonunda üreme olmamıştır" şeklinde raporlanır.
- Antijen testinin raporlanması - Örneklerde antijen testi pozitif ise "*Streptococcus pneumoniae* antijeni saptanmıştır" şeklinde raporlanır.
- Balgam kültürleri - kaliteli balgam örneğinde *S. pneumoniae* ürettiğinde, yoğunluk ve penisilin duyarlılığı ile birlikte *örneğin*; "Yoğun, penisiline hassas, *Streptococcus pneumoniae* üremesi gözlemlendi" şeklinde rapor edilir.
- İnvaziv pnömokokkal hastalıklarda BOS, kan veya normalde steril diğer vücut sıvılarının kültüründe etken bakterinin izolasyonu, *S.pneumoniae* nükleik asitlerinin veya özgül antijenik yapıların saptanması "**kesin tanı**" koydurucudur (3,4).
- İnvaziv pnömokokkal hastalıkların bildirimi zorunludur (3,4).
- Mevcut bildirim sistemine göre Halk Sağlığı Müdürlüğüne bildirim yapılması gerekmektedir. Bildirim klinisyenin sorumluluğudur. Bununla birlikte (hastalığın *laboratuvardan bildirimi* zorunlu olmasa da) pozitif sonuç elde edilir edilmez laboratuvarın ilgili birime haber vermesi (*örneğin* telefon ile) önerilir.

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- *S.pneumoniae* dış ortam koşullarına dayanıklı bir bakteri değildir. Oda ısısında ürettikleri otolizinler nedeniyle tanımlama ve duyarlılık işlemleri kısa sürede yapılmalı ve işlemi tamamlanan izolatlar stok besiyerlerine alınarak uygun koşullarda saklanmalıdır.

9 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr; e-posta: usypri@saglik.gov.tr
Tel: 0312 565 5508

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik örneklerden bakteriyel menenjit etkenlerinin (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* ve *H. influenzae*) tanı, doğrulama, serotiplendirme ve moleküler epidemiyolojik tiplendirmelerinin yapılması, antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması; bölgesel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (*Streptococcus pneumoniae* İnvaziv Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-14	Loeffler'in metilen mavisi
UMS, B-TP-18	Optokin duyarlılığı
UMS, B-TP-20	Safrada erime testi
UMS, B-TP-23	X, V ve XV faktör gereksinimi (satellit fenomeni için)
UMS, B-MT-03	<i>Neisseria meningitidis</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı (T-I besiyerinin hazırlanması prosedürü için)
UMS, B-MT-04	<i>Haemophilus influenza</i> invaziv enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı (Ek-1 Serogruplandırma testi prosedürü için)
UMS, AMD-MT-03	<i>Streptococcus pneumoniae</i> için AMD testleri
UMS, AMD-TP-04	MIK saptama yöntemleri
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C et al. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* serotype Typhi, *Shigella*, and *Vibrio cholera*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and World Health Organization (WHO), 2003.
- 2 Popovic T, Ajello G, Facklam R. Laboratory manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO/CDS/CSR/EDC/99.7; 1999
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).

- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 CDC. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. 2nd edition. CDC and WHO, 2011.
<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/> (son erişim tarihi 25.12.2013).
- 6 CDC. Pneumococcal Diseases. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th Edition Second Printing, 2012.
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pneumo.pdf> (son erişim tarihi 06.01.2014).
- 7 Pilishvili T, Noggle B, Moore MR. Pneumococcal disease. VPD Surveillance Manual, 5th Edition, 2012. <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt11-pneumo.pdf> (son erişim tarihi 06.01.2014).
- 8 Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In: Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th Ed. ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 331-349.
- 9 Werno AM, Murdoch DR. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. CID 2008;46:926-932.
- 10 Pneumococcal vaccines. WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record* 2012;85:385-400.
<http://www.who.int/wer/2012/wer8714.pdf> (son erişim tarihi 06.01.2014).
- 11 CDC *Streptococcus* Laboratory Protocols.
<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm> (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 12 CDC. Chapter 5. Collection and transport of clinical specimens. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC ve WHO, 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt05-collect-transport-specimens.html> (son erişim tarihi 03.03.2014).
- 13 Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberleri: Steril Vücut Sıvıları Örnekleri. KLİMUD, Ankara, 2013.
- 14 Başustaoğlu A. Kan kültürü Uygulama Kılavuzu. Ankara 2013.
- 15 Ajello GW, Feeley JC, Hayes PS et al. Trans-isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1984; 20(1): 55-8
- 16 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 17 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington, DC. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 18 CDC. Chapter 6. Primary culture and presumptive identification of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC and WHO, 2011. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt06-culture-id.html> (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 19 York MK. Cerebrospinal fluid cultures. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington, DC. 2007; p. 3.7.1 - 3.7.7
- 20 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Jr. (eds). Introduction to microbiology Part I: guidelines to practice and management: Microscopic examination. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1992, p. 15-26.
- 21 Tunkel AR, Scheld WM. Acute meningitis. Chapter 80 In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Churchill Livingstone, 2005.
- 22 CDC. Chapter 8: Identification and characterization of *Streptococcus pneumoniae*. In: Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis. Second ed., CDC and WHO 2011.

- <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.html> (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 23 *Streptococcus*, *Enterococcus*, and similar organisms. Chapter 15. In: Tille PM (ed). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th ed., Elsevier Mosby, St.Louis Missouri. 2014, p.247-264
- 24 Identification of *Streptococcus* species, *Enterococcus* species and morphologically similar organisms. UK Standards for Microbiology Investigations. Health Protection Agency, Bacteriology – Identification | ID 4 | 2013.
http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1313155001427 (son erişim tarihi 06.01.2014)
- 25 CDC. Chapter 14: Storage and shipping of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Second ed., CDC and WHO. 2011.
<http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt14-storage-shipping.html> (son erişim tarihi 06.01.14)
- 26 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmî Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 27 Tomer A, Nariman M, Leibovici L, Mical P. PCR Using blood for diagnosis of invasive pneumococcal disease: Systematic Review and Meta-Analysis *J Clin Microbiol* 2010; 48(2):489.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Lejyoner Hastalığının (*Legionella* sp. enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-06
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Bakterinin özellikleri.....	4
Klinik özellikler.....	5
Mikrobiyolojik tanı	5
TEKNİK BİLGİLER	8
1 Hedef mikroorganizmalar	8
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	8
3 Tanı için genel akış diyagramı	12
4 İdrarda üriner antijen testi	13
5 Kültür	14
6 Tanıda diğer yöntemler.....	20
7 Bildirim	22
8 Tanıda olası sorunlar/sınırlılıklar	22
9 Referans Laboratuvar	22
EKLER.....	23
Ek-1 <i>Legionella</i> besiyerlerinin hazırlanması ^{26,27}	23
Ek-2 Besiyeri kalite kontrol	25
Ek-3 Stok antibiyotik solüsyonu hazırlanması ^{26,27}	26
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	28
KAYNAKLAR.....	28

Kapsam ve Amaç

Lejyoner hastalığı, belirleyici özelliği pnömoni olan ve genellikle ağır seyirli, sistemik bir enfeksiyondur. Etken mikroorganizma *Legionella pneumophila* olup daha az sıklıkla diğer *Legionella* türü bakteriler de hastalığa neden olabilirler.

Lejyoner hastalığı bir kaynaktan yayılarak salgın yapma potansiyeli nedeniyle halk sağlığı önemine sahiptir. Özellikle seyahat-ilişkili ve nozokomiyal Lejyoner hastalığı formları dünyanın pek çok ülkesinde süveyans sistemlerince izlenirler. Ülkemizde de Lejyoner hastalığı bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer almakta olup özel program yürütülmektedir (1,2,3).

Klinik ve radyolojik özellikleri ile diğer pnömonilerden ayırt edilemediği için Lejyoner hastalığının kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konur. Üriner antijen testi, kültür, DFA, PCR ve serolojik testlerden yararlanılabilirse de yöntemlerin hepsi tanıda aynı değere sahip değildir. Tanının yaygınlaşması -en azından daha fazla klinik laboratuvarlarda üriner antijen testi ile tanı konabilmesi- süveyansı destekleyecektir. Kontrol Programı çerçevesinde, hekimlerin şüpheli vakaları laboratuvara yönlendirme konusunda giderek daha duyarlı hale gelecekleri düşünülürse, bir laboratuvar tanı rehberinin el altında olması da tanının yaygınlaşmasını teşvik edecek bir araç olarak önemli görünmektedir.

Bu nedenlerle bu UMS belgesinde klinik laboratuvarlara -gerek hasta yönetiminde gerekse bildirimde esas doğru ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesinde- Lejyoner hastalığı tanısında geçerli yöntemlerin seçimi, tanıdaki yerleri ve doğru uygulanmaları için bir Rehber sunulması hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

ACES buffer N-[2 acetamido]-2-aminoethane sulfonate

BCB Brom krezol moru (bromocresol purple)

BCYE Buffered charcoal yeast extract (agar)

BMPA BCYE bazlı polymyxin B-anisomycin-cefamandole içeren (agar). PAC'a benzer.

BTP Brom timol mavisi (bromothymol blue)

HCL Hidroklorik asit

ICT Immunochromatographic test

KOH Potasyum hidroksit

PAC Polymyxin B-anisomycin-cefamandole (agar)

PAV Polymyxin B-anisomycin-vancomycin (agar)

SG Serogrup

TSB Triptik soya buyyon

UV Ultraviole (ışık)

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Lejyoner hastalığı -ılımlı bir akciğer tutulumundan ağır koma ve ölüme varabilen sistemik formları ile- geniş bir klinik yelpazede ortaya çıkabilen bir alt solunum yolu enfeksiyonudur. Temel patolojik olaylar akciğerlerde ortaya çıkar ve hastalığın seyrini savunma mekanizmalarının durumu belirler. Mortalite oldukça yüksektir; altta yatan hastalığa veya bağışıklık sisteminin durumuna göre sıklık değişmekle beraber *toplum-kaynaklı* vakaların %10-20'sinde hastalık ölümle sonuçlanmakta, *hastane-kaynaklı* vakalarda bu oran %40'a çıkabilmektedir (4).

Etken *Legionella* spp doğal sulardan bina su tesisatlarına geçip yerleşebilirler; sediment, kalker ve biyofilm katmanları içinde, özellikle sıcak su sistemlerinde çoğalabilirler. Hastalık, bakterinin su sisteminden duyarlı bireylere havada asılı kalabilir damlacıkların (aerosoller) solunması ile veya suyun aspirasyonu ile ulaşmasının bir sonucudur. Kişiden kişiye bulaşma söz konusu değildir (5,6). Hastalığın gelişmesinde konağın duyarlılığı da önemlidir; 50 yaş üzeri, erkek olma, sigara, alkol tüketimi, bağışıklık sistemini baskılayan hastalık ya da tedaviler ve şeker hastalığı gibi risk faktörlerinin rolü vardır (7).

Hastalık tek vakalar ya da salgınlar ile ortaya çıkabilir. Hastane su sistemlerinin *Legionella* sp ile kolonizasyonu hastane-kaynaklı vaka ve salgınlara yol açabilir (8). Turistik tesis su sistemlerinin kolonizasyonu ise seyahat-ilişkili formlara neden olabildiğinden, Lejyoner hastalığı aynı zamanda uluslararası bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer alır (9). Ülkemizde özellikle seyahat-ilişkili form 1990'ların ortalarından bu yana önem kazanmıştır. Salgın potansiyeli nedeniyle halk sağlığı önemine sahiptir; bu nedenle pnömonilerde epidemiyolojik ilişkinin (seyahat, hastanede yatış) sorgulanması vakaların tespitinde kayda değer görünmektedir (4,7,10,11,12).

Bakterinin özellikleri

Bugüne kadar 40'ın üzerinde *Legionella* türü tanımlanmış olup, bazı türlere ait serogruplar ile birlikte *Legionellaceae* ailesi 60'dan fazla üyeye sahiptir. Bunların sadece bir kısmı insanda hastalık ile ilişkilidir (13). En sık etken *L. pneumophila* olup, türlerin çoğunda görülmeyen çeşitli invazyon ve virülans faktörlerine sahiptir. *L. pneumophila* SG1 vakaların %75-80'inden, SG2 ve SG6 %10'undan sorumlu bulunmuştur. Bunları *Legionella micdadei*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii* ve diğer türler takip eder.

Legionellalar üreme şartlarına göre kokobasilden filamentöz formlara değişebilen sporsuz, kapsülsüz, hareketli, biraz düzensiz gram negatif çomak bakterilerdir. Diğer gram negatiflerden farklı ve daha karmaşık bir hücre duvar yapısına sahip oldukları için güç boyanırlar. Bazı türlerin de (*L. micdadei*) aside dirençli boyanma özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir. *Legionellalar* güç ürerler ve üremek için özel ortamlara gereksinim duyarlar. Temel besiyeri BCYE agar olup demir tuzları, L-sistein ve α -ketoglutarat gibi gelişme faktörleri, pH'ı düzenleyen bir tampon ve toksik radikallerin nötralizasyonu için aktif karbon içerir. Optimal üreme sıcaklığı 35°C'dir; ancak 25-42°C gibi geniş bir ısı aralığında üreyebilirler.

Legionella bakterisini diğer çoğu bakteriden farklı kılan bir özelliği de türler arası ayırım için biyokimyasal yöntemlerin fazla yarar sağlamamasıdır. Bu nedenle laboratuvar da bir *Legionella* izolatının türü veya alt tipi, bakteri hücre duvarının antijenik çeşitliliği temelinde ve antiserumlarla tiplendirme teknikleri ile belirlenir. Uzun dalga boylu UV ışık altında floresan yayma özelliği bazı türlerin kolonilerinin karışık kültürlerden ayırt edilmesini sağlayan bir özellik olsa da, tür düzeyinde tanımlama için yine antijenik tiplendirme yapılması gerekir.

Klinik özellikler

Lejyoner hastalığının inkübasyon dönemi 2-10 gündür. Hastalık yüksek ateş ($>38.5^{\circ}\text{C}$), baş ağrısı ve diğer genel enfeksiyon bulguları ile başlar. Hastane-kaynaklı formda bu evre görülmeden hızla ağır bir tablo ortaya çıkabilir.

Akciğer tutulumu ile pnömoni gelişir. Kuru öksürük ve zorlu solunuma göğüs ağrısı eşlik edebilir. Hastaların çoğu balgam çıkaramaz. Eğer alınabilmiş ise balgamın Gram boyalı preparatında bol nötrofil vardır ve sıklıkla bakteri görülmez (10,12).

Fizik muayenede hasta toksik görünümde olabilir. Yüksek ateşe ($>39.4^{\circ}\text{C}$) bradikardi (nabız $<100/\text{dk}$) eşlik edebilir (rölatif bradikardi) ki bu, pnömonili bir olguda Lejyoner hastalığının akla getirilmesinde anahtar kabul edilen bulgulardan biridir.

Pnömoni hızla her iki akciğere yayılabilir ve diğer organların da tutulduğu sistemik bir enfeksiyona ilerleyebilir. Pnömonili bir olguda infiltrasyonun hızlı ilerlemesi ve asimetric bir yayılım göstermesi Lejyoner hastalığını akla getiren diğer bir anahtar bulgudur. Rutin laboratuvar değerleri daha çok sistemik tutulum ile ilgili olup özgül değildir. Bununla birlikte bazı semptom ve bulguların bir arada hastalığın akla getirilmesine yardımcı olacağı kabul edilmektedir (bkz. Kutu 1) (10).

KUTU-1

Hastalığın akla getirilmesinde anahtar hususlar

Pnömonili bir olguda;

- semptomların gelişmesinden önceki 15 gün içinde en az bir gece otel, kaplıca vb. turistik bir tesiste konaklama veya hastanede yatış öyküsü (epidemiolojik ilişki) ve/veya
- risk faktörlerinden en az birinin varlığı (>50 yaş, erkek olma, sigara içiciliği, alkol, immün sistemi baskılayan nedenler, yakın zaman önce cerrahi girişim öyküsü, şeker hastalığı, vb.) ve/veya
- yüksek ateş ($>39.4^{\circ}\text{C}$) ve bradikardi (nabız $<100/\text{dk}$);
- akciğer filminde infiltrasyonun hızlı ve asimetric yayılımı ve/veya bilateral infiltrasyon;
- balgamın gram-boyalı yaymasında nötrofil yoğunluğuna rağmen bakteri görülmeysi;
- diyare ve/veya nörolojik semptomların varlığı;
- hiponatremi (serum $\text{Na}^+ <130\text{mEq/L}$) ya da hipofosfatemi ($<0.8\text{mmol/L}$) varlığı ve/veya transaminazlarda (bazen bilirubin düzeyinde) ılımlı yükselme;
- β -laktam veya aminoglikozid grubu antibiyotikler ile ampirik tedaviye rağmen semptomların gerilememiş olması.

Mikrobiyolojik tanı

Lejyoner hastalığı diğer pnömonilerden klinik ve radyolojik olarak ayırt edilemez. Bu nedenle hastalığın kesin tanısı ancak mikrobiyolojik inceleme ile konabilir. Tanı başlıca klinik örneklerin kültüründen bakterinin izolasyonuna, idrarda *Legionella* antijenlerinin gösterilmesine veya serumda legionellalara karşı antikor titrelerinin yükseldiğinin saptanmasına dayanır (bkz. Tablo 1, Şekil 1).

Kültür

Lejyoner hastalığı tanısında kültür 'altın standart'tır. Bakterinin kültürlerden izole edilmesi "kesin tanı" koydurucudur. Daha da ilerisi, hastadan elde edilen izolatin, hastalığın kaynağını belirlemek üzere yapılacak epidemiyolojik çalışma için büyük değeri vardır.

Kültürün duyarlılığı -enfeksiyonun evresi, antibiyotik tedavisi, hastanın örnek verme konusunda uyumu, solunum yolu örneğinin kalitesi, örnekte bulunan bakteri miktarı, laboratuvarın deneyimi, örneğin inceleme için düzgün hazırlanması, uygun besiyerlerinin kullanımı gibi- pek çok faktörden etkilenebilir. Buna rağmen kültür *Legionella* enfeksiyonunun tanısında halen en duyarlı yöntemler arasında kabul edilmektedir (Tablo 1) (7,13,14). Öte yandan, pozitif bir sonuç elde edebilmek için günler gerekebilir; *L. pneumophila* kolonileri iyi olasılıkla 5 gün içinde saptanırlar, ancak diğer türler yavaş üreyebilirler ve inkübasyon süresinin 10 günden fazla uzatılması gerekebilir (15).

Legionella kültürü için standart temel besiyeri BCYE agar olup, genellikle antimikrobiyal içeren (PAV, PAC, BMPA) ve içermeyen bileşimleri birlikte kullanılır. En çok kullanılan antimikrobiyaller; gram negatif bakteri üremesini baskılamak için polimiksin B, mayalar için anizomisin ve gram pozitifler için sefamandol ya da vankomisindir. Eğer *L. pneumophila*'dan başka türlerin izolasyonu da hedefleniyorsa -sefamandol beta laktamaz üretemeyen bazı *Legionella* türleri için inhibitör etkili olabildiğinden- vankomisin içeren seçici besiyeri tercih edilmelidir (16).

Etken çeşitli klinik örneklerden izole edilebilirse de alt solunum yolu örnekleri ilk seçenektir. Balgam değerli bir klinik örnektir; eğer hasta verebiliyorsa (ki Lejyoner hastalığında vakaların yarısından azı balgam çıkarabilmektedir) kalitesine bakılmaksızın balgam incelenmeli, kültüre alınmalıdır (17). İzolasyon duyarlılığı Lejyoner hastalığı tanısı ile özel olarak uğraşan laboratuvarlarda daha yüksektir.

Üriner antijen testi

Üriner antijen testi, idrara geçen *Legionella* antijenlerinin saptanmasına dayalı hızlı bir testtir; ICT kart test ile 15 dakika içinde, ELISA ile 2-3 saat içinde sonuç alınır. Günümüzde üriner antijen testi klinik örneklerin DFA incelemesinin yerini almıştır (13). Özellikle hastalığın erken tanısında ve salgınlarda büyük kolaylık sağlar. Bazı yazarlar üriner antijen testini Lejyoner hastalığında bir devrim olarak nitelemektedirler. Öyle ki; testin yaygınlaşması ile hastalığın erken tanısında belirgin artışla birlikte mortalite oranlarının düştüğü, hem de hızla epidemiyolojik incelemelere başlanmasına olanak sağladığından potansiyel salgınlara önlediği düşünülmektedir (18,19).

Legionella antijenürisi, semptomların ortaya çıkışını takip eden gün içinde başlayabilir; günlerce, bazen haftalarca devam edebilir; antibiyotik tedavisi ve antikor gelişiminden etkilenmez. Ancak mevcut kitler sadece *L.pneumophila* SG1 enfeksiyonunu saptar; genellikle yüksek düzeyde özgül (~%100) olsalar da duyarlılık olguların görülme sıklığına bağlıdır (%70-90) ve negatif test hastalığı dışlamaz (Tablo 1) (13,20).

Diğer legionellaların tanısı için geliştirilmiş kitler de mevcut olmakla birlikte, duyarlılık ya da çapraz reaksiyon sorunları tam çözülemediğinden, böyle kitlerle elde edilmiş sonuçlar kesin tanı koydurucu kabul edilmezler (21,22).

Öte yandan sonuç pozitif çıksın veya çıkmasın, her durumda üriner antijen testinin yanı sıra hastanın solunum yolu örneklerinden kültür de yapılması önerilir. Böylece, üriner antijen testi ile saptanamayan diğer kökenlere bağlı enfeksiyonlar da dahil olmak üzere etkenin izolasyonu, türün/serogrubun belirlenmesi ve moleküler tiplendirme yapılarak hastanın bir salgın ile ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesi mümkün olur (Şekil 1) (23).

Diğer tanı testleri

Laboratuvarda ayrıca seroloji, klinik örneklerden DFA ve PCR kullanılabilir. DFA, floresan boya (FITC) ile işaretli özgül antikorların, örnekte aranan bakteri ile birleşmesi ve bakterinin floresan mikroskopta görülmesi temeline dayanır. Bu yöntemlerin tanıdaki yeri ve diğer özellikleri Tablo 1’de ve gelecek bölümde ‘Tanıda Diğer Yöntemler’ (sayfa 20) başlığı altında özetlenmiştir.

Tablo 1. Lejyoner hastalığı tanısında kullanılan yöntemlerin özellikleri (14 no.lu kaynaktan uyarlanmıştır)

TEST	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Özellikleri	Kaynak
Kültür			‘Altın standart’	
Balgam	5-70	100	Üreme için 2-4 gün gerekir; bazen 14 gün	Edelstein & Meyer, 1994; Stout & Yu 1997; Harrison et al., 1998; Maiwald, Helbig & Lück, 1998; Fields, Benson & Besser, 2002; Lück, Helbig & Schuppler, 2002
BAL / ETA	30-90	100	Yüksek özgüllük	
Akciğer biyopsisi	90-99	100		
Kan	10-90	100		
Seroloji			Serokonversiyon 3-9 hafta gerektirebilir. IgG ve IgM test edilebilmelidir.	Edelstein & Meyer, 1994; Plouffe et al., 1995; Stout & Yu, 1997; Harrison et al., 1998; Fields, Benson & Besser, 2002; Lück, Helbig & Schuppler, 2002
Serokonversiyon	70-90	95-99		
Tek serum örneği	bilinmiyor	50-70		
Üriner antijen	75-99	99-100	Sadece <i>Lp</i> SG1 tanısına uygun Diğer SG veya türler için bulgular yeterli değil. Çok hızlı (15 dk – 3 sa) Sıklıkla en erken pozitifleşir; haftalarca pozitif kalabilir	Edelstein & Meyer, 1994; Stout & Yu, 1997; Harrison et al., 1998; Fields, Benson & Besser, 2002; Lück, Helbig & Schuppler, 2002; Uldum & Molbak, 2002
DFA			Hızlıdır (2-4 sa). Duyarlılığı düşük. Deneyim gerektiriyor. <i>Lp</i> harici türler için geçerliliği tanımlanmış re ajanler mevcut değil.	Edelstein & Meyer, 1994; Stout and Yu, 1997; Harrison et al., 1998; Fields, Benson & Besser, 2002
Balgam veya BAL	25-75	95-99		
Akciğer biyopsisi	80-90	99		
PCR			Hızlıdır. Pozitif sonuçların (diğer yöntemler ile teyit edilmeksizin, tek başına) tanısal geçerliliği hususu belirsizliğini korumaktadır. Legionellaları cins düzeyinde tanımlayabilir.	Fields, Benson & Besser, 2002; Lück, Helbig & Schuppler, 2002; Uldum & Molbak, 2002; van der Zee et al., 2002; Roig & Rello, 2003
Solunum yolu örnekleri	85-92	94-99		
İdrar, serum	33-70	98-98		

* *Lp* SG1, *L. pneumophila* serogroup 1; dk, dakika; sa, saat;

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Legionella pneumophila ve diğer *Legionella* türleri

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Legionella türleri Risk Grubu 2 mikroorganizmalardır ve bu organizmalarla ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, daima standart önlemler uygulanmalı ve önlemler risk değerlendirmesi ile de desteklenmelidir. Solunum yolu örneklerinin kültüre veya diğer işlemlere hazırlanması başta olmak üzere aerosol oluşturmaya muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Testlerin prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Besiyeri, Kit, Donanım

2.3.1. İnceleme örnekleri

İnceleme örneklerinin seçimi, özellikleri, alınması ve gönderilmesi ile ilgili bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne başvurulmalıdır. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmiştir.

İdrar

Üriner antijen testi içindir. Hastalığın herhangi bir döneminde alınabilir.

Alt solunum yolu örnekleri

Kültür, DFA ve PCR için kullanılabilirler. Şu konulara da dikkat edilmelidir:

- Kültürlerden *Legionella* izolasyonunda başarı için **balgam kalitesi önemli** olmakla birlikte diğer pnömoniler için *kalitesiz* kabul edilen balgam örneklerinden de *Legionella* izole edilebildiği için, balgam, *niteliği nasıl olursa olsun*, incelemeye alınmalıdır!
- Olguların çoğu balgam çıkaramadığı için kültür amacıyla bronşial yıkama sıvısı, BAL veya ETA örnekleri de kullanılabilir.

NOT: Önceleri bilinenin aksine sodyum *Legionella* bakterisi için toksik kabul edilmemektedir; SF kullanılmasında sakınca yoktur (13).

- BAL örneği aşırı seyreltiktir ve kültürde üreme şansını artırmak için santrifüj ile konsantre edilmesi gerekir. Bu nedenle laboratuvara 50 mL kadar sıvı gönderilmiş olmalıdır. 30 mL'den az örnek kabul edilmez!
- Bronkoskopi ya da aspirasyon ile 'Luken trap' (mukus toplayıcı; Resim 1) içine alınmış örnekler -serbest hortumlarının ucu *kesinlikle* sızdırmaz bir şekilde kapatılması koşuluyla- alındıkları kaptan gönderilebilirler.
- Bronşiyal fırça örnekleri alındığında, ucuna 3-4 cm mesafeden kesilir ve fırça ~1 mL steril SF veya TSB içeren tüpe konur.



Resim 1. Luken trap (mukus toplayıcı) resimdeki gibi bir ayardır. Hortumun biri bronşiyal ağaca ulaştırılmış iken diğeri bir aspiratöre (ör., bir enjektör) bağlanır.



Resim 2. Luer-Lok (sızdırmaz enjektör tıpası). Laboratuvara enjektör ile örnek gönderilmek isteniyorsa, kesinlikle iğnesi çıkarılmış ve ucu sızdırmaz bir şekilde tıpa ile kapatılmış olmalıdır.

Kültür için diğer vücut bölgelerinden örnekler

- Steril vücut sıvıları (plevra, perikard, periton sıvısı) en az 5 mL alınmış ve steril bir tüpe konarak gönderilmiş olmalıdır. Eğer, enjektör ile gönderilmesi kaçınılmaz ise iğnesi atılır ve ağzına bir 'Luer-Lok' takılır (Resim 2). Enjektör **asla** üzerinde iğne ile laboratuvara gönderilmez!
- *Legionella* bakterisi nadir de olsa akciğer tutulumu olmaksızın ekstra-pulmoner yerleşim gösterir ve yara enfeksiyonu, perirektal abse, perikardit, pyelonefrit ya da prostetik kapak endokarditi gibi lokal organ enfeksiyonları görülebilir. Bu çerçevede diğer doku örneklerinin, rutin kültürleri negatif bulunduğunda, *Legionella* spp. için kültüre alınabileceği akla gelmelidir.

NOT: *Legionellalar* dış ortam şartlarına görece dayanıklıdır; 2-8°C'de saklanan örneklerde bir hafta kadar canlılıklarını koruyabilirler (13,24). Kültür ekimleri için örneklerin buyyon içinde yapılan homojenizatlarının kalan kısımları da yedeklenmiş olabilir. Eğer klinik örneğin rutin kültürleri negatif ise, buzdolabında saklanmış örnekten veya buyyon yedeğinden *Legionella* besiyerlerine ekim yapılabilir.

- Kandan *Legionella* izolasyonu için standart bir metot mevcut değildir. "Negatif" sonuçlanmış standart kan kültürü şişelerinden "kör pasaj" yöntemi ile bazen *Legionella* sp. izole edilebilir. Ancak bu yöntemin duyarlılığı rutin uygulamaya önermek için yeterli değildir (13).

Serum

Serolojik tanı için kullanılır. Lejyoner hastalığı tanısında “kesin tanı” için çift serum örneğinde titre artışının gösterilmesi önemli olduğundan akut faz örneği alındıktan 4-6 hafta sonra ikinci serum örneği de gönderilmelidir.

2.3.2. Besiyeri / Kit

İdrarda üriner antijen arama test kiti

- **Kart test (ICT)** – Piyasada değişik ticari kitler mevcuttur.
- **EIA / ELISA test** – Örnek kapasitesi yüksek laboratuvarlara önerilir.
ÖNEMLİ: Üriner antijen testlerinde sadece *L.pneumophila* SG1 için elde edilen pozitif sonuç **kesin tanı** koydurucudur. Laboratuvar kitin diğer legionellalarla, *Streptococcus pneumoniae* veya diğer idrara geçebilen bakteriyel antijenlerle çapraz reaksiyon vermediğinden emin olmalı, uygun kitin seçiminde literatürden yararlanmalı ve sertifika (ör. FDA) aramalıdır (20,21,22,25). Çünkü **kesin vaka** tanısı epidemiyolojik incelemeleri tetikleyen, özellikle seyahat-ilişkili Lejyoner hastalığı olasılığında turizm sektörünü yakından ilgilendiren ekonomik sonuçlar doğurabilen ve uluslararası bildirim zorunluluğu olan, kritik bir karardır.

Kültürler için besiyeri / kit

- **BCYE agar** – Legionellaların kültürden izolasyonunda temel besiyeridir. BCYE agar, hazır plak besiyeri şeklinde piyasadan temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (bkz. Ek-1).
- **PAC** – BCYE bazlı seçici besiyeridir; solunum yolu florasını inhibe etmek amacıyla BCYE agara polimiksin B, anisomisin ve sefamandol eklenerek hazırlanır (Ek-1). Bu besiyeri *L. pneumophila*'nın üremesini destekler fakat genel olarak diğer türlerin üremesini desteklemez.
- **PAV** - BCYE bazlı seçici besiyeridir; solunum yolu florasını baskılamak amacıyla BCYE'ye polimiksin B, anisomisin ve vankomisin eklenmiştir. Ayrıca *L. micdadei*'nin diğer legionellalardan ayırt edilmesini sağlayan boyalar (brom krezol moru ve brom timol mavisi) içerir (Ek-1). PAV'da çoğu *Legionellaceae* üyesi üreyebilir.
NOT: PAV ve PAC besiyerlerine konacak antibiyotikler için stok solüsyon hazırlama örnek prosedürü de Ek-2'de verilmiştir.
- **BMPA** – PAC'a benzer içeriğe sahiptir. Ticari olarak temin edilebilir.
- **HCl-KCl (pH2.2) asit solüsyonu** – Kültürler için balgam örneklerinin dekontaminasyonu amacıyla kullanılır. Hazırlamak için:
(a) Stok 0.2M HCl ve stok 0.2M KCl (14.9 g/L distile suda) hazırlanır.
(b) 100 mL distile suya 5.3 mL 0.2M HCl ve 25 mL 0.2M KCl eklenir.
(c) Filtre ile veya otoklavda steril edilir. Oda sıcaklığında raf ömrü 1 yıl.
- **%5 koyun kanlı agar** – paralel pasajlar için
- **Legionella lateks aglütinasyon kiti** - en az *L. pneumophila* SG1, SG2-14 polivalan veya monovalan ve *Legionella* spp. polivalan antiserumları içermelidir.

- **Legionella DFA kiti** - *L. pneumophila* ve diğer *Legionella* spp polivalan ve monovalan FITC reaktiflerini içermelidir.

2.3.3. Diğer sarflar ve donanım

Besiyeri hazırlamak için

- pH metre
- Manyetik karıştırıcı ve manyetik balıklar
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Burgu kapaklı steril tüpler, steril pipetler,
- Membran filtre (enjektör tipi, polikarbonat, 0.2µm) ve enjektör,
- Steril Petri kabı (tek kullanımlık),

Kültür, mikroskopi ve diğer testler için

- Öze, steril, tek kullanımlık veya nikrom – koloni pasajları vb. için
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için
- Floresan mikroskop – (objektifler 40×, 100× oil; oküler 10×)
- UV lamba, uzun dalga boylu (360±20nm) (Wood lambası)
- ELISA cihazı – ELISA formatındaki testler için
- Santrifüj – 50 mL tüp santrifüjüne uygun
- T veya L öze (steril, tek kullanımlık) – sıvı klinik örneklerin ekimi için
- Vorteks (tüp ataçmanlı)
- Zaman alarmı (timer)

2.4. Kalite kontrol

Besiyerleri

- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer kuruma, çatlak vb. gözlenirse, o besiyeri plakları kullanılmamalıdır.
- Uzun süre depolanan besiyeri plakları nem kaybına uğrayabilir; içeriğin madde yoğunluğu artabilir ve üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir.
- Antimikrobiyaller zaman içinde yıkılabilir. Bu nedenle, antibiyotik içeren besiyerlerinin etkinliği de zamanla azalabilir.
- *Legionella* türleri laboratuvarında iki-üç pasajdan sonra yapay ortamlarda üremeye uyum sağladıklarından, çok pasajlanmış suşların kalite kontrol organizmaları olarak kullanılmaları uygun değildir. Bu nedenle, doğru bir kalite kontrol uygulayabilmek için şu yollar önerilir:
 - (a) laboratuvar pozitif klinik örnekleri saklayarak takip eden kalite kontroller için kullanılabilir, veya
 - (b) elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyeri kalite kontrol prosedürü Ek-1'de verilmiştir.

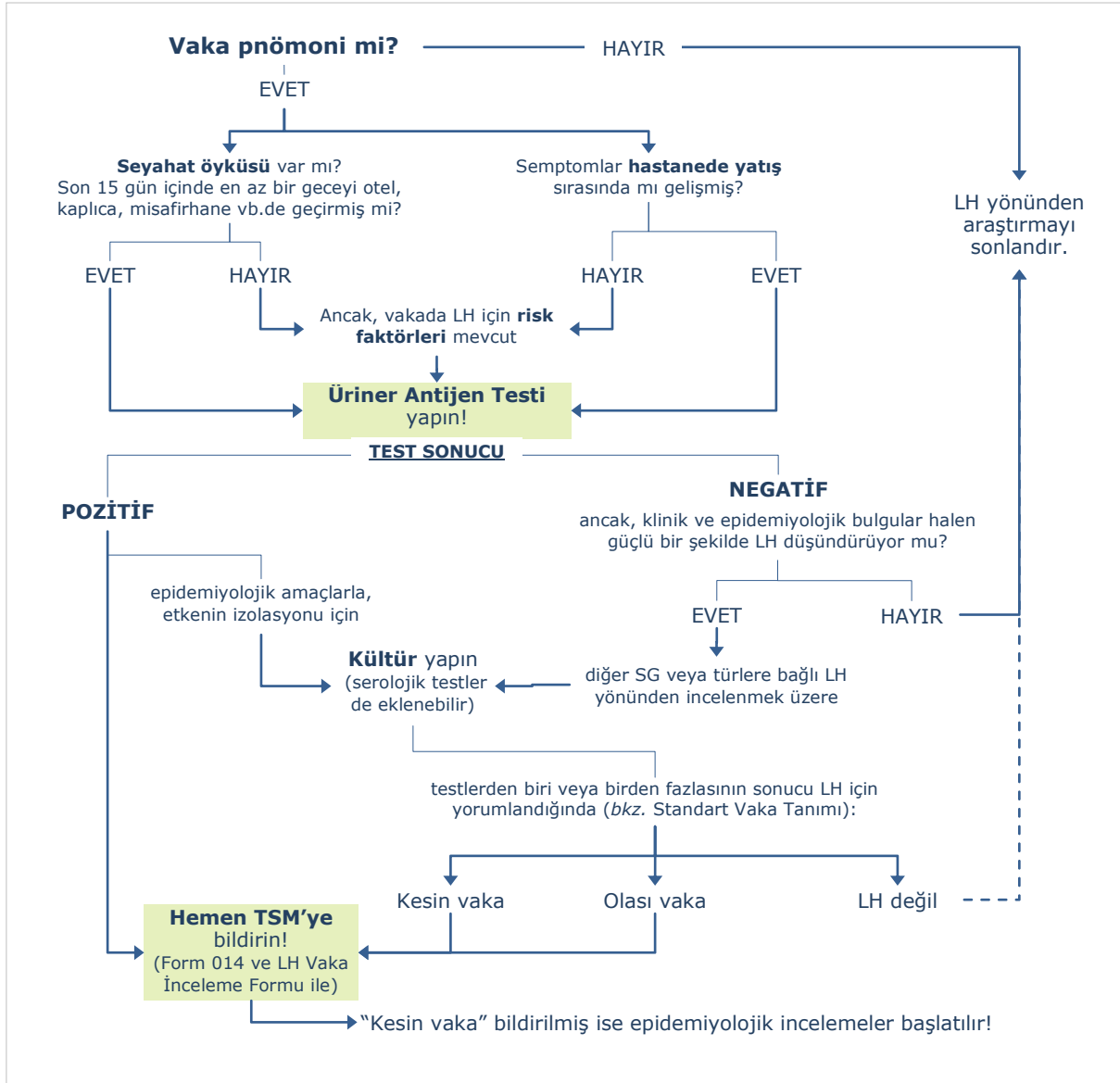
Kitlere dayalı testler

- Her zaman kitin kontrol serumları (veya örnekleri) kitin talimatına göre teste dahil edilmelidir. Laboratuvar aynı zamanda kendi kalite kontrol serumlarına veya örneklerine sahip olmalı ve testlere dahil etmelidir.

- Bütün kalite kontrol sonuçları, kitin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte laboratuvarın kalite kontrol kayıt defterine kaydedilmelidir.

3 Tanı için genel akış diyagramı

Lejyoner hastalığı şüphesinde vaka tanısı için önerilen adımlar Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Lejyoner hastalığı şüpheli vakaların tanısı için önerilen akış şeması. Yüksek mortalite, en kısa sürede özgül tedaviye başlanmasının prognoza etkisi ve aynı kaynaktan etkilenmiş olabilecek diğer vakaların belirlenmesi için bir an önce epidemiyolojik incelemelerin başlatılabilmesi gibi pek çok gerekçe ile mümkün olan **en hızlı, doğru** ve **kesin tanıya** ulaşılması önem kazanmaktadır. Bu nedenle Lejyoner hastalığı kuşkusunda üriner antijen testi birinci seçenektir. İdeal olarak, üriner antijen testi pozitif çıksa da çıkmasa da balgam (ya da bir alt solunum yolu) örneğinin de laboratuvara gönderilmesi istenir.

* LH, Lejyoner hastalığı; TSM, Toplum Sağlığı Merkezi

4 İdrarda üriner antijen testi

4.1. Hazırlık

- Test öncesinde idrar oda sıcaklığına getirilmiş olmalıdır.

4.2. Testin yapılışı

- Test, kitin kendi talimatına göre uygulanır.
- Kart testte, kitin temin ettiği eküvyon kullanılmalıdır. Eküvyonun idrara tam olarak daldırıldığından emin olunmalıdır. Eküvyon çıkarıldığında üzerinden idrar damlıyorsa fazla olduğu anlamına gelir; fazla idrar kabın kenarından süzdürülmelidir.
- Zamanlayıcı 15 dakikaya kurulmalıdır.

4.3. Sonucun değerlendirilmesi/yorumlanması

- Kart testte, 15 dakika tamamlandıktan hemen sonra sonuç okunur. Daha geç okumalar hatalı sonuç verilmesine neden olabilir.
- Eğer test penceresinde hiç pembe çizgi görülüyorsa test geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.
- **Pozitif sonuç** – test penceresinde iki pembe çizgi (üstte kontrol çizgisi, altta örneğe ait olan çizgi) görülmelidir.
- **Negatif sonuç** – sadece üstte bir pembe çizgi (kontrol çizgisi) görülür.

4.4. Sonucun rapor edilmesi

Pozitif üriner antijen test sonucu

- “Örnekte *Legionella pneumophila* serogroup 1 üriner antijeni POZİTİF bulunmuştur” şeklinde rapor edilir.

Negatif üriner antijen test sonucu

- “Örnekte *Legionella pneumophila* serogroup 1 üriner antijeni NEGATİF bulunmuştur” şeklinde rapor edilir.

Ayrıca şu yorum eklenir: “Bu test ile insanda hastalığa neden olabilen diğer *Legionella* türleri ve serogrupları saptanamaz. Bu nedenle, halen Lejyoner hastalığı düşünülüyorsa hastanın solunum yolu örneklerinden kültür yapılmalıdır.”

4.5. Üriner antijen testi için sınırlılıklar

- Test *L. pneumophila* SG1 enfeksiyonunu saptar. Bu nedenle Lejyoner hastalığı tanısı sadece bu teste dayandırılmamalıdır. Negatif test, Lejyoner hastalığını dışlamaz.
- *Legionella* üriner antijen testi, tedavi yanıtının izlenmesinde kullanılmaz çünkü başarı ile tedavi edilmiş hastalarda iyileşmeden aylar sonra bile idrarda üriner antijen görülebilir.

5 Kültür

Lejyoner hastalığı tanısı amacıyla klinik örneklerle çalışma **daima** biyogüvenlik kabini içinde yapılmalıdır! Daima eldiven giyilmelidir!

5.1. Örneklerin kültür vasatlarına ekilmesi

Hazırlık

- Bütün örnekler çalışma formuna ve laboratuvar defterine kaydedilir.
- Kültür için en az iki tip besiyerine (BCYE+PAV, BCYE+PAC veya +BMPA gibi), mümkünse üç tip besiyerine (BCYE+PAV+PAC) ekim yapılır.
- Uygun sayıda plak alınır. Üzerleri önceden etiketlenmiş (BCYE, PAV vb.) olmalıdır; değilse ciddi karışıklık yaşanır. Plaklar örneğin niteliğine göre de etiketlenmeli; hastanın adı, ekim tarihi, defter protokol numarası ve işlem kısaltması (Aİ, asit ile işlem; D, direkt ekim; vb.) yazılmalıdır.
- Bütün ekimler için **tam plak yüzeyi** kullanılmalıdır!
- **Pürülan** kısımlardan, plağın bir kenarına eküvyon ile sürüldükten sonra tek koloni düşürecek şekilde çizgi ekim yapılır. **Sıvı** örneklerden, L öze ile yayma ekim yapılır (26,27). Örnek tipine göre plaklara ekim adımları Şekil 2'de özetlenmiştir.
- Kontaminasyon nedeniyle okunamayan plaklar olduğu takdirde tekrar ekim yapılabilmesi için ilk ekimler yapıldıktan sonra kalan orijinal örnekler ~7 gün buzdolabında saklanmalıdır (13).

Direkt ekimler

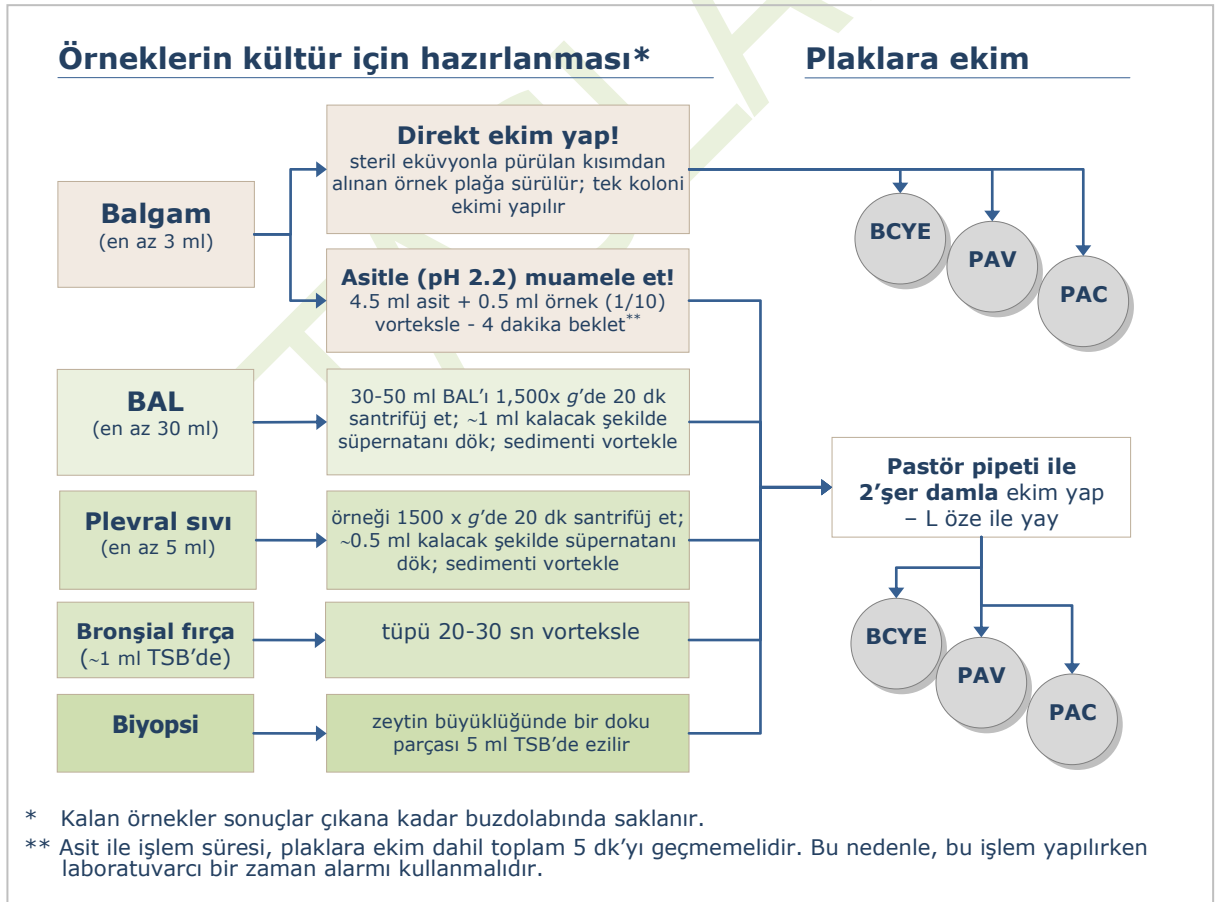
- **Balgam** – Örneğin en pürülan/kanlı kısımlarına steril bir eküvyon ile dokunulur ve BCYE agara inoküle edilir. Eküvyon yeniden örneğin pürülan kısımlarına sürülür ve PAV, PAC besiyerlerine de inoküle edilir.
- **BAL** – Örneğin tamamı (30-50 mL, varsa daha fazlası) 1500× g'de 20 dk santrifüj edilir. Tüpün dibinde ~1 mL sıvı kalacak şekilde süpernatant dökülür. Sediment vortekslenerek karıştırılır. Steril Pastör pipeti kullanılarak her plağa 2 damla (~0.1 mL) örnek konur ve L öze ile tüm yüzeye yayılır.
- **Steril vücut sıvıları** (plevra sıvısı vb.) – Örneğin tamamı 1500× g'de 20 dakika santrifüj edilir. Tüpün dibinde 0.3-0.5 mL sıvı kalacak şekilde süpernatant dökülür. Sediment vortekslenerek karıştırılır. Steril Pastör pipeti kullanılarak her plağa 2 damla örnek konur ve L öze ile tüm yüzeye yayılır.
- **Bronşiyal fırça** – Fırçayı içeren tüp fırçaya yapışmış tüm hücresel materyali uzaklaştıracak şekilde iyice vortekslenir. Ardından steril bir Pastör pipeti kullanılarak tüpteki sıvıdan alınır ve her plağa 2 damla örnek konur; L öze ile tüm yüzeye yayılır.
- **Doku biyopsisi** – En fazla bir zeytin büyüklüğünde bir doku parçası 5 mL TSB içine konur. Mekanik bir doku öğütücü ile homojenize edilir. Steril bir Pastör pipeti kullanılarak homojenattan alınır ve her plağa 2 damla örnek konur; L öze ile tüm yüzeye yayılır.

Asitle işlem (dekontaminasyon için)

- Balgam ya da kontamine herhangi bir klinik örnek ayrıca asit (HCl-KCl, pH2.2) ile işlem yapıldıktan sonra da plaklara ekilmelidir. Özellikle kistik fibrozisli olgularda ve gram negatif bakteri kolonizasyonu olduğu bilinen olgularda asitle işlenmiş örnekler *mutlaka* ekilmelidir.
- Steril burgu kapaklı bir tüpe 4.5 mL asit solüsyonu konur. Üzerine örnekten 0.5 mL konur (örnek/asit oranı = 1/10). Kuvvetli bir şekilde vortekslenir. Oda ısısında 4 dk beklenir. Daha sonra BCYE, PAV ve PAC besiyerlerine Pastör pipeti ile 2'şer damla inoküle edilir. L öze ile örnek tüm plak yüzeyine yayılır.

5.2. Kültür plaklarının inkübasyonu

- Ekim yapılmış plaklar biyogüvenlik kabininde kapakları yarım kapalı şekilde, yüzeyleri kuruyuncaya kadar bekletilirler; ardından plaklar kapak alta gelecek şekilde ters çevrilir ve inkübatöre kaldırılırlar.
- NOT: Yüzeyi kurumadan inkübe edilen plaklarda yayılarak üreme olur; tek koloni ayırt edilemez. Yüzeyin kuruduğundan emin olunmalıdır. Özellikle L öze ile yapılan ekimlerde yüzeyin kuruması zaman alabilir.



Şekil 2. Lejyoner hastalığı tanısında klinik örneklerin laboratuvarında kültüre hazırlanmaları ve primer kültür besiyerlerine ekimleri akış şeması (Kaynak: Akbaş E. Henüz yayınlanmamış doküman. 2012).

- Plaklar, 36°C'de, normal atmosferde, %50-70 rölatif nemli ortamda inkübe edilir. Uygun nem oranı inkübatörün tabanına geniş bir cam tepsi ile distile su konarak elde edilir. Tepsinin kuru kalmasına izin verilmemeli, düzenli aralarla kontrol edilerek su eklenmelidir.
- NOT: Çeşitli kaynaklar %3-5 CO₂'in üremeyi desteklediğini belirtse de pratikte CO₂ inkübatör veya mumlu jar gerekli değildir. *Legionella* spp normal atmosferde rahat üreyebilir. Nem gereksinimi daha önemlidir; eğer yeterli nem sağlanamaz ise uzun inkübasyon sırasında besiyerleri kuruyabilir ve bakterinin üremesini baskılayıcı hale gelebilir.

5.3. Kültür plaklarının değerlendirilmesi

- Legionella* sp. için ortalama üreme süresi 2-7 gün olup plaklar ikinci günden itibaren her gün okunur. Bazı türler daha geç üreyebileceği için, üreme görülmeyen plakların inkübasyonu 14. güne kadar uzatılabilir.
- Değerlendirme, koloni mikroskobunda $\times 20 - \times 50$ büyütme ile yapılmalıdır. Cihazın plak yüzeyini aydınlatmak için yüksek bir eğik açı ile odaklanmış ışık kaynağı bulunmalıdır. Çıplak gözle görülemeyen koloniler bile mikroskop altında *Legionella* bakterisi için tipik koloni görünümü ile ayırt edilebilirler.
- Kapak açık inceleneceği için plakların küf kontaminasyonu riski vardır. Dikkatli çalışılmalıdır. İlk incelemede, plaklarda floraya ait aşırı üreme saptanıyorsa, saklanan orijinal örnek asitle tekrar ve daha seyreltik olacak şekilde (ör., 1/20) muamele edilir ve sonra yeniden ekim yapılır.

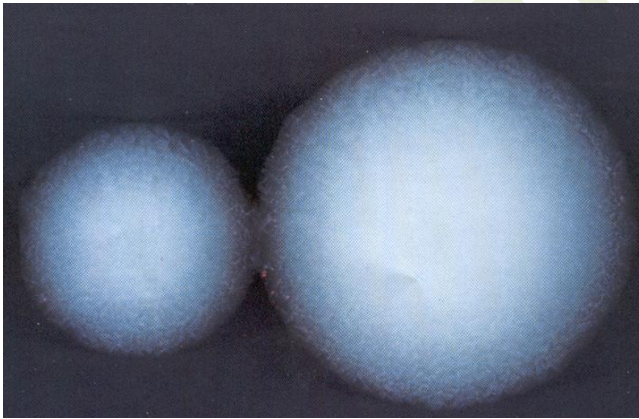
5.4. Şüpheli kolonilerden tanımlama

- Koloni mikroskobu altında incelendiğinde *Legionella* bakterisi ile uyumlu koloniler yüzeyleri düzgün, hafif bombeli, 1-3 mm çaplı, merkezi gri-beyaz, kenarları pembe, yeşil veya mavi tonlarında "buzlu-cam" görünümü ile ayırt edilirler (Resim 3). Bu görünüm oldukça tipiktir ve tıbbi öneme sahip çok az diğer bakteri benzer koloni görünümü verir. Boya içeren PAV'da *L.micdadei* mavi, *L.pneumophila* yeşil, *L.bozemanii* de gri-yeşil renkli koloniler yapar.

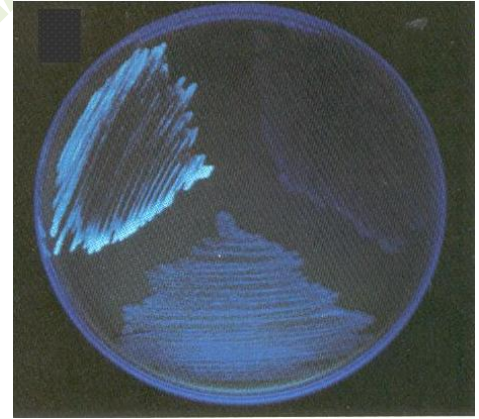
NOT: *L. micdadei* ve diğer bazı legionellalar sefamandolün baskılayıcı etkisi nedeniyle PAC/BMPA'da üremeyebilirler. Eğer sadece iki tip besiyeri (BCYE ve PAC/BMPA) kullanılmış, BCYE'de de flora bakterileri ya da mayalar baskın üremiş ise *Legionella* kolonisi hiç ayırt edilemeyebilir ve sonuç hatalı negatif bulunabilir. Bu durumu önlemek için üç tip besiyeri kullanılması veya ikinci besiyeri olarak vankomisin içerenin (PAV) tercih edilmesi önerilir.

DİKKAT! BCYE agarda yüksek riskli bir patojen olan *Francisella tularensis* de üreyebilir. Vakalar klinik olarak ayırt edilemediği için, Lejyoner hastalığı şüphesi ile incelenen örneklerde hem **laboratuvar güvenliği** nedeniyle hem de **doğru tanı** bakımından dikkatli olunmalıdır. Ayrıca epidemiyolojik özellikleri ile ülkemizde laboratuvarcının karşılaşma olasılığı uzak kabul edilse de, BCYE'de *Coccidioides immitis* ve *Histoplasma capsulatum* gibi yüksek riskli mantarların da üreyebildikleri akılda tutulmalıdır.

- Bir plakta nadir de olsa iki farklı koloni görünümü bir arada bulunabilir; bunlar farklı *Legionella* serogrupları veya türleri olabilirler. Her ayrı görünümdeki koloni bir ileri basamakta ayrı ayrı çalışılmalıdır.
- Bazı legionella kolonileri kendiliğinden floresan yayabildiklerinden dolayı, plaklar ayrıca, karanlık bir ortamda UV lamba (Wood lambası) altında da incelenmelidir. Böyle koloniler parlak mavi-beyaz, sarı yeşil veya kırmızı görünürler (Tablo 2, Resim 4).
- Plaklarda gözlenen bütün şüpheli koloniler işaretlenir ve sonraki tanımlama basamaklarına geçilir. Bunun için;
 - (a) Legionellaların sisteinsiz besiyerinde üreyememe özelliğinden yararlanılarak "**paralel pasaj yöntemi**" kullanılır. Sisteinli (BCYE) ve sisteinsiz (kanlı agar) iki plak besiyerine aynı anda pasajlanan koloni 24 saat inkübasyon sonunda sisteinli besiyerinde üremişken sisteinsiz besiyerinde üreme olmadığı görülürse; koloninin çok yüksek olasılıkla *Legionella* sp olduğu düşünülür. Sisteinli plaktaki yoğun üremeden özgül antiserumlarla lam aglütinasyonu yapılarak **kesin tanıya** gidilir (tanımlama basamakları için bkz. Şekil 3).
 - (b) Şüpheli kolonilerden doğrudan DFA testi yapılarak tanıya gidilir. Bu yol özellikle şüpheli vakaların erken tanısında eğer laboratuvar DFA yapabiliyorsa idealdir. Çünkü klinik örnek plakları ilk okunduğunda eğer şüpheli koloniler görülüyorsa DFA için preparat hazırlamak ve aynı gün içinde **kesin tanı** koymak mümkündür.



Resim 3. *L.pneumophila* kolonisinin koloni mikroskopunda görünüşü (Kaynak: <http://www.cdc.gov/legionella/specimen-collect-mgmt/procedures-manual.pdf>) (besiyeri BCYE agar).

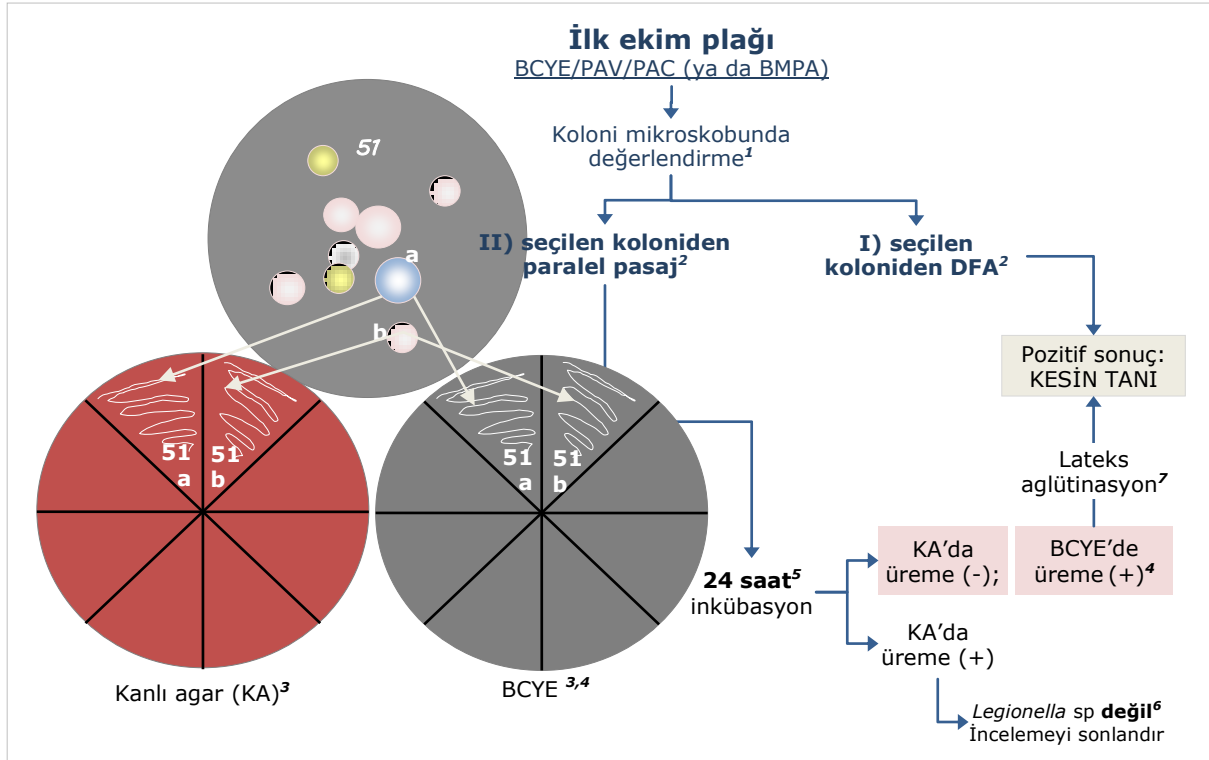


Resim 4. UV lamba altında ekim plağı; sol üstte mavi-beyaz floresan veren bir *Legionella* türünün pasajı görülmektedir.

Tablo 2. UV ışık altında (Wood lambası) floresan veren kolonilere sahip *Legionella* türleri (13).

Parlak mavi-beyaz koloni	Sarı-yeşil koloni	Kırmızı koloni
<i>L. bozemanii</i> *	<i>L. tucsonensis</i>	<i>L. wadsworthii</i>
<i>L. dumoffii</i> *	<i>L. cherrii</i>	<i>L. erythra</i>
<i>L. gormanii</i> *	<i>L. steigerwaltii</i>	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. anisa</i> *	<i>L. gratiana</i>	
<i>L. parisiensis</i> *		

* insanda enfeksiyon ile ilişkili tür.



Şekil 3. Lejyoner hastalığı tanısı için ilk ekim plaklarının koloni mikroskopu ile değerlendirilmesi ve şüpheli kolonilerden tanımlama basamakları: I) DFA, ve/veya, II) Paralel pasaj yöntemi (Kaynak: Akbaş E. Henüz yayınlanmamış doküman. 2012)

- Plakların ilk değerlendirmeleri koloni mikroskopu ile yapılır; düzgün, hafif bombeli, kenarları buzlu-cam gibi tipik görünümde koloniler seçilir. Plaklar ayrıca UV ışık ile floresan veren *Legionella* türlerinin (insanda az sıklıkta hastalığa neden olsalar da) varlığını belirlemek için Wood lambası ile de incelenmelidir.
- Şüpheli kolonilerden **paralel pasaj** yapılır. Ancak, vakaya özgül tedavinin başlanması açısından tanının aciliyeti göz önüne alındığında, mümkünse laboratuvar **DFA testi** uygulayarak hızla tanıya gitmelidir.
- Pasaj için koyun kanlı agar tercih edilir. Çikolata agar kullanılmaz! Plaklar cam kalemi ile altı-sekize bölünür. Orijinal plakta *Legionella* olabileceği düşünülen ancak farklı görünümdeki her koloni alfabe harfleri ile (a, b, c...) numaralandırılır. Plak numarası ve koloni numarası pasaj yapılacak plağın bir bölümüne yazılır. Koloniden bir öze dolusu alınarak numarasının yazıldığı bölmelere önce kanlı, sonra BCYE agara zikzak çizerek yoğun ekim yapılır. Seçilmiş diğer koloniler de benzer şekilde pasajlanır.
- İnkübasyon sonunda BCYE'de üremiş ancak kanlı agarda ürememiş ise, koloni çok yüksek olasılıkla *Legionella* sp.dir. BCYE pasajındaki üreme sonraki tanımlama basamağında kullanılır.
- Bazen (özellikle floresan veren koloniler için) inkübasyon süresini uzatmak gerekebilir. Süre en fazla 7 güne kadar uzatılmalıdır.
- Enfeksiyondan oldukça nadir sorumlu olabilen bazı türler sisteinsiz besiyerinde üreyebilirler. Dikkat edilmelidir.
- Piyasada mevcut kitler ile lateks aglütinasyon çoğu durumda tanı koymak için yeterli olur. Ancak bazı durumlarda (lateks kitinin reagen havuzunun kapsamadığı SG veya türler söz konusu olduğunda) üremenin *Legionella* sp.ye ait olup olmadığının polivalan / monovalan reagenler kullanılarak DFA testi ile veya tür ya da cins spesifik primerler kullanılarak PCR ile teyit edilmesi gerekebilir.

NOT: Gram boyama özellik arz eder; zıt boya (karbol fuksin veya %0.8'lik bazik fuksin) ile uzun (>1 dk) boyanmalıdır. Ancak, mikroskopik görünüm tanı koydurucu değildir. Bu nedenle tanımlama sürecinde herhangi bir aşamada Gram boyama yapılması önerilmez. Bazı biyokimyasal testler ile elde edilen sonuçlar tanımlamaya destek olabilir. Özellikle laboratuvarın lateks aglütinasyon ve/veya DFA yapma imkanı yoksa hızlı hippurat testi ve beta-laktamaz testinden yararlanabilir. Bütün *L. pneumophila* izolatları hippuratu hidrolize ederler. Diğer türlerin ise hemen hiçbir hippuratu hidrolize etmezler (*Legionella spiritensis* ve *Legionella waltersii* gibi çok azı hariç). Pratik olarak vakaların en büyük kısmından *L. pneumophila*'nın sorumlu olduğu göz önüne alınacak olursa; paralel pasajda kanlı agarda ürememiş bir suşun hippurat pozitif bulunması, güçlü bir şekilde onun *L. pneumophila* olabileceğine işaret eder. Beta-laktamaz testi de *L. pneumophila*'yı (pozitif) diğer türlerden (ör., *L. micdadei*) ayırt eder ki daha çok tanımlamada hangi antiserumun kullanılacağına karar verebilmek için yararlanılması önerilir. Hippurat testi ve/veya beta-laktamaz testi ile ön tanı konmuş izolatlar kesin tanı için geçerli yöntemleri kullanan bir laboratuvara gönderilerek **teyit edilmelidirler**.

5.5. Sonuçların rapor edilmesi

Negatif kültürler

- Ön rapor "Henüz *Legionella* üremesi saptanmamıştır" şeklinde verilir.
- Final rapor "7 gün inkübasyon sonunda *Legionella* izole edilememiştir" şeklinde verilir.

Pozitif kültürler

- Eğer pozitif sonuç polivalan DFA veya lateks test reajeni ile elde edilmiş ise "*Legionella* spp üredi" şeklinde rapor edilir.
- Eğer pozitif sonuç monovalan reaktif ile elde edilmiş ise rapor tür adını içerecek şekilde (ör., "*Legionella pneumophila* SG1 üredi") verilir.

5.6. Kültür için sınırlılıklar

- Legionellalar rifampine, makrolitlere (azitromisin, eritromisin) ve kinolonlara (ör., levofloksasin) duyarlıdır. Tedavi sırasında direnç gelişimi de bildirilmemiştir. Bu nedenle ya da başka bir tedavi gerekçesi ile "en iyi" antibiyotiğin seçimi için *in-vitro* antibiyotik duyarlılık testi yapılmasına gerek yoktur ve yapılmamalıdır (13).
- Legionellalar hücre-içi patojenlerdir ve antibiyotik tedavisinden haftalar sonra bile hücre içinde bulunmaya devam edebilirler. Bu nedenle kültür tedaviye yanıtı izlemek için kullanılmaz. Hastanın klinik yanıtı, tedaviye yanıtın en iyi göstergesi kabul edilir (13).
- Negatif kültürler hastalığı dışlamaz. Kültür tanıda en duyarlı araçlardan biri olsa da, duyarlılık; örnek alınmasındaki hatalar, floranın baskılayıcı etkisi, antimikrobiyal tedaviye başlanmış olması gibi birçok faktörden etkilenebilir.
- *F.tularensis*, *Bordetella pertussis* ve *Afipia*'lar BCYE'de ürerler fakat kanlı agarda üremezler. Bu özellikleri nedeniyle legionellalarla karışabilirlerse de *F. tularensis* ve *B. pertussis* hareketsiz olmaları ile ve sonucusu da koloni görünümü ile ayırt edilebilirler.
- Rutin uygulama için mevcut kitlerin içeriğindeki antiserumlar bazı legionellaları tanımlamak için yeterli olmayabilir. Böyle şüpheli izolatlar tanımlanmak üzere Referans merkeze (bkz. Sayfa 22) gönderilmelidir.

5.7. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Referans laboratuvar moleküler tiplendirme yöntemleri ile hastadan ve olası kaynaktan elde edilen *Legionella* izolatlarının epidemiyolojik ilişkili olup olmadığını analiz edebilir, bir salgınla ilişkileri olup olmadığını ortaya koyabilir. Bu incelemeler hem halk sağlığı önlemleri için ilgili otoritelere yol gösterici sonuçlar üretir; hem de -*özellikle seyahat- ilişkili Lejyoner hastalığı vakalarında gündeme geldiği için önem kazanmış olan*- hukuki durumlarda sorunun çözümüne yönelik bilimsel veri sağlar. Bu nedenlerle mümkün olduğunca izolatlar ileride epidemiyolojik amaçlarla kullanılabileceği düşünülerek saklanmalıdır.
- Saklama için *Legionella* izolatlarının steril 'skim-milk' veya gliserollü

buyyon içinde yoğun süspansiyonu yapılır ve derin dondurucuya kaldırılır (suş saklama prosedürü için bkz. UMS-B-TP-01).

- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (28) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Pozitif bulunan klinik örnekler de -80°C'de saklanmalıdır.

6 Tanıda diğer yöntemler

6.1. DFA

- Balgam ve diğer alt solunum yolu örnekleri *Legionella* bakterisinin bulunup bulunmadığını görmek için DFA ile doğrudan incelenebilir.
- DFA için *Legionella* türlerine ve serogruplarına karşı tavşanlarda elde edilmiş ve FITC ile işaretlenmiş antikorları içeren antiserumlar (monovalan veya polivalan) kullanılır. Antikorlar örnekteki homolog *Legionella* türüne bağlandığında onları görünür hale getirir ve floresan mikroskopta UV ışık altında izlenirler. Değişik ticari kitler mevcuttur. Kit, üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılmalıdır.
- DFA için klinik örnekler "kültür" için örnek hazırlama tekniklerinde tarif edildiği gibi hazırlanabilirler (kitin talimatında aksi belirtilmiyorsa).
- DFA testi yapılırken kontrol lamaları kesinlikle örnek lamlarından ayrı kaplarda yıkanmalıdır. Çünkü yıkama esnasında lamalar arasında madde geçişi olabilmekte; pozitif kontrol lamından kopan bakteriler örnek lamına yapışabildiği için sonuç yanlışlıkla pozitif okunabilmektedir.
- DFA hızlı bir yöntemdir; 2-3 saat içinde sonuç alınabilir. Ancak testin duyarlılığı ve özgüllüğü örnekteki *Legionella* sayısı, inceleyen kişinin deneyimi, diğer bakterilerle (*Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas* sp, *Flavobacterium* sp, vb.) çapraz reaksiyon verme olasılığı gibi pek çok faktörden etkilendiği için DFA testi pozitif bulunmuş olan vaka **olası vaka** olarak kabul edilmektedir (bkz. Standart Vaka Tanımları Saha Rehberi). Bu durumda kesin tanı için vakanın başka bir test ile de incelenmesi gerekir (14).
- DFA kültür izolatlarının teyit edilmesinde kullanılan iyi bir araçtır.

6.2. Seroloji

- Hastanın serum örneğinde antikor aranabilir. Bu amaçla IFA veya ELISA testi yapılabilir ve ticari kitler mevcuttur. Kitler üretici firmanın talimatı doğrultusunda kullanılır.
- IFA referans testtir. Ancak ELISA, otomatize cihazlarla uygulanabilmesi ve objektif değerlendirmeye uygun olması gibi nedenlerle giderek daha fazla laboratuvar tarafından tercih edilmektedir.
- Öte yandan, Lejyoner hastalığı tanısında serolojik incelemenin değeri sınırlıdır. Şüpheli olgularda akut dönemde serolojik inceleme ile elde edilecek sonuçlar tedaviye yön vermeye elverişli olmadığı için (çoğu

olguda antikor yanıtı 3. haftaya kadar, immün-baskılı kişilerde ise hemen hiç gelişmez) bu testlerin rutin kullanımı önerilmez (13,14,29).

- Akut fazda yüksek titre tespit edilse bile, antikorlar belirtisiz bir *önceki* enfeksiyona bağlı olarak gelişmiş olabileceğinden, tek başına tanı koydurucu kabul edilmez.
- *Legionella* türleri arasında ve diğer bakterilerle ortak antijenik yapılara bağlı çapraz reaksiyonlar olabileceği de hatırlanmalıdır.
- Sadece *L. pneumophila* SG1 için pnömonili bir olguda (1);
 - (a) tek serum örneğinde $\geq 1/256$ titre **olası tanı**, ve
 - (b) çift serum örneğinde paralel incelemede ≥ 4 kat titre artışı **kesin tanı** kriteri kabul edilir.
- Yeterli titre artışını görebilmek için 2. serum örneği akut fazdan en az 6 hafta sonra alınmalıdır ki, bu da uygulamada bir diğer sorundur (14).
- *L. pneumophila* SG1 dışındaki serogrup ve türler için elde edilen sonuçların ise başka testlerle teyit edilmesi gerekir (1,14,30). Yine de serolojik testler, çift serum örneğinde antikor aramak kaydı ile tanıdan ziyade hastane- veya toplum-kaynaklı salgınların izlenmesinde iyi bir araç olabilir (13).

6.3. Moleküler

- Lejyoner hastalığı tanısında nükleik asit tabanlı testler geliştirilme aşamasındadır. Henüz sorunları tam çözülmemiştir; piyasada geçerliliği kabul edilmiş (valide) ticari kitleri mevcut değildir (14). Halen dünyada daha çok referans ve araştırma laboratuvarları ile sınırlı ve *öz-yapım* tekniklerle çalışılmaktadır.
- Klinik örneklerden *L. pneumophila*'nın saptanmasına yönelik başarılı PCR uygulamaları rapor edilmiştir. Özellikle tekrarlayan testler ile alt solunum yolu örneklerinde PCR'in duyarlılığı kültür ile eşit veya daha yüksek bulunmuştur ve hastalığın hızlı tanısına duyulan ihtiyaç nedeniyle umut verici kabul edilmektedir.
- Ancak diğer klinik örneklerde duyarlılık belirgin düşüktür. Alt solunum yolu örnekleri, serum ve idrar için test duyarlılıkları sırasıyla %80-100, %30- 50 ve %50-90 olarak, özgüllükleri de $> \%90$ tahmin edilmektedir (13,30).
- Duyarlılık, örneğin alındığı evreden de etkilenmekte; hastalık ilerledikçe duyarlılık belirgin düşmektedir (Tablo 1). Geleneksel ve gerçek zamanlı PCR tekniklerinin her ikisi de kullanılır. Aynı anda diğer solunum yolu patojenlerini de saptamayı amaçlayan multipleks teknikler geliştirilmiş olsa da üstünlüğü tartışmalıdır.
- Çoğu laboratuvar hedef olarak *L. pneumophila*'ya özgü 'macrophage infectivity protein' (*mip*) gen bölgesini tercih etmektedir. *Legionella* cinse özgü olarak da hedef gen bölgesi rRNA olup 16S ya da 23S dizileri kullanılır.
- Mevcut durumda **klinik örneklerden** PCR ile pozitif sonuç **olası tanı** kabul edilmektedir. Buna karşın PCR kültürlerden elde edilmiş şüpheli **izolatların doğrulanmasında** iyi bir araçtır.

7 Bildirim

Lejyoner hastalığı **bildirimi zorunlu** bir hastalıktır! Üriner antijen ya da kültür ile elde edilen **pozitif sonuçlar** hemen (1,2,3);

- hastane-kaynaklı enfeksiyon olasılığında hem hastanın hekimi hem de enfeksiyon kontrol komitesine bildirilmelidir;
- seyahat-ilışkili olsun veya olmasın, mevcut bildirim sistemine göre İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne bildirilmelidir. Bildirim klinisyenin sorumluluğudur. Bununla birlikte (Lejyoner hastalığının *laboratuvar*dan *bildirimi* zorunlu olmasa da) pozitif sonuç elde edilir edilmez laboratuvarın ilgili birimlere haber vermesi (ör., telefon ile) önerilir. Bu rutin yoldan gereken toplam süreyi kısaltacağı ve epidemiyolojik incelemelerin erken başlatılmasını sağlayacağı için idealdir.

8 Tanıda olası sorunlar/sınırlılıklar

- Lejyoner hastalığı tanısında henüz tek başına bütün gerekleri yerine getiren (hızlı, yüksek düzeyde duyarlı ve özgül, türlerin ve serogrupların ayırımına izin veren ve hastalığın herhangi bir döneminde tanı konmasına imkan veren) bir teknik mevcut değildir.
- Üriner antijen testi ve kültür öncelikli seçeneklerdir. Ancak negatif sonuç hastalık olmadığını göstermez. Bu nedenle tanı olasılığını yükseltmek için bir hastadan değişik klinik örneklerin (balgam veya diğer alt solunum yolu materyali, idrar ve serum) incelenmesi ve farklı tekniklerin bir arada kullanılması idealdir (Şekil 1).

9 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal *Legionella* Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 458 2167 / 2000, 1727

Görev çerçevesi

Kontrol programı kapsamında klinik ve çevresel örneklerden *Legionella pneumophila* serogrupları, alt tipleri ve diğer *Legionella* türleri için tanı, doğrulama, moleküler tiplendirmelerin yapılması; bölgesel laboratuvarlara dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması

Ekler

Ek-1 *Legionella* besiyerlerinin hazırlanması^{26,27}

1000 mL için gerekli maddeler

Maddeler	BCYE	PAV	PAC	BMPA ⁹
ACES ¹	10.0 g	10.0 g	10.0 g	10.0 g
Maya özütü (yeast extract) ²	10.0 g	10.0 g	10.0 g	10.0 g
Agar ²	17.0 g	17.0 g	17.0 g	17.0 g
Aktif kömür ²	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g
α -Ketoglutarik asit ²	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g
1N KOH ³	55 mL	55 mL	55 mL	2.4 g
Deiyonize su ^{4,5}	985 mL	980 mL	982 mL	980 mL
L(+) sistein ⁶	0.4 g	0.4 g	0.4 g	0.4 g
Ferrik pirofosfat ⁶	0.25 g	0.25 g	0.25 g	0.25 g
BCP ⁷ (10mg/mL)	-	1 mL	-	-
BTP ⁷ (10mg/mL)	-	1 mL	-	-
Vancomycin HCl ⁸ (1mg/mL)	-	1 mL	-	-
Polymyxin B ⁸ (50.000 U/mL)	-	1.6 mL	1.6 mL	(80.000 U)
Anisomycin ⁸ (40mg/mL)	-	1 mL	1 mL	(80 mg)
Cefamandole-Lithium salt ⁸ (4mg/mL)	-	-	1 mL	(4 mg)

Agar bazın hazırlanması

- İlk olarak ACES tartılır; 2 litrelik bir erlene konur; 700 mL distile su ilave edilir. Manyetik karıştırıcıda, hafif ısıtılarak eriyinceye kadar karıştırılır.
- Ardından maya özütü, agar, kömür ve α -ketoglutarik asit eklenir, karıştırılır.
- Yavaş yavaş 1N KOH ilave edilir, iyice karışması sağlanır (~5 dakika). Sonra pH ölçülür; pH 6.9-6.97 aralığında olmalıdır; altında ise azar azar 1N KOH ekleyerek ayarlanır.
NOT: Baz besiyerinde 1N KOH miktarı 50-55 mL'dir ve yaklaşık 2.4 g KOH pellete karşılık gelmektedir. Pelletten ziyade sıvı halde ilave etmek tercih edilir. Özellikle kullanılan deiyonize suyun pH'si kullanılacak KOH miktarını etkilediğinden laboratuvar besiyerine koyacağı KOH miktarını, pH ölçümleri yaparak belirlemelidir.
- Tabloda verilen su miktarları supplement niteliğindeki maddeler eklenmeden önceki yaklaşık volümlerdir. **Otoklava koymadan önce** besiyerine 1000 mL'ye tamamlamak için eklenecek su miktarı hesaplanmalı (şu aşağıdakilerin toplamı 1000 mL'den çıkarılarak) ve eklenmelidir:
 - bu ana kadar ulaşılan toplam volüm hesaplanır; pH ayarlaması esnasında kullanılan *ekstra* KOH miktarı dikkate alınarak gerekirse her seferinde yeniden hesaplanmalıdır.

- (b) bundan sonra ilave edilecek sıvı maddelerin (L-sistein, ferrik pirofosfat; PAV ve PAC için antibiyotikler vb.) toplam volümü hesaplanır.
5. Erlenin ağzı kapatılıp otoklava konur ve 121°C'de 20 dakika steril edilir.

Suplementlerin hazırlanması

6. Besiyeri otoklavlanırken bir yandan da iki küçük erlen (25 mL) alınır; erlenin birine L-sistein, diğerine ferrik pirofosfat tartılır. Her birine 11 mL deiyonize su konur. Oda ısısında ~1 saat erimeye bırakılırlar. Eridikten sonra her biri membran filtrasyon (enjektör tipi, 0.2µm) ile steril tüplere aktarılırlar.
7. BTB ve BCP önceden 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanır, etiketlenir; buzdolabında 1 yıl saklanır. Bu hazır boyalardan 1'er mL aşağıda belirtilen aşamada besiyerine konacaktır.
8. Antibiyotikler, stok solüsyon olarak (besiyerinin 1 litresine konması gereken miktar 1 mL'de olacak şekilde) önceden hazırlanır ve 1.1 mL'lik alikotlar halinde -20°C'de saklanır. Besiyeri hazırlanırken antibiyotik stok solüsyonu oda ısısında eritilir ve aşağıda belirtilen aşamada besiyerine ilave edilir. Antibiyotik stok solüsyonu hazırlanması için bir örnek prosedür Ek-2'de verilmiştir.
9. BMPA besiyeri liyofilize halde kendi besleyici ve antibiyotik supplementleri ile piyasadan temin edilerek kullanılır. Hazırlanırken üretici firmanın talimatı takip edilmelidir. BMPA'da anisomisin PAV ve PAC'in içerdiğinin iki katıdır.

Besiyerinin dökülmesi

- Otoklavdan çıkarılan besiyeri önceden 55°C'a ısıtılmış su banyosuna konur, soğuması beklenir (besiyeri miktarına göre 30-60 dakika sürer).
- Besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcıya konur, karıştırılmaya başlanır.
- Steril L-sisteinden 4 mL ve ferrik pirofosfattan 10 mL besiyerine ilave edilir.
- Eğer PAV veya PAC hazırlanıyorsa derin dondurucudan çıkarılıp eritilmiş antibiyotikler de bu aşamada tabloda verilen miktarlarda ilave edilir.
- İyice karışması beklenir ve tekrar pH kontrolü yapılır. Bunun için;
 - (a) Aseptik şartlarda 2-3 mL besiyeri küçük bir tüpe alınır, donması beklenir.
 - (b) pH metre probu besiyerine daldırılarak pH ölçülür.
 - (c) pH <6.9 ise steril 1N KOH, >6.97 ise steril 1N HCl azar azar eklenerek pH ayarlanır.
- Önceden UV lambası açılmış ve ~30 dakika ortam dekontaminasyonu sağlanmış odada besiyeri dökme işlemine geçilir. Bütün plaklar önceden besiyerinin adı ve hazırlama tarihi yazılarak etiketlenmiş olmalıdır. Besiyeri dökülen plaklar bir gece üzeri temiz bir örtü ile kapatılarak bekletilir. Ertesi gün plaklar -kapaklar alta gelecek şekilde- ters çevrilir, naylon torbalara kaldırılır; torba üzeri hazırlama tarihi ve son kullanma tarihi (SKT) yazılarak etiketlenir; kapakları altta kalacak şekilde buzdolabında saklamaya alınır; raf ömrü 2 aydır (bu şekilde nem kaybı önlenerek saklandığında). Torbaların içine aşırı nemlenme olasılığı için silika-jel paketleri konabilir.
- Hazırlanan her besiyeri serisinden kalite kontrol yapılır

Ek-2 Besiyeri kalite kontrol

Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca "sterilite kontrolü", "üreme kontrolü" ve "seçici özellik kontrolü"nü kapsar.

Sterilite kontrolü

Yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilirler.

Üreme ve seçici özellik kontrolü

Pozitif kontrol hazırlanması

- "Üreme kontrolü" için pozitif kontrolün orijinal örnekten hazırlanması idealdir. Bir Lejyoner hastalığı vakasının solunum yolu veya doku örneğinin alikotları kalite kontrol için en iyi kaynaktır. Yaklaşık 1 yıl -80°C'de saklanabilir.
- Klinik örnek mevcut değilse yeni (henüz hiç pasajlanmamış veya az pasajlanmış) bir *L.pneumophila* izolatu kullanılabilir. Böyle bir suş referans laboratuvarından temin edilebilir.
 - (a) Suşun BCYE'ye bir pasajı yapılır. Bu pasajdan steril TSB içinde McFarland standart No1 yoğunluğunda bir süspansiyon hazırlanır.
 - (b) Süspansiyon eşit miktarda steril %10'luk skim milk ile karıştırılır. Küçük alikotlar halinde -80°C'ye kaldırılır; böylece ~5 yıl saklanabilir.
- "Seçici özellik kontrolü" ise PAV ve PAC gibi antibiyotik içeren besiyerlerine uygulanır. Bu amaçla kullanılacak *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* ve *Candida albicans* suşları da (a) ve (b) de tarif edildiği gibi hazırlanmalıdır.

Kalite kontrolün uygulanması

- Derin dondurucudan bir alikot *Legionella* süspansiyonu çıkarılır; eritilir ve steril TSB ile 1/100 oranında sulandırılır; 10 µL standart öze ile test edilecek besiyeri (BCYE, PAV, PAC) plağına bir öze dolusu ekim yapılır. 48 saat 36°C'de inkübe edilir ve koloni sayımı yapılır. Orijinal süspansiyonun tam konsantrasyonuna bağlı olarak 50 ila 200 arasında koloni sayılmalıdır.
- PAV veya PAC'nin seçicilik kontrolü için ise *P. aeruginosa*, *S. aureus*, ve *C.albicans*'ın derin dondurucudaki alikotlarından birer adet çıkarılır; steril TSB ile 1/100 oranında sulandırılırlar; 10 µL standart öze ile test edilecek plaklara inoküle edilirler. Plaklar 24-48 saat 36°C'de inkübe edilir ve koloni sayımı yapılır. *P. aeruginosa* için 0-50 arasında koloni sayılabilir; *S. aureus* ve *C.albicans* ise ürememiş ("0" koloni) olmalıdır.

Kayıtların tutulması

- Her besiyeri lotunun sterilite ve koloni sayım sonuçları kaydedilmelidir. Derin dondurucuda saklanan inokulumda canlı organizma sayısı zamanla azalabilir. Koloni sayımında düşüş görülmesi buna bağlı olabileceğinden besiyerinin kalitesinde bir azalma gibi yorumlanmamalıdır. Bu olasılığı değerlendirmek için aynı lot taze bir izolat ile test edilir ve sonuç karşılaştırılır.

Ek-3 Stok antibiyotik solüsyonu hazırlanması^{26,27}

Prensip

Bir besiyerinin **seçici** olması, besiyerine, üremesi istenen bakterinin dirençli, diğerlerinin ise duyarlı olduğu antimikrobiyal (bazen de tellürit, boya vb.) maddelerin eklenmesi ile sağlanır. Besiyerindeki antibiyotik konsantrasyonu kritik öneme sahiptir. Konsantrasyon arttıkça izole edilmek istenen bakteri üzerindeki inhibitör etki de artabilir. Konsantrasyon düşük kaldığında ise istenmeyen bakterilerin üremesi artar. Bu nedenle antibiyotik tartımı, hazırlanması ve saklanması maksimum hassasiyet gösterilmesi önem kazanır.

Besiyerlerine konacak antibiyotikler besiyerinin 1 litresinde bulunması gereken miktarın 1 mL içinde sulandırılması prensibine göre hazırlanır. Bu şekilde hazırlanan antibiyotik (stok solüsyon) -20°C'de saklanır.

Gereç, donanım

- Hazırlanacak antibiyotik
- Membran filtre (enjektör ucu tipte, 0.2 µm)
- Tüpler, steril, burgu kapaklı (50 mL)
- Derin dondurucu tüpleri, steril (1.5 mL)
- Biyogüvenlik kabini
- Hassas terazi (0.001 g)
- Otomatik pipetler
- Derin dondurucu (-20°C, -85°C)

Formül, tartım

Tartım için şu formül kullanılır:

$$\frac{\text{Tartılacak miktar (mg)} \times \text{Aktivite (µg/mg)}}{\text{Volüm (mL)}} = \text{İstenen konsantrasyon (µg/mL)}$$

- Ambalajı üzerinde "aktivite" değeri belirtilmemiş antibiyotikte aktivite 1000µg/mg olarak kabul edilir.
- "Tartılacak miktar" terazinin hassasiyet kapasitesine göre kararlaştırılır.
- Hassas terazi en az 0.001g hassasiyette olmalıdır. Böyle bir hassas terazide bir kerede güvenli olarak tartılabilecek en küçük miktar ~20 mg'dır. Daha düşük ağırlıkta tartımdan kaçınılmalıdır.
- *Örneğin;* 1 mg/mL'lik antibiyotik stok solüsyon yapmak için en az 20 mg tartım yapmak gereği göz önüne alınırsa -aktivite de (µg/mg) hesaba katılınca- en az 20 mL dilüent ile sulandırım yapılacağı hesaplanır. Bu miktar yaklaşık 20 litre besiyeri içindir.

Stok antibiyotiğin hazırlanması

- Tartılacak miktar belirlenip istenen konsantrasyona göre sulandırım volümü hesaplandıktan sonra, antibiyotik tartılır.
- Dilüenti ile sulandırılır. Dilüent çoğu kez "su"dur; ancak bazı antibiyotikler HCl veya diğer bazı çözücüler içinde eritilebildiğinden, dilüentin antibiyotiğe göre değişebileceği akılda tutulmalıdır.
- Eritilmiş antibiyotik stok solüsyonu membran filtre ile steril edilir.
- Önceden etiketlenip hazırlanmış 1.5 mL'lik steril tüplere, her 1 L besiyeri için 1 mL olacak şekilde (ya da tüp çeperine bulaşacak miktar da hesaba katılarak, 1.1 mL) dağıtılır.

NOT: Eğer besiyeri daha az miktarlarda dökülüyorsa alikotlar da buna göre daha küçük tutulabilir. *Örneğin*; 250 mL besiyeri için 250 µL stok antibiyotik gerekir; bu durumda tüp çeperine bulaşacak miktar hesabıyla 300 µL'lik alikotlar hazırlamak iyi olur.

- Tevzi edilmiş antibiyotik solüsyonu derin dondurucuda 2 yıl saklanabilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Lejyoner Hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda verilen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-01 Suş saklama prosedürü

UMS, B-TP-03 Gram boyama

UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı 2004, Ankara.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (erişim tarihi: 06.01.2014).
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014).
- 3 Seyahat İlişkili Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı Genelgesi. Sağlık Bakanlığı, TSHGM, 01/05/2001-34.
- 4 Stout JE, Yu VL. Current concepts: Legionellosis. *N Engl J Med* 1997;337:682-7
- 5 Woo AH, Yu VL, Goetz A. Potential in hospital mode of transmission for *Legionella pneumophila*: demonstration experiments for dissemination by showers, humidifiers, and rinsing of ventilator bag apparatus. *Am J Med* 1986;80:567-72.
- 6 Yu VL. Could aspiration be a major mode of transmission for *Legionella*? *Am J Med* 1993;95(1):13-5.
- 7 Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-526.
- 8 Ozerol IH, Bayraktar M, Cizmeci Z, Durmaz R, Akbas E, Yildirim Z, Yologlu S. Legionnaire's disease: a nosocomial outbreak in Turkey. *J Hosp Infect* 2006; 62(1): 50-7
- 9 World Health Organization. *Legionella* and the prevention of legionellosis. WHO. Geneva, 2007.
- 10 Akbaş E, Gözalan A, Dalkılıç İ. Aynı aileden iki bireyin etkilendiği seyahat-ilişkili Lejyoner hastalığı. *Flora* 1999; 4 (3): 206-9
- 11 Sopena N, Sabria-Leal M, Pedro-Botet ML, Padilla E, Dominquez J, Morera J, Tudela P. Comparative study of the clinical presentation of *Legionella pneumophila* and other community acquired pneumonias. *Chest* 1998;113:1195-1200.
- 12 Vergis EN, Akbas E, Yu VL. *Legionella* as a cause of severe pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 2000;21(4):295-304.
- 13 Pasculle AW, McDevitt D. *Legionella* cultures. In: Garcia LS (ed in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.11.4.1 - 14.
- 14 Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S (eds.) *Legionella* and the prevention of legionellosis. ISBN 92 4 156297 8. World Health Organization, 2007.
- 15 den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:871-878.
- 16 Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM. Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J Clin Microbiol* 1993;31:2764-2768

- 17 Ingram JG, Plouffe JF. Danger of sputum purulence screens in culture of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 1994;32:209-210.
- 18 Formica N, Yates M, Beers M, Carnie J, Hogg G, Ryan N, Tallis G. The impact of diagnosis by legionella urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of legionnaires' disease. *Epidemiol Infect* 2001;127:275-280.
- 19 Alvarez J, Dominguez A, Sabria M, et al. Impact of the *Legionella* urinary antigen test on epidemiological trends in community outbreaks of legionellosis in Catalonia, Spain, 1990-2004. *Int J Infect Dis* 2009;13:e365-e370.
- 20 Helbig JH, Uldum SA, Luck PC, Harrison TG. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. *J Med Microbiol* 2001;50:509-516.
- 21 Harrison T, Uldum S, Alexiou-Daniel S, et al. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:359-365.
- 22 Benson RF, Tang PW, Fields BS. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2763-2765.
- 23 Campese C, Bitar D, Jarraud S, et al. Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998-2008. *Int J Infect Dis* 2011;15: e30-e37
- 24 Edelstein PH. *Legionella*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 770-785
- 25 Diederer BMW, Peeters MF. Evaluation of two new immunochromatographic assays (Rapid U *Legionella* Antigen Test and SD Biotest *Legionella* Antigen Test) for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J Clin Microbiol* 2006;44:2991-2993.
- 26 *Legionella* Çalışmasında Genel Amaçlar için Standart Laboratuvar Prosedürleri. *Legionella* Referans Laboratuvarı Uygulama Kitapçığı-1. Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara, 2005.
- 27 Stout JE. Culture methodology for *Legionella* species. HC Special Report 308. HC Information Resources. Falbrook CA, 1998.
- 28 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 - 27710.
- 29 Monforte R, Estruch R, Vidal J, Cervera R, Urbano-Marquez A. Delayed seroconversion in Legionnaires' disease. *Lancet* 1988;2:513.
- 30 Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:64-69.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

***Salmonella* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-08
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	4
GENEL BİLGİ	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
<i>Salmonella</i> enfeksiyonlarının önemi	5
Mikrobiyolojik tanı	6
TEKNİK BİLGİLER	8
1 Hedef mikroorganizmalar	8
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	8
3 Salmonelloz tanısında kullanılan teknikler	11
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	17
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	18
6 Referans Laboratuvar	19
EKLER.....	20
Ek-1 Besiyeri kalite kontrol suşları ve beklenen reaksiyonlar	20
Ek-2 <i>Salmonella</i> şüpheli izolatlardan aglütinasyon testlerinin yapılması	21
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	22
KAYNAKLAR.....	22

Kapsam ve Amaç

Salmonella türleri insanda başlıca akut enterokolit (gastroenterit), enterik ateş (tifo ve paratifo), bakteriyemi ve lokal enfeksiyonlara neden olabilen ya da kronik taşıyıcılık yoluyla insanda bulunabilen mikroorganizmalardır.

Akut enterokolit sıklıkla *Salmonella* Enteritidis ve *Salmonella* Typhimurium suşlarının neden olduğu enfeksiyonlardır. Doğada vahşi ve evcil hayvanlar arasında yaygın olan bu etkenler insanlara en çok enfekte hayvan ürünlerinden hazırlanmış gıdaların tüketilmesiyle ve hayvan çıkartılarıyla kontamine olmuş sularla bulaşır. Hazır gıda veya hızlı-gıda tüketimi sektörü aracılığı ile kontamine gıdaların yayılması kitlesel salgınlarla sonuçlanabilmektedir.

Enterik ateş (tifo) ise *Salmonella* Typhi'nin neden olduğu ciddi bir kan akımı enfeksiyonudur. *S. Typhi*'nin doğadaki tek konağı insandır ve diğerlerinden farklı virülans özelliklerine sahiptir. Neden olduğu hastalık bugün en sık gelişmekte olan ülkelerde görülüyorsa da suyun insan kaynaklı fekal kirlenmesinin bir sonucu olarak yayılabileceğinden, bu potansiyelin olduğu her yerde *S. Typhi* halk sağlığı açısından önemini korumaktadır. *Salmonella* Paratyphi A, Paratyphi B ve Paratyphi C de tifoya benzer bir klinik tabloya yol açarlar.

Ülkemizde bütün *Salmonella* enfeksiyonlarının bildirimi zorunludur; tifo bildirim listesinde A grubunda yer alan bir hastalık olarak klinisyenin, akut gastroenterit etkeni *Salmonella* türleri de D grubunda yer alan etkenler olarak tanımlandıkları takdirde, laboratuvarların bildirim yükümlülükleri vardır (1,2). *Salmonella* enfeksiyonlarının tanısı laboratuvar incelemesine dayanır. **Kesin tanı**, şüpheli kolonilerin biyokimyasal testlerle *Salmonella* sp olarak ayırt edilmesi ve özgül antiserumlarla *en azından* serogrubunun belirlenmesiyle konur.

Dışkıdan *Salmonella* tanısı *Shigella* spp ile birlikte klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının en yaygın tanı işlerinden biridir. Mikrobiyoloji alanının gelişmeye başladığı yıllardan bu yana bilinen bu etkenlerin tanısında ciddi bir gelenek birikimi de vardır.

Bununla birlikte, ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından 2012 yılında ulusal klinik mikrobiyoloji laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun incelendiği çalışmanın sonuçlarına göre laboratuvarların (n=530) önemli sayılabilecek bir kısmında dışkıdan *Salmonella* spp tanısının geçerli olmayan tekniklere dayandığı izlenmiştir. Dışkıda *Salmonella* incelemesi yapabildiğini beyan eden laboratuvarların (n=250) ancak %40.4'ünün **geçerli** bir prosedür ile tanı koyabildiği dikkati çekmektedir (3). Dolayısı ile vakaların önemli bir kısmının hatta salgınların tanımlanamadığı, hasta yönetimi ve epidemiyolojik çalışmaların da bu durumdan olumsuz yönde etkilendiği öngörülebilir.

Bu nedenle tanıda kabul edilmiş standartlara uygun bir prosedürün el altında olması tanının yaygınlaşmasını ve güvenilir sonuçlar üretilmesini teşvik edecek bir araç olarak önemli görünmektedir.

Bu UMS belgesinde de tanıda geçerli teknikler ile *Salmonella* spp'nin doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasına yardımcı bir Rehber verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

AMD	Antimikrobiyal duyarlılık (testi)
DCA	Deoksikolat sitrat agar
HE	Hektoen-Enterik (agar)
KIA	Kligler Iron Agar
MAC	MacConkey agar
MHA	Mueller Hinton agar
non-tifoidal	tifoza (enterik ateş) neden olmayan <i>Salmonella</i> spp'yi tanımlamak için kullanılır
ONPG	Orto-nitro-fenil β -galaktopiranozid (β -galaktozidaz testi)
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
SS	<i>Salmonella-Shigella</i> (agar)
TSB	Triptik soy buyyon
TSI	Triple Sugar Iron (agar)
UEPLA	Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı
XLD	Xylose lysine deoxycholate (agar)

Genel Bilgi

Mikroorganizmanın özellikleri

Salmonella'lar insanların ve birçok hayvan türünün bağırsak parazitidir. Bu hayvanlar arasında evcil hayvanlar, vahşi kuşlar ve kemiriciler de vardır. Dere, ırmak ve diğer su kaynaklarında, toprakta bulunurlar (4).

Enterobacteriaceae ailesinde bulunan *Salmonella* cinsinde *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür bulunmaktadır. *Salmonella enterica* türü ise 6 alt türe (I=*enterica*, II=*salamae*, IIIa=*arizonae*, IIIb=*diarizonae*, IV=*houtenae*, VI=*indica*) ayrılmaktadır. İnsan izolatlarının çoğu *Salmonella enterica* türünde yer alır. Sınıflandırma ve adlandırmanın yaratacağı karışıklığı önlemek için CDC'nin de önerisi ile *Salmonella enterica* subspecies *enterica* içinde yer alan serotiplerin tür adları gibi sınıflandırılma alışkanlığı sürmektedir. Örneğin, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotip *Typhimurium* yerine *Salmonella* serotip *Typhimurium* veya *Salmonella* *Typhimurium*; hatta kısaca *Typhimurium* şeklinde kullanılması, bu arada serotip isminin büyük harfle başlaması ama italik yazılmaması kabul edilmektedir (4,5).

Salmonella'ların doğal yerleşim yeri gastrointestinal sistemdir. Bununla birlikte çevrede, cansız ortamlarda uzun süre canlı kalabilirler; çoğalamazlar ancak hayvan veya insan dışkı ile çevreye atıldıktan sonra uygun koşullar altında suda haftalarca, toprakta yıllarca barınabilir; enfeksiyona veya re-enfeksiyona hazır kaynak oluştururlar. *Salmonella*'lar insanların tükettiği aralarında sebze ve meyvelerin de bulunduğu birçok gıdadan izole edilebilirler.

Salmonella enfeksiyonlarının önemi

Salmonella enfeksiyonları tüm dünyada yaygındır ve tanımlandığı yıllardan beri üzerinde çok durulmuştur. Son yıllarda tifo insidansının azaldığı, buna karşın *Salmonella* gastroenteritlerinde artış olduğu gözlenmektedir.

S. Typhi, sadece insanlarda enfeksiyon yapar.

Hastalığı geçiren bireyler düşük bir oranda da olsa bakteriyi taşımaya devam edebilirler ve hastalığın yayılmasında rol oynayabilirler. *S. Typhi* sağlıklı ve duyarlı kişilere hastalardan veya bu taşıyıcılardan bulaşır. Genel olarak bulaşma fekal-oral yolla olmaktadır. Tifo vakaları dışkı ve idrar ile bol miktarda bakteri atarlar. Hastalar belirtiler geçtikten sonra ortalama 5 hafta salgılarıyla bakteriyi yayarlar. Olguların %90'ı, belirtiler geçtikten 9 hafta sonra kültür negatif hale gelirler. Özellikle kişisel hijyen şartlarının yeterli olmadığı çevrelerde taşıyıcıların gıdaların kontaminasyonundan büyük ölçüde sorumlu oldukları düşünülmektedir. Ayrıca suların insan kaynaklı fekal kirlenmesi (suya kanalizasyon karışması) *S. Typhi*'nin yayılmasında önemli bir yoldur.

İnsanda hastalık yapan diğer salmonellaların başlıca kaynağı hayvansal gıdalar olmakla beraber, çevrenin hayvan kaynaklı fekal kirlenmesi nedeniyle kontamine olmuş sular ve sebzeler de önemlidir. Kesimhanelerde kendi barsak içeriğinden kontamine olmuş tavuk etleri ve yumurta salmonellozlarda en sık sorumlu bulunan gıdalar arasındadırlar.

Salmonella enfeksiyonları endemik bölgelerde, yaz ve sonbahar aylarında sık görülür. Enfeksiyon cinsiyet ayrımı göstermez, çocuklarda ve genç erişkinlerde sıktır. Aile içi bulaşma eğilimi görülür. Hastane enfeksiyonlarına ve salgınlarına neden olurlar. AIDS hastaları, ağır, kronik ve bakteriyemi ile seyreden *Salmonella* enfeksiyonuna yakalanma riski altındadır.

Enterik ateşin dünyada her yıl, özellikle gelişmekte olan bölgelerde 20 milyondan fazla kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde insidens belirgin düşüktür. ABD'de her yıl yaklaşık 5700 vaka görülmektedir; bunların da önemli bir kısmı (%75'den fazlası) az gelişmiş bölgelere seyahat ile ilgilidir (6). Buna karşın her yıl tifo-dışı salmonellozların ise 1.2 milyon kadar olduğu, 20.000'den fazla kişinin hastaneye yatırılarak tedavi gördüğü tahmin edilmektedir (7).

Salmonella enfeksiyonları akut gastroenteritlerin bakteriyel etkenleri arasında genellikle *Shigella* spp ve *Campylobacter* spp ile birlikte ilk üç sırada yer almaktadır.

Ülkemizde Sağlık Bakanlığına laboratuvarlardan yapılan bildirimlere göre de benzer bir durum söz konusudur; *Salmonella* sp'nin bakteriyel etkenler arasında ilk sırada geldiği ve yılda 2000-3500 arasında vaka kaydedildiği dikkati çekmektedir (Tablo 1). Tifo vakalarında ise son yıllarda önemli bir düşüş olduğu görülmektedir. Bu değerlerin epidemiyolojik durumu ne ölçüde yansıttığı tam bilinmemektedir. Ancak yakın zaman önce yapılmış laboratuvar durum analizine bakıldığında salmonelloz tanısı koyabildiğini beyan eden laboratuvarların %60 kadarı tanıda geçerli yöntemleri kullanamıyor ise bir kısım vakanın tanımlanamadığı ve bildirimlerin buna bağlı olarak yetersiz kalıyor olabileceği de tahmin edilmektedir (3).

Mevcut epidemiyolojik verilerin daha güvenilir hale gelmesinde laboratuvarlara büyük rol düştüğü söylenebilir.

Tablo 1. 2008-2011 yıllarında ülke genelindeki laboratuvarlarda tanısı konmuş ve Sağlık Bakanlığına bildirilmiş bazı bakteriyel ve paraziter akut gastroenterit etkenlerinin (vakaların) dağılımı. Tabloda karşılaştırma amacıyla klinikten bildirim yapılan tifo ve akut kanlı ishal verileri de görülmektedir (Kaynak: THSK, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı [eski adı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü]; henüz yayınlanmamış veri)

Bildirilen etken/sendrom	2008	2009	2010	2011
Tifo	2214	301	305	123
<i>Salmonella</i> sp (gastroenterit etkeni olarak)	1993	2435	3463	2307
<i>Campylobacter</i> sp	170	313	157	182
<i>Shigella</i> sp	352	301	367	196
<i>Entamoeba histolytica</i>	32766	22278	22404	21692
<i>Giardia intestinalis</i>	14239	15322	14605	13426
Akut kanlı ishal*	7733	5939	88971	19733

* Akut kanlı ishal (AKI) bildirim klinisyen tarafından semptomlara dayalı olarak yapılmaktadır. Karşılaştırma amacıyla tabloda verilmiştir.

Mikrobiyolojik tanı

Salmonella enfeksiyonlarında kesin tanı mikrobiyolojik inceleme ile konur. Kültür tanıda 'altın standart'tır. Bakterinin izolasyonu kesin tanı koydurucudur ve izolatin hastalığın kaynağına dair yapılacak epidemiyolojik araştırma için büyük önemi vardır. Kültürün duyarlılığı -enfeksiyonun evresi, antibiyotik tedavisi, örneğin seçimi, hastanın örnek verme konusunda uyumu, örnekte bulunan bakteri miktarı, laboratuvarın deneyimi, uygun besiyerlerinin kullanımı gibi- pek çok faktörden etkilenebilir.

'Non-tifoidal' *Salmonella* enfeksiyonlarının tanısı, diğer enterik patojenler için de geçerli olduğu gibi daima, benzer tablolara neden olabilecek etkenlerin tanısı ile birlikte düşünülmelidir. Bazı durumlarda aynı epidemiyolojik kaynaktan köken alan diğer patojenlerin de *Salmonella* ile birlikte bireyi enfekte etmiş olabilecekleri ve aynı anda tanımlanabilecekleri hatırlanmalıdır.

Mikrobiyoloji laboratuvarları bulundukları coğrafi bölgede sık rastlanan patojen etkenlere uygun yöntemleri gözden geçirir ve uygularlar; rutin amaçlar için ve salgın ya da diğer özel durumlar için olmak üzere tanı setleri oluştururlar. Mevcut epidemiyolojik göstergeler, özellikle son yıllarda, başta hızlı gıda sektörü olmak üzere kanatlı kümes hayvanları tüketiminin büyük artış göstermesine paralel olarak *Campylobacter* enfeksiyonlarının üst sıralara çıktığına işaret etmektedir ve bu nedenle akut gastroenteritler için standart (rutin) tanı setinde *Salmonella* spp, *Shigella* spp ve *Campylobacter* spp birlikte yer almaktadır (8).

Ülkemizdeki bütün klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da - hasta yönetimi ve epidemiyolojik açıdan maksimum yarar göz önüne alındığında- akut ishal yakınması ile başvuran bütün dışkı örneklerine **asgari** bu patojenlerin tanısı için gerekli teknikleri uygulamalıdır.

Akut gastroenterit tanısı için rutin bakteriyolojik inceleme seti asgari Salmonella spp, Shigella spp ve Campylobacter spp tanısını koymak için uygun teknikleri içerecek şekilde tasarlanmalıdır!

Akut gastroenterit tanısı için dışkı örneklerinin zenginleştirme besiyerine ekimi önerilmemektedir. Zenginleştirme amacı ile Selenite-F veya GN sıvı besiyerine ekimlerin yalnızca temaslı veya taşıyıcı araştırmalarında (kreş-bakımevi, gıda sektörü gibi özel alan personelinden örnek alınmasında) uygulanması önerilir. Selenit-F'in bazı *Shigella* suşlarını inhibe olasılığı olduğu hatırlanmalıdır.

Akut gastroenterit tanısı için dışkı örnekleri doğrudan kültür besiyerlerine ekilir. Kültür için koyun kanlı agar gibi bir genel besiyerinin yanı sıra seçici/ayırt ettirici özellikte besiyerleri kullanılır. MacConkey agar (MAC) içerdiği kristal viyole ve safra tuzları ile gram pozitif mikroorganizmaları baskılayan, *Yersinia* spp dahil gram negatif enterik patojenlerin ise iyi üremesine ve koloni görünümüleri ile ayırt edilmesine izin veren düşük seçici özellikte bir besiyeridir. Hem *Shigella* hem de *Salmonella* izolasyonu için daha yüksek seçicilikte besiyerleri olarak XLD, DCA, SS ve HE sayılabilir. *S. dysenteriae* serotip 1 üremesini baskılama olasılığı nedeniyle SS agarın seçici besiyeri olarak tek başına kullanılmaması önerilir (8).

Kültürde üreme sonucu bakterinin biyokimyasal tanımlaması ve takiben uygun polivalan ve/veya monovalan antiserumlarla serogrup/serotip tayini için lam aglütinasyon testi yapılır. Kauffmann-White şeması üzerinden bakterinin O (somatik), Vi (kapsüler) ve H (flajel) antijenleri formülize edilir ve serogrup/serotip tayin edilir (9). En sık izole edilen *Salmonella* serotipleri ve enterik ateşe neden olan *Salmonella* serotipleri ise Tablo 2'de sunulmaktadır.

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının rapor verebilmesi için fenotipik bakteri tanımlaması ve O grup antiserumu ile *Salmonella* serogruplandırması yeterlidir. İleri düzeyde serotip tayini halk sağlığı surveyansı kapsamında olup, isolatlar ulusal referans laboratuvara gönderilir (2,9).

Komplike olmamış *Salmonella* gastroenteritlerinde antimikrobiyal tedavi önerilmez ve fekal isolatların rutin duyarlılık testleri tedavi amacına yönelik yapılmaz! Bununla birlikte antimikrobiyal direnç paternlerinin bilinmesi surveyans amaçları için değerlidir ve *Salmonella* isolatları arasında antimikrobiyal direncin gelişimi ve yayılımını izlemek için periyodik olarak yapılabilir.

Komplike olmuş, invazyon göstermiş *Salmonella* spp olguları ve tifo olgularında (*Salmonella* Typhi veya Paratyphi izole edilen) uygun antimikrobiyal tedavi çok önemlidir ve izolasyon sonrası mutlaka antimikrobiyal duyarlılık testi uygulanmalıdır (10,11,).

Özetlemek gerekirse akut gastroenteritlerden *Salmonella* **kesin tanısı**; (i) kültür plaklarındaki şüpheli kolonilerden, (ii) **biyokimyasal** olarak *Salmonella* türleri ile uyumlu bulunanların, (iii) özgül antiserumlar ile **serogrubu** tespit edilerek konur (8,9). Diğer bir ifade ile kesin tanı için (aynı zamanda bildirim esas tanı için) biyokimyasal tanımlama yapılması ve en azından polivalan antiserumlar ile serogrubun belirlenmesi gerekmektedir (1,2). Yalnızca biyokimyasal tiplendirme veya yalnızca serogrup tespitine dayalı sonuç tanı için geçerli kabul edilmez!

Enterik ateş tanısı da başta kan kültürü olmak üzere hastalığın evresine göre uygun zamanda alınan dışkı, idrar vb çeşitli klinik örneklerden etken *S. Typhi*'nin (ya da Paratifo etkenlerinin) izolasyon ve tanımlanmasına dayanır. Enfeksiyonun akut ve konvalesan fazında yükselen antikorların saptanmasına dayalı serolojik yöntemler, antikorların özgül olmayan nedenlerle de yükselme olasılığı nedeniyle tanıda geçerli bir yöntem olarak kabul edilmemektedir. Bu nedenle Gruber-Widal test veya diğer serolojik tanı amaçlı testlere dayalı sonuç tanı için geçerli kabul edilmez!

Tablo 2. Akut gastroenteritlerden en sık izole edilen *Salmonella* serotipleri ve enterik ateş etkenlerinin antijenik formülleri.

Sero grup	Serotip	Antijenik Formül	Sero grup	Serotip	Antijenik Formül
En sık izole edilen <i>Salmonella</i> serotipleri			Enterik ateş etkeni <i>Salmonella</i> tipleri		
D	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1,9,12; g,m; -	D	<i>Salmonella</i> Typhi	9,12,Vi; d; -
B	<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,4,5,12; i; 1,2	A	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	1,2,12; a; 1,2
	<i>Salmonella</i> Agona	4,12; f, g, s; -	B	<i>Salmonella</i> Paratyphi B	1,4,5,12; b; 1,2
	<i>Salmonella</i> Heidelberg	1,4,5,12; r; 1,2	C	<i>Salmonella</i> Paratyphi C	6,7,Vi; c; 1,5
	<i>Salmonella</i> Saintpaul	1, 4, 5, 12; e, h; 1, 2			
C	<i>Salmonella</i> Virchow	6,7; r; 1,2			
	<i>Salmonella</i> Infantis	6,7; r; 1,5			
	<i>Salmonella</i> Hadar	6,8; z10; e, n, x			
	<i>Salmonella</i> Newport	6,8; e, h; 1,2			
	<i>Salmonella</i> Kentucky	8, 20; i; z6			
	<i>Salmonella</i> Corvallis	8, 20; z4, z23; [z6]			
E	<i>Salmonella</i> Senftenberg	1, 3, 19; g, [s], t; -			

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Gastroenterit etkeni salmonellalar: 'non-tifoidal' *Salmonella* serotipleri
Enterik ateş etkenleri: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B ve C

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Dışkının mikrobiyolojik incelemesi, insanda patojen olan ve Risk Grubu 2 olarak sınıflandırılan pek çok mikroorganizmaya maruz kalma potansiyeli taşır. Bu mikroorganizmaların tanısı için kullanılan bütün incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir (BGD2 düzey, çalışma koşulları ve dikkat edilmesi gereken konular için bkz. Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi).

Salmonella Typhi normalde hava yolu ile bulaşıcı olmadığı halde Risk Grubu 3 olarak sınıflandırılmaktadır (12). Bu organizmalarla ilgili kültürler ve tanımlama işlemleri asgari BGD2 laboratuvar şartlarında, mutlaka sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalı; serolojik kit vb. için antijen üretimi gibi büyük hacimli kültürler BGD3 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir.

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Boyanmış olsun olmasın bütün lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- **Dışkı** - Öncelikle tercih edilmelidir. Gastroenterit, enterik ateş ve taşıyıcılık saptanması için gereklidir.
- **Rektal sürüntü** - İşbirliği yapamayan, dışkı veremeyen hastalarda ve bebeklerde tercih edilir.
- **Kan, kemik iliği, idrar, diğer steril vücut sıvıları, lenfoid doku biyopsisi** - Enterik ateş etkenlerinin saptanmasında kullanılmaktadır.

NOT: Örneklerin en kısa sürede (<30 dk) laboratuvara ulaştırılması ve işleme alınmaları idealdir. Laboratuvara ulaşması 2 saatten uzun sürecek ise **dışkı** ve **rektal sürüntü** örnekleri Cary-Blair (veya Amies) taşıma besiyeri içine konmalı ve +4°C'de laboratuvara gönderilmelidir. Diğer klinik örnekler +4°C'de tutmak kaydı ile 48 saate kadar gönderilebilir. 48 saati aşan taşıma süreleri için örneklerin -70°C'de dondurulması ve kuru buz içinde laboratuvara gönderilmesi gerekir.

- **Gıda örnekleri** - Salgın ve olgu araştırması amacıyla kuşkulu gıda örnekleri Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından alınır ve gönderilir. Gıda örneklerinin alınması ve gönderilmesi ile ilgili detaylı bilgi için de "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nin "Ekler" bölümüne bakılmalıdır.

Besiyeri / Reaktif / Kit / Suş

- *Salmonella* izolasyonu ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri ve reaktifler piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilirler. Laboratuvarında hazırlamak için ilgili standart prosedürler bu UMS belgesinin sonunda bir liste halinde verilmiştir.
- *Salmonella* izolasyonunda başlıca zenginleştirme, temel ve seçici besiyerleri olmak üzere 3 grup besiyeri kullanılabilir (13).
- Zenginleştirme besiyerleri – Bu amaçla GN (Gram Negatif) buyyon veya Selenit-F buyyon kullanılabilir.
- Temel besiyerleri – %5 Koyun kanlı agar ve MAC.

ÖNEMLİ NOT: MAC yerine ENDO veya EMB de kullanılabilir. Ancak MAC agar öncelikli tercihtir, çünkü bu besiyerinde *Yersinia* spp'nin izole edilme şansı diğerlerinden daha yüksektir (8).

- Seçici besiyerleri - SS agar, HE agar, XLD agar ya da DCA'dan en az biri kullanılır. İzolasyon şansını yükseltmek için mümkünse iki değişik seçici besiyeri kullanılmalıdır (8).
- *Campylobacter* seçici besiyeri plağı (en az bir) (bkz. UMS, B-MT-10)
- Biyotiplendirme için besiyeri ve reaktifler – TSI/KIA, IMViC reaktifleri, üre besiyeri, amino asit (lizin) dekarboksilaz test besiyeri, hareket besiyeri, oksidaz reaktifi, ONPG, Gram boyama ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri (bkz. sayfa 22 "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- Nutrient agar – suş taşımak için, tüpte yatık agar olarak hazırlanmış
- Cary-Blair besiyeri – örnek taşımak için (alternatifi Amies besiyeri)
- %16'lık gliserollü buyyon – suş saklamak için (bkz. UMS, B-TP-01)
- MHA besiyeri - *Shigella* türlerinin antimikrobiyal duyarlılık testi için.
- TSB - Doku örneklerinin taşınması ve işlenmesi için besiyeri
- Polivalan *Salmonella* antiserumları - Polivalan O ve Vi
- Tanımlama kitleri – (opsiyonel) Piyasada Gram negatif enterik bakterilerin biyokimyasal tanımlamasında kullanılabilecek çeşitli kitler ya da tanımlama setleri ticari olarak mevcuttur.
- Antibiyotik diskleri (14)
- Besiyeri kalite kontrolü için referans suşlar (bkz. Ek-1)

Diğer gereç, donanım

- İnkübatör, 35-37°C
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (15).
- Bakteriyolojik öze (tek kullanımlık veya nikrom) – ekim ve koloni pasajları vb. için
- Lam, eküvyon
- 0.5 McFarland bulanıklık standartı,
- McFarland bulanıklık ölçer/turbidometri

2.4. Kalite kontrol

- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır. Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir.
- Antimikrobiyaller zaman içinde yıkılabilir. Bu nedenle, antibiyotik içeren besiyerlerinin etkinliği de zamanla azalabilir.

- *Salmonella* türlerinin izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin kalite kontrolünü yapabilmek için şu yollara başvurulabilir:
 - (a) laboratuvar pozitif klinik örnekleri saklayarak (-80°C'de) takip eden kalite kontroller için kullanılabilir, veya
 - (b) elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.
 - (a) Sterilite kontrolü için; yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
 - (b) Üreme ve seçici özellik kontrolü için kullanılacak organizmalar ve beklenen kalite kontrol sonuçları Ek-1'de özetlenmiştir (ayrıca örnek uygulama için bkz. "UMS, B-MT-06 Lejyoner hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı, Ek-2").
- Aglütinasyon kitleri veya diğer tanımlama kitleri kullanılırken kontrol suşları da kitte verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır (mikroskop kalibrasyonu için bkz. UMS, P-TP-01).
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kullanılan kitin/besiyerinin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.

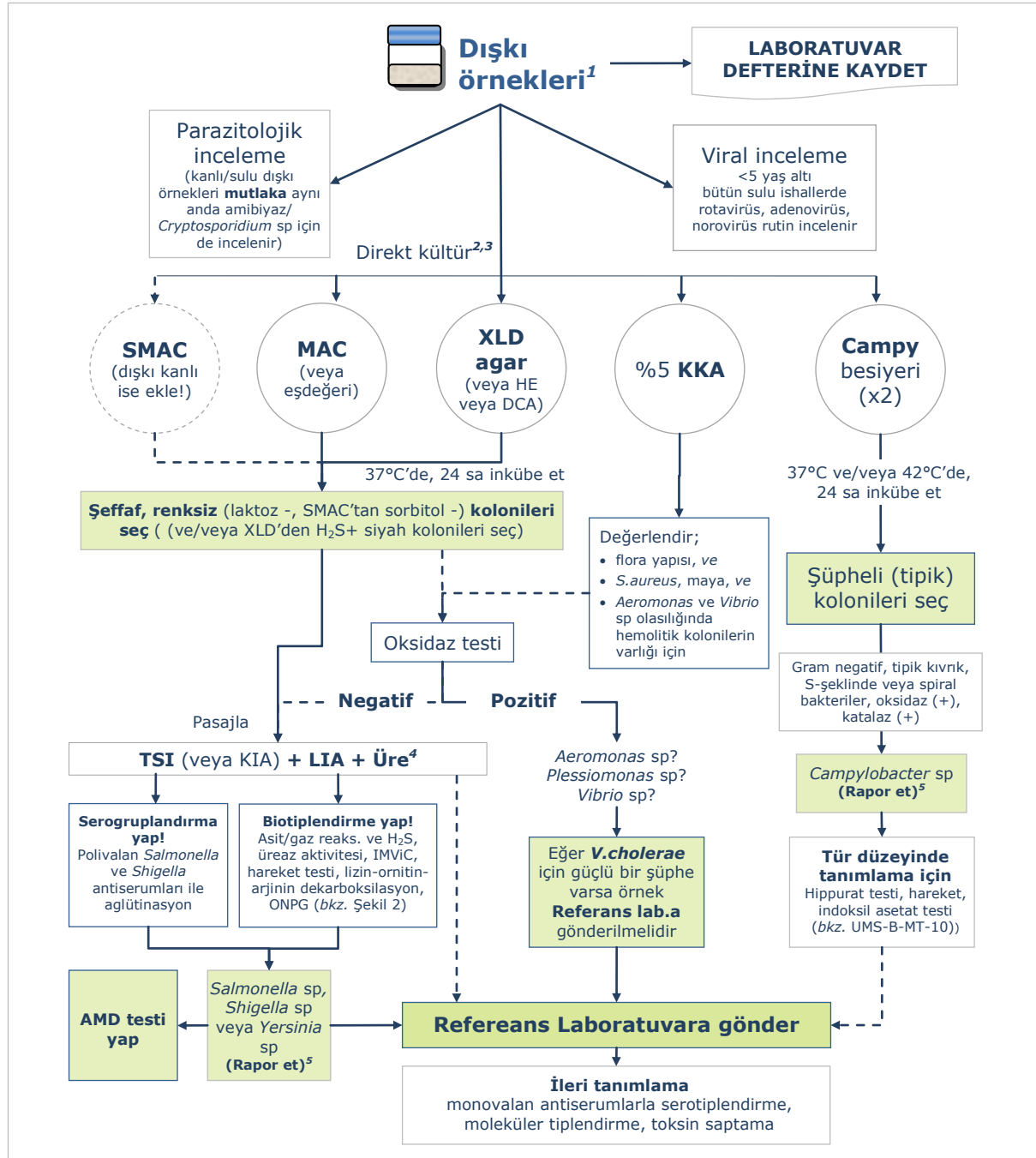
3 Salmonelloz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı için akış şeması

- Akut gastroenterit yakınması ile başvuran hastaların dışkı örneklerinin incelenmesinde *Salmonella* spp varlığının araştırılması rutin tanının bir parçasıdır ve diğer bütün olası patojenlerle birlikte düşünülmelidir.
- Bu nedenle ishal yakınması ile gelen sulu ve/veya kanlı ve/veya mukuslu bütün dışkı örnekleri olası bütün patojenler bakımından uygun bir şema ile -olası paraziter ve viral etkenler (*Cryptosporidium* spp, amibiyaz, rotavirüs, norovirüs vb.) de göz önüne alınarak- incelemeye alınmalıdır.
- Dışkının incelenmesinde genel yaklaşım şeması Şekil 1'de verilmiştir.

3.2. Mikroskopik inceleme

- Laboratuvara gelen taze dışkı örneğinden metilen mavisi boyalı preparat yapıldıktan sonra örneğin lökosit içerip içermediği araştırılır.
- Lökosit varlığı invaziv enfeksiyona işaret etmesi bakımından değerlidir.
- Ancak lökosit bulunmayışı enfeksiyon olasılığını dışlamaz.



Şekil 1. Akut gastroenteritte etken tanısı için akış şeması.

¹ Rutin dışkı kültüründe *Salmonella* sp, *Shigella* sp ve *Campylobacter* sp **mutlaka** araştırılması gereken ajanlardır. EHEC tüm kanlı ishalli dışkıları ve HUS hastalarında araştırılmalı, kültür plakları setine SMAC eklenmelidir. EHEC laboratuvarın bulunduğu bölgedeki insidense göre ilaveten çocuk hastalarda, özellikle yaz aylarında araştırılabilir. *Yersinia* sp, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp, *Clostridium difficile* gibi patojenler hastanın kliniğine ve klinisyenin talebine göre çalışılabilir. Ancak yukarıdaki semada kullanılan besiyerleri seti ile *Yersinia*, *V. cholerae*, *Aeromonas* izole etmek mümkündür ve özel olarak istenmemiş olsa da bu etkenlerden biri izole edildiğinde mutlaka tam tanımlama gerçekleştirilmeli, gerekiyorsa bunun için izolat Referans laboratuvara gönderilmelidir. Ayrıca dışkı örneklerinin farklı durumlarda inceleme kapsamı için bkz. "UMS, SY-01 Akut Gastroenteritte Sendromik Yaklaşım"

² Taşıyıcı/temaslı taramasında dışkıdan önce GN buyyona ekim yapılır; 4-6 sa inkübasyondan sonra besiyerlerine pasajlanır.

³ *Vibrio cholerae* şüphesinde burada verilen besiyeri setine TCBS besiyeri de eklenmelidir.

⁴ "TSI (KIA)+LIA+Üre" test paketi primer tanımlama için seçilebilecek en küçük biyokimyasal test setini oluşturur. Alternatif olarak "TSI (KIA)+IMViC+üre+lizin" kullanılabilir. Sonuç raporu tam bir biyotiplendirmeye ve en azından polivalan antiserumlarla yapılmış bir serotiplendirmeye dayanmalıdır.

⁵ Bütün bu etkenler (*Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Yersinia* sp, EHEC, *Campylobacter* sp) **laboratuvardan bildirim zorunlu** etkenlerdir. İlgili birime hemen bildirim yapılmalıdır.

MAC, MacConkey agar; SMAC, Sorbitol MacConkey agar; KKA, Koyun kanlı agar; XLD, Xylose lysine desoxycholate agar; DCA, Deoxycholate citrate agar; HE, Hectoen-Enteric agar; Campy, *Campylobacter* sp besiyeri; Lab., laboratuvar; sa, saat; IMViC, indol, metil kırmızı, Voges-Proskauer, sitrat testleri; AMD, Antimikrobiyal duyarlılık; KIA, Kligler Iron Agar; TSI, Triple Sugar Iron Agar; LIA, Lysine Iron Agar; EHEC, Enterohemorajik *E. coli*; GN, Gram Negative (buyyon)

3.3. Kültür

Örneklerin kültür plaklarına ekimi

Dışkı

- Bir öze dolusu dışkı ya da transport besiyerinden alınan örnek; temel ve seçici besiyerlerine ekilir (bkz. Şekil 1).
- Tam plak yüzeyine (plağı bölmeden) tek koloni ekimi yapılması esastır. Örnek eküvyon ile besiyerinin üst ¼'üne sürülür ve plağın geri kalan kısmına **azaltma** yöntemi ile yayılır.
- Koyun kanlı agar, MAC agar ile birlikte en az 1 seçici besiyerine (HE, XLD, DCA) ekim yapılır. İzolasyon şansını yükseltmek için ideal olan **2 farklı seçici besiyeri** kullanılmalıdır. Eğer SS kullanılacaksa, SS agar kesinlikle tek seçici besiyeri olarak seçilmez!

NOT 1: Dışkı ile atılan organizma sayısının düşük olduğu tahmin edilen durumlarda (ör., taşıyıcı/temaslı taramalarında) zenginleştirme amacıyla GN buyyon veya Selenit-F kullanılır. Bunun için dışkı örneği gelir gelmez buyyon içeren tüpe inoküle edilir ve 6 ila 8 saat inkübe edilir. Daha sonra üstte belirtilen besiyeri setine ekim yapılır.

NOT 2: Selenit-F bazı *Shigella* suşları için inhibe edici olabilir!

NOT 3: Sette *Campylobacter* besiyerleri de bulunmalı ve eş zamanlı ekim yapılmalıdır (diğer etkenler/olasılıklar için de ayrıca bkz. Şekil 1).

ÖNEMLİ: Kanlı dışkı örneği ayrıca mutlaka Sorbitol MacConkey'e de ekilmelidir!

Kan ve kemik iliği örnekleri

- Örnek alınır alınmaz kan kültürü şişelerine inoküle edilmiş olmalıdır.
- Şişede üreme sinyali veya bulanıklık gözlenmesi halinde koyun kanlı agar, çikolata agar ve olası diğer patojenlerin izolasyonu için uygun plak besiyerlerine pasajlanır.

Steril vücut sıvıları

- Önce örneğin tamamı 1500 g'de 20 dk santrifüj edilir.
- Tüpün dibinde 0.3-0.5 mL sıvı kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılır.
- Sediment vortekslenerek karıştırılır. Steril Pastör pipeti kullanılarak her plağa 2 damla örnek konur ve öze ile tüm yüzeye yayılır.

Doku biyopsisi

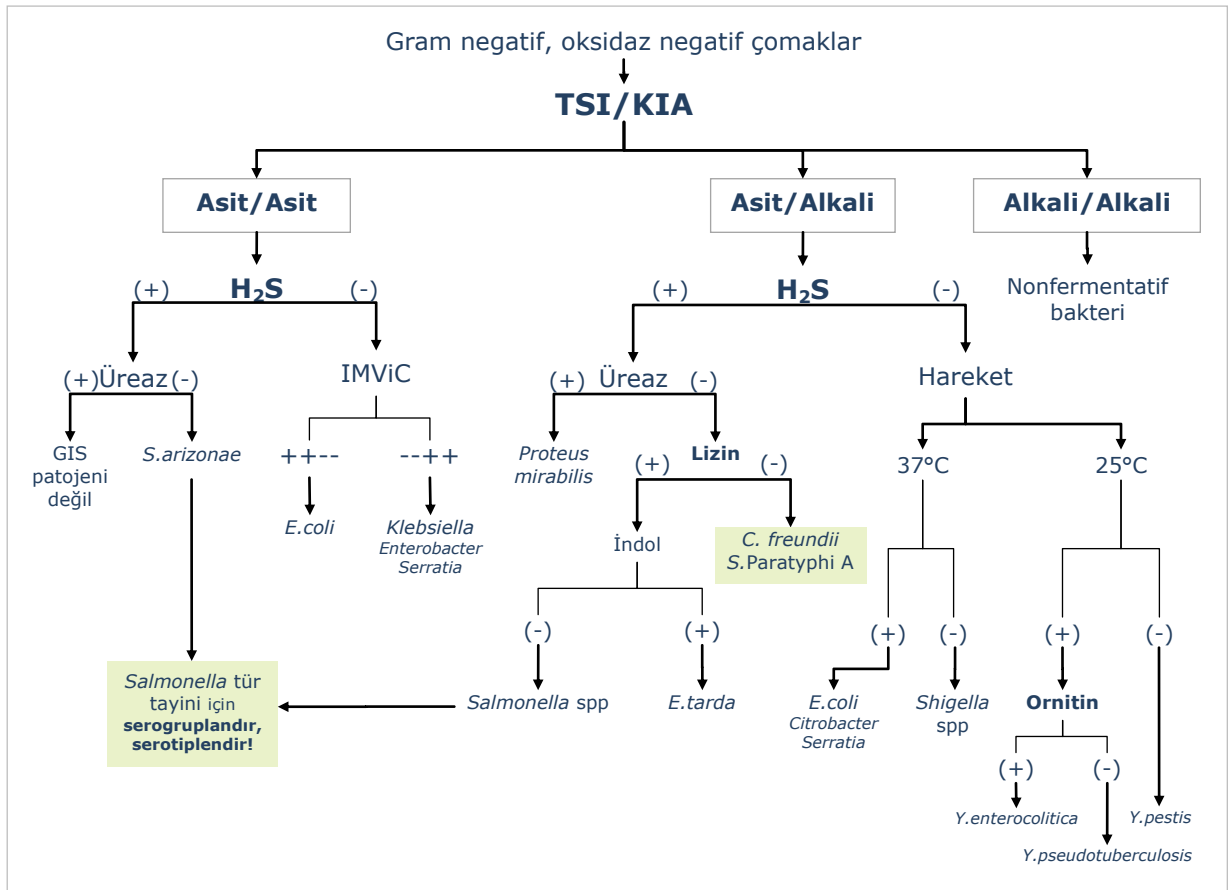
- kültürü için en fazla zeytin büyüklüğünde bir doku parçası 5 mL TSB içine konur.
- Mekanik bir doku öğütücü ile homojenize edilir.
- Steril bir Pastör pipeti kullanılarak homojenattan alınır ve her plağa 2 damla örnek konarak ekim yapılır.
- Bütün kültür plakları 35-37°C'de 18-24 saat inkübasyona kaldırılır.

Kültür plaklarının değerlendirilmesi

- İnkübasyon sonrasında bütün plaklar şüpheli enterik patojen kolonileri bakımından incelenirler. Genellikle temel ve seçici besiyerlerinde 18-24 saatte iyi gelişmiş koloniler görülmesi beklenir.
- *Salmonella* sp şüpheli koloniler için kullanılan plaklarda **beklenen** koloni görünüşleri aşağıda listelenmiştir:
 - (a) MAC (veya EMB) agar - şeffaf ve renksiz koloniler
 - (b) XLD agar - siyah merkezi olan (H₂S oluşturan) koloniler.
ÖNEMLİ: Bazı *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Pullorum*, *S. Gallinorum* serotipleri siyah merkezi **olmayan** koloniler oluşturabilirler.
 - (c) SS agar - siyah merkezi olan (H₂S oluşturan) koloniler
ÖNEMLİ: Bazı *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Pullorum*, *S. Gallinorum* serotipleri siyah merkezi **olmayan şeffaf** koloniler oluşturabilirler.
 - (d) HE agar - siyah merkezi olan (H₂S oluşturan) koloniler
ÖNEMLİ: Bazı *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Pullorum*, *S. Gallinorum* serotipleri siyah merkezi **olmayan mavi-yeşil** koloniler oluştururlar.
 - (e) DCA agar - siyah merkezi olan (H₂S oluşturan) renksiz koloniler.
ÖNEMLİ: Bazı *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Pullorum*, *S. Gallinorum* serotipleri siyah merkezi **olmayan** renksiz koloniler oluştururlar.

Şüpheli kolonilerden tanımlama

- Şüpheli kolonilerden TSI veya KIA'ya pasaj yapılır ve 35-37°C'de 4-6 saat inkübe edilir.
- Bu sürenin sonunda TSI/KIA'da reaksiyonlar henüz değerlendirilemez ancak yeterli saf kültür üreme meydana geldiği için bazı tanımlama testlerinin yapılması adımlarına geçilebilir.
- Bu amaçla IMViC seti, üre ve amino asit dekarboksilaz testleri için amino-asit içeren tüplere (sette en azından lizin bulunmalıdır) inokülasyonlar yapılabilir ve TSI/KIA tüpleri dahil hepsi birlikte bir gece inkübe edilir. Ardından setteki tüplerde gözlenen reaksiyonlar değerlendirilerek karar verilir. IMViC setinin kullanımı ve diğer testler için ilgili UMS belgelerine bakılmalıdır.
- Tanımlama için Şekil 2'de verilen akış şemasından da yararlanılabilir. Bunun için TSI/KIA pasajının en az 18 saatlik inkübasyon süresi tamamlanmış ve beklenen reaksiyonların tam ayırt edilebilir hale gelmiş olması gerekir.
- TSI/KIA değerlendirilmesinde - asit/asit reaksiyon (dip sarı, yatık sarı) veya asit/alkali reaksiyon (dip sarı, yayık pembe-kırmızı) görülmelidir. Dip ve yatık kısım arasında halka gibi veya daha yaygın görünümde H₂S oluşumu (siyahlaşma) da beklenir. Bazı kökenlerde görülmeyebilir.
- Geleneksel biyokimyasal testlerle ya da yarı otomatize/otomatize tanımlama sistemleri ile izolatin *Salmonella* sp olduğu söylenebilir (cins düzeyinde tanımlama). **Tür tayini** (kesin tanı) için aglütinasyon testi ile serolojik doğrulama (serogruplandırma/tiplendirme) yapılmalıdır!



Şekil 2. Salmonella spp tanısında biyokimyasal tanımlama testleri şeması

3.4. Serogruplandırma

- Biyokimyasal olarak *Salmonella* türleri ile uyumlu izolatların **kesin tanısı** serogruplandırma ve serotiplendirme yapılarak konur.
- Serogruplandırma için izolat nutrient agara pasajlanarak 35-37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra polivalan O antiserumları ile lam aglütinasyonu yapılır. Testin yapılışı için bkz. Ek-2
- Eğer izolat *Salmonella* spp ise polivalan O antiserumları ile aglütinasyon vermesi beklenir.
- Bazı serotipler *ör.*, *S.Typhi* Vi antijenine sahip olduğu için polivalan O antiserumu ile aglütinasyon gözlenmeyebilir. Böyle bir olasılık söz konusu ise önce Vi antijenini uzaklaştırmak gerekir. Vi antijenlerini uzaklaştırmak için bakteri süspansiyonu 60°C'de 1 saat ısıtılmalıdır. Soğuduktan sonra O antiserumlarıyla aglütinasyon tekrarlanmalıdır.
- Polivalan O antiserumları tüm O serotiplerini içermeyebilir.
- İleri serotiplendirme için suşlar Referans Laboratuvara gönderilmelidir. Referans Laboratuvarda Kauffmann-White şeması üzerinden O (somatik), Vi (kapsüler) ve H (flajella) antijenleri formülize edilir ve serotip tayin edilir (16).

3.5. Diğer teknikler

- Serolojik testler (Gruber-Widal testi) ile salmonelloz olgularına kesin tanı konulamaz ve bu nedenle bildirim esas tanı teknikleri arasında yer almaz! Serolojik teknikler klinik izlem için hekim isteği doğrultusunda laboratuvarlarda çalışılabilir. Ancak serolojik test sonuçlarına dayalı olarak bildirim yapılmamalıdır!
- Moleküler tiplendirme epidemiyolojik amaçlar için kullanılır. Gıda kaynaklı *Salmonella* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde PFGE 'altın standart' olarak kabul edilir. Referans laboratuvarlarca moleküler tiplendirme sonuçlarının uluslararası paylaşıldığı ve suşlarının epidemiyolojik hareketinin izlendiği ağlar (PulseNET vb) mevcuttur.

3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- İzole edilen *Salmonella* suşları doğrulama ve/veya ileri tanımlama, moleküler epidemiyolojik analiz ve antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları için Ulusal Referans Laboratuvarına gönderilir.
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler.

Saklama

- Saklama için *Salmonella* izolatlarının %16'lık gliserollü TSB içinde yoğun süspansiyonu yapılır ve -80°C'ye kaldırılır. Bu koşullarda bakteri 8-10 yıl saklanabilir. Yoğun süspansiyon hazırlayabilmek için izolatın nutrient agar plağına yapılmış yoğun pasajı kullanılmalıdır.
- İzolatların hem saklanması hem de yeniden canlandırılmasında gerekli besiyerleri ve teknikler için bkz B-TP-01 Suş Saklama Prosedürü.

Referans merkeze gönderme

- Ülkemizde yürürlükte olan bildirim sistemine göre *Salmonella* sp **laboratuvar**dan bildirim zorunlu etkindir. İlgili düzenlemelere göre "kesin tanı" almış sonuçlar bildirim esaslı ve kesin tanı da izolatın tür düzeyinde tanımlanmasını gerektirmektedir (1,2).
- Bu nedenle temel biyokimyasal özellikleri ile *Salmonella* sp olarak tanımlanmış suşların tür düzeyinde tanımlanması için izolatlar THSK Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarına gönderilmelidir.
- Serogruplandırma yapabilen laboratuvarların da serotiplendirme ve epidemiyolojik incelemeler için izolatlarını Referans laboratuvarına göndermeleri gerekmektedir (bkz. ilgili Yönerge) (2,17).
- Suşlar yatık nutrient agara pasajlandıktan sonra bir gece 37°C'de inkübe edilerek Referans laboratuvarına gönderilmek üzere hazırlanırlar.
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (18) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi). İzolatlara ait bilgileri içeren bilgi formu da *mutlaka* doldurularak paketin içine yerleştirilmelidir. Paket gönderilmeden önce laboratuvar telefon veya e-posta ile bilgilendirilmelidir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

4.1. Sonuçların raporlanması

- Sadece polivalan O antiserumlarıyla veya Vi antiserumuyla aglütinasyon veren suşlar serogrubu belirtilerek "*Salmonella* spp üredi" şeklinde rapor edilebilir.
- *Salmonella* gastroenteritinde acil tedavisi gereken bazı özel hasta grupları dışında AMD testlerinin yapılması gerekli değildir.
- Tifo, paratifo, septicemi ve lokal organ hastalıklarında antibiyotik tedavisi şarttır. Bağırsak dışı *Salmonella* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ampicilin, trimetoprim-sülfametoksazol, florokinolon, kloramfenikol ve üçüncü kuşak sefalosporinlere AMD testleri gerekmektedir. Birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler, sefamisinler ve aminoglikozitler test edilmez; *in vitro* duyarlı bulunsalar bile klinik anlamı olmadığı için bildirilmezler! (19).

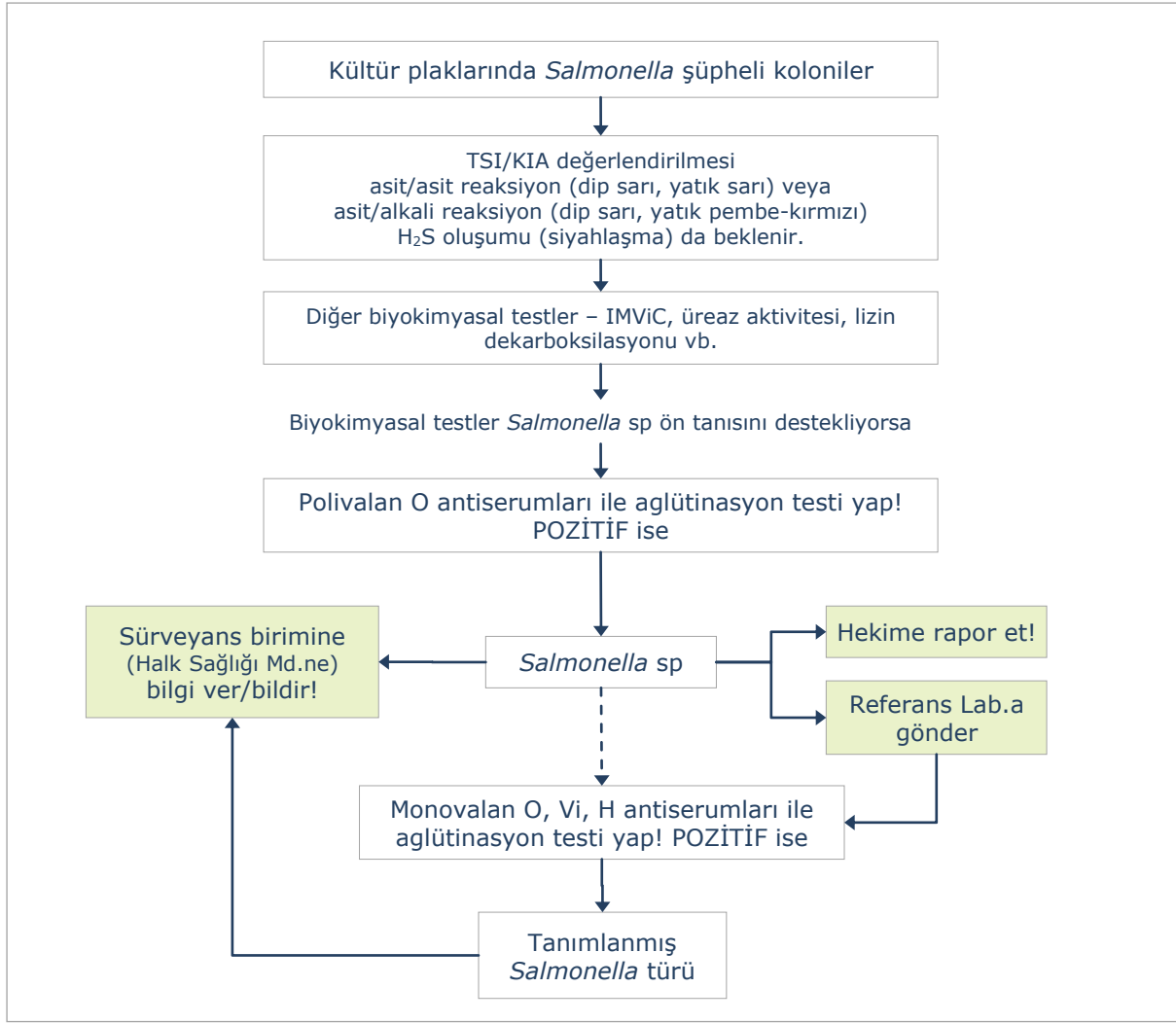
NOT 1: *Salmonella* türlerinin AMD testi olarak European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda *Enterobacteriaceae* türleri için kullanılan disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri önerilmektedir. Kalite kontrolü için *E.coli* ATCC 25922 suşu kullanılmaktadır (14).

NOT 2: Antimikrobiyal duyarlılık testini uygulamak için ilgili UMS belgelerine bakılmalıdır (UMS, AMD-TP-01 ve AMD-TP-03).

4.2. Bildirim

- Raporlama ve bildirim için basit bir akış şeması Şekil 3'de verilmiştir.
- Akut gastroenteritlerden izole edilen *Salmonella* spp ülkemizde bildirimi zorunlu etkenlerdir. Bildirim listesinde Grup D etkenleri içinde yer alır ve bildirimleri doğrudan laboratuvarlar tarafından yapılır (2,17).
 - (a) Tür düzeyinde tanısı konmuş (kesin tanı) bütün vakaların, en kısa sürede bildirimleri toplayan ilgili birime ilgili Rehberdeki prosedür izlenerek bildirimi yapılmalıdır.
 - (b) Tanı sadece "*Salmonella* sp" şeklinde konmuş ise tür tanısı için Referans laboratuvarından sonuç beklenirken bu izolasyon ilgili birime de haber verilmelidir.
- Her iki durumda da akılda tutulması gereken husus, vakanın bir salgınla ilişkili olabileceğidir. Bu nedenle her zaman sonuçlar ilgili sağlık otoriteleri ile mümkün olan en kısa süre içinde paylaşılmalıdır.
- Gruber-Widal vb. serolojik test sonuçlarına dayalı bildirim yapılmaz! Seroloji sonuçları ile elde edilen bulgular bildirimde esas değildir!

Gruber-Widal vb. serolojik testlerle elde edilen bulgular bildirimde esas değildir! Kültürden etken izolasyonu ve tür tayini yapılmış olmalıdır!



Şekli 3. Raporlama ve bildirim için temel adımları içeren akış şeması.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Mikrobiyolojik tanıda kültür 'altın standart'tır. Ancak kültürde üreme saptanmaması *Salmonella* spp tanısını dışlamaz. Bu nedenle kültürden izolasyon olasılığını arttırmak için uygun zamanda, doğru örneğin alınması ve uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir.
- Antibiyotik tedavisi başladıktan sonra alınan örneklerin kültüründe izolasyon şansı çok düşüktür.
- Bazı serotiplerde örneğin, *S. Typhi* Vi antijenine sahip olduğu için polivalan O antiserumu ile aglütinasyon gözlenmeyebilir, bu durumda Vi antijenlerini uzaklaştırmak için bakteri süspansiyonunun 60°C'de 1 saat ısıtılması gerekebilir. Soğuduktan sonra O antiserumlarıyla aglütinasyon tekrarlanmalıdır. Ancak Polivalan O antiserumları tüm O serotiplerini de içermeyebilir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 565 5507

Görev çerçevesi

Klinik örneklerden *Salmonella* spp için tanı, doğrulama, serotiplendirme, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin ve moleküler tiplendirmelerin yapılması; dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması ve "Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA)" kapsamında enterik bakterilerin laboratuvara dayalı sürveyans çalışmalarını yürütmek.

UEPLA, bildirimi zorunlu hastalıkların sürveyansı sistemine laboratuvarların etkin katılımını sağlamak amacıyla oluşturulan bir 'laboratuvara dayalı sürveyans ağı'dır. 2007 yılında kurulan bu ağ kapsamında *Salmonella*, *Shigella*, Enterohemorajik *E. coli* ve *Campylobacter* türleri incelenmekte olup, zaman içinde etken yelpazesinin genişletilmesi ve katılımcı laboratuvar sayısının artırılması ile ülkemizdeki enfeksiyon eğilimleri ve suş dağılımları hakkında bilgi edinilmesi ve bu verilerin halk sağlığının korunmasına yönelik kullanılması hedeflenmektedir.

UEPLA kapsamında 2007-2011 yılları arasında katılımcı laboratuvarlardan en sık *Salmonella* izole edilerek gönderilmiş olup, bunu *Shigella* ve *Campylobacter* izolatları izlemiştir. *Salmonella* serotipleri sıklık sırasına göre *S. Enteritidis* (%65.7), *S. Typhimurium* (%6.1) ve *S. Paratyphi B* (%5.7) olarak sıralanmıştır. *Shigella* izolatları ise *Shigella sonnei* (%68.3), *S. flexneri* (%26.1), *S. boydii* (%3.1) ve *S. dysenteriae* (%1.6) olarak serogruplandırılmıştır. En sık saptanan *Campylobacter* türleri *C.jejuni* (%69.3) ve *C. coli* (%28.1) olarak belirlenmiştir (20).

Ekler

Ek-1 Besiyeri kalite kontrol suşları ve beklenen reaksiyonlar

Enterik patojenlerin tanısında kullanılan besiyerleri	Kontrol suşu (ATCC) ¹	Üreme ve koloni görünümü ²
MAC		
MAC plakları uçuk kırmızımsı pembe ve hafif opalesan görünümündedir	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İyi üreme; pembe-kırmızı koloniler (safrayı presipite etmiş görünümde)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>S. aureus</i> 'un 18-24 saatlik buyyon kültüründen 10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğerlerinin ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İyi üreme; laktoz içermeyen besiyerinde renksiz koloni oluşumu
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	İyi üreme, pembe-kırmızı koloniler
	<i>Proteus mirabilis</i> (12453)	İyi üreme; renksiz koloni oluşumu
	<i>Salmonella</i> Enteritidis (13076)	İyi üreme; renksiz koloni oluşumu
	<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	İnhibe olur
	<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (kısmi veya tam)
SS medium		
SS agar plakları şeffaf ve uçuk ya da somon pembe görünümde olmalıdır.	<i>S. Typhimurium</i> (14028)	İyi üreme; renksiz koloniler, siyah merkezli, H ₂ S (+)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>E. coli</i> 'nin 18-24 saatlik buyyon kültürlerinden 10 ⁴ -10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğer organizmaların ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Shigella flexneri</i> (12022)	Orta veya iyi üreme; renksiz koloniler, H ₂ S (-)
	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İnhibe olur (kısmi); pembe-kırmızı koloniler, H ₂ S (-)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (tam)
HE Agar		
HE Agar plakları yeşil veya koyu yeşil renkli jel gibi görünmelidir	<i>S. Typhimurium</i> (14028)	İyi üreme; yeşilimsi mavi koloniler, siyah merkezli, H ₂ S (+)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>E. coli</i> 'nin 18-24 saatlik buyyon kültürlerinden 10 ⁴ -10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğer organizmaların ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Shigella flexneri</i> (12022)	İyi üreme; yeşilimsi mavi koloniler
	<i>E. coli</i> (25922)	İnhibe olur (kısmi), somon-turuncu koloniler, safrayı presipite edebilir
	<i>E. faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (kısmi veya tam)
XLD agar		
XLD agar plakları açık kırmızıdan kırmızımsı-turuncuya ve nispeten şeffaf görünüyör olmalıdır. ³	<i>S. Typhimurium</i> (14028)	İyi üreme; kırmızı koloniler, siyah merkezli, H ₂ S (+)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>E. coli</i> 'nin 18-24 saatlik buyyon kültürlerinden 10 ⁴ -10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğer organizmaların ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Shigella flexneri</i> (12022)	İyi üreme; kırmızı koloniler
	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İnhibe olur (kısmi veya tam); sarıdan sarı kırmızıya
	<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (kısmi)
KKA (%5 Koyun kanlı agar)		
KKA plakları parlak kan kırmızısı ve düzgün yüzeyli görünüyör olmalıdır. ⁴	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	Beyaz/altın sarısı koloniler; β-hemoliz yapabilirler
ÖNEMLİ: Kanın ilave edildiği sıcaklık yüksek olduğunda görünümün kahverengine döneceği ve hemolizin izlenemeyeceği hatırlanmalıdır.	<i>Streptococcus pyogenes</i> (19615)	Grimsi koloniler; β-hemoliz yapar
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (6303)	Gri-yeşilimsi koloniler; α-hemolitik, yeşilimsi bir halo ile çevrelenmiş gibi görünüm; mukoid olabilirler

¹ Alternatif olarak listedeki kontrol suşlarının yerine, biyokimyasal olarak tam tanımlanmış klinik izolatlar kullanılabilir.

² Plaklar 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında üreme, koloni büyüklüğü, reaksiyonlar ve seçicilik açısından incelenir

³ Yüksek ısı presipitasyona neden olur. Bu durumda reaksiyonlar uygun, ancak koloniler hafifçe ufaktır. Agar yüzeyi düz ve aşırı olmamak kaydıyla nemli olmalıdır.

⁴ KKA'da β-hemolitik görünen diğer organizmalar da (ör., *Listeria*, *Corynebacteria*, *E. coli*'nin hemolitik kökenleri, *Pseudomonas* türleri vb.) KK suşları olarak kullanılabilirler.

Ek-2 *Salmonella* şüpheli izolatlardan aglütinasyon testlerinin yapılması

Materyal

- Test edilecek izolatın ve pozitif kontrol suşlarının taze nutrient agar ve 'swarm' agar pasajları (35-37°C'de bir gecelik inkübasyon)
- Antiserumlar*
 - *Salmonella* polivalan ve grup somatik (O) antiserumları
 - *Salmonella* flajellar (H) antiserumları
 - Vi antiserumu
- %0.85 NaCl (SF)
- Cam tüpler, steril
- Lamlar (temiz)
- Cam kalem, kürdan
- Pastör pipetleri, otomatik pipet ve pipet uçları

* Ticari antiserumların kullanıma uygunluğu pozitif kontrol suşları ile test edilmelidir

Aglütinasyon testinin yapılışı

- 1 Bir lam üzerine yan yana iki damla SF damlatılır. Şüpheli izolatlar ve kontrol suşlarının kolonilerinden yoğun bakteri süspansiyonları hazırlanır.
- 2 İlk süspansiyona test edilecek antiserum, ikinci süspansiyona SF damlatılır. Her iki süspansiyon kürdanla karıştırıldıktan sonra, kullanılan antiserum üreticisinin uygun gördüğü süre içinde lam ileri geri çevrilir.
- 3 Antiserum ilave edilen damlacık aglütinasyon (kümeleşme) yönünden, SF damlatılan damlacık (negatif kontrol) ise reaksiyon oluşmaması yönünden çıplak gözle değerlendirilir. Reaksiyonun daha iyi görülebilmesi için değerlendirme sırasında iyi bir aydınlatma ve mümkünse siyah zemin kullanılmalıdır.
- 4 SF damlatılan tarafta oto-aglütinasyon oluştuğunda veya süspansiyon partiküllü görünümde ise değerlendirilmez. Test sadece homojen bir bulanıklık elde edilmiş süspansiyonlar ile gerçekleştirilmelidir.

Değerlendirme, yorum

- 1 SF kontrolünde herhangi bir aglütinasyon gözlenmemelidir. Granüler yapılar görülüyorsa "kültür R tipi ve antijenik değerlendirme için uygun değil" demektir. Bu suşlar KKA veya MH agara pasajlandıktan sonra aglütinasyon tekrar edilir.
- 2 Pozitif kontrolde tam aglütinasyon gözlenir.
- 3 Şüpheli izolat damlacığında aglütinasyon varsa, kullanılan antiseruma göre o izolatın POZİTİF olduğu anlamına gelir.
- 4 Polivalan O, grup O ve Vi antiserumları ile aglütinasyon testi yapılır. Pozitif sonuç veren antiseruma göre *Salmonella* serogrubu belirlenir. Tam serotiplendirme için suşlar Referans laboratuvara gönderilir.
- 5 Vi kapsüler polisakkaridine sahip bazı *Salmonella* serotipleri, O antiserumları ile aglütinasyon göstermeyebilir. Vi antiserumu ile reaksiyon pozitif ise, bakteri süspansiyonu 60°C'de 1 saat ısıtılarak Vi antijenleri uzaklaştırıldıktan sonra aglütinasyonun tekrarlanması gerekir.
- 6 H antiserumları ile aglütinasyon için, bakterinin flajella oluşumunu artıran 'swarm' agar gibi yarı katı besiyerleri kullanılır. Katı besiyerlerinden yapılacak H aglütinasyon testi yanlış negatif sonuç verebilir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (*Salmonella* enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, SY-01	Akut gastroenteritte sendromik yaklaşım
UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-04	Hareket testi
UMS, B-TP-06	IMVIC testleri
UMS, B-TP-09	Karbonhidrat Fermentasyon ve Oksidasyon Testleri
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-11	KIA/TSI testleri
UMS, B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/dihidrolaz testleri
UMS, B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler's) boyama
UMS, B-TP-15	Nitrat Redüksiyonu
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, B-TP-17	ONPG testi
UMS, B-TP-21	Tuz Tolerans Testi (%6.5'luk Sodyum Klorürde Üreme)
UMS, B-TP-22	Üreaz testi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, B-MT-06	Lejyoner hastalığının mikrobiyolojik tanısı Ek-2 (besiyeri kalite kontrolü için örnek prosedür)
UMS, B-MT-09	<i>Shigella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-10	<i>Campylobacter jejuni/coli</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi (EUCAST)
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 4 Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella* ve *Salmonella*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 603-626.

- 5 *Salmonella* izolasyonu ve identifikasyonu standart laboratuvar prosedürleri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, 2012.
- 6 CDC. Typhoid fever. http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/ (son erişim tarihi: 26.03.2014)
- 7 CDC. Salmonella. <http://www.cdc.gov/salmonella/> (son erişim tarihi: 26.03.2014)
- 8 York MK, Rodrigues-Wong P. Fecal culture for aerobic pathogens of gastroenteritis. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.8.1.1 – 3.8.1.21.
- 9 UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Shigella* species. Bacteriology – Identification, ID 20, Issue no: 2.1, Issue date: 21.10.11. <http://www.hpa.org.uk/SMI> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 10 *Enterobacteriaceae*. In: Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL (eds). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed Lippincott Williams & Wilkins. 2007, p. 211-312.
- 11 Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, 2008.
- 12 Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of The Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. 2000.
- 13 Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü. 2008
- 14 European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2013. <http://www.eucast.org> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 15 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 16 Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 2007, 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, France
- 17 S.B. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 24.02.2004/1534 tarih-sayılı Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Yönergesi. 2004.
- 18 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 19 CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA. 2012.
- 20 Levent B, Güleşen R, Kalaycıoğlu H, Sezen F, Gözalan A, on behalf of UEPLA participants. National Enteric Pathogens Laboratory-based Surveillance Network (UEPLA) in Turkey, July 2007-June 2011. 22nd ECCMID, 31 Mar-3 Apr 2012, Londra, UK. 2012, p. 698.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

***Shigella* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-09
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Shigella enfeksiyonlarının önemi	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	5
Klinik özellikler	5
Mikrobiyolojik tanı	6
TEKNİK BİLGİLER	7
1 Hedef mikroorganizmalar	7
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	7
3 Shigella enfeksiyonlarının tanısında kullanılan teknikler.....	10
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	15
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	16
6 Referans Laboratuvar	16
EKLER.....	18
Ek-1 Besiyeri kalite kontrol suşları ve beklenen reaksiyonlar	18
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	19
KAYNAKLAR.....	19

Kapsam ve Amaç

Shigella türleri; akut kanlı ishalin en sık görülen etkenleri arasındadır ve basilli dizanteri olarak da bilinen akut invaziv bir gastroenterit yapmaktadır. *Shigella* spp su ve bazen gıda kaynaklı kitlesel salgınlar yapabilen, halk sağlığı önemine sahip patojenlerdir. *S. dysenteriae* serotip 1 enfeksiyonları ciddi seyredebildiği ve etken birçok antimikrobiyal ilaca dirençli olduğu için ayrıca önem taşımaktadır.

Shigella spp ülkemizde **laboratuvar**dan bildirim zorunlu etkenlerdir (1,2). Etken oldukları hastalık tablosu, başta amipli dizanteri olmak üzere diğer kanlı ishal ve dizanterilerden ayırt edilemediğinden tanı laboratuvar incelemesine dayanır.

Kesin tanı, şüpheli kolonilerin biyokimyasal testlerle *Shigella* sp olarak ayırt edilmesi ve özgül antiserumlarla serogrubunun belirlenmesiyle konur. Dışkıdan *Shigella* tanısı *Salmonella* spp ile birlikte klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının en yaygın tanı işlerinden biridir. Mikrobiyoloji alanının gelişmeye başladığı yıllardan bu yana bilinen bu etkenlerin tanısında ciddi bir gelenek birikimi de vardır.

Bununla birlikte, ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından 2012 yılında ulusal klinik mikrobiyoloji laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun incelendiği çalışmanın sonuçlarına göre laboratuvarların (n=530) önemli sayılabilecek bir kısmında *Shigella* spp tanısının geçerli olmayan tekniklere dayandığı izlenmiştir. *Shigella* incelemesi yapabildiğini beyan eden laboratuvarların (n=256) ancak %37.9'unun **geçerli** bir prosedür ile tanı koyabildiği dikkati çekmektedir (3). Dolayısı ile vakaların önemli bir kısmının hatta salgınların tanımlanamadığı, hasta yönetimi ve epidemiyolojik çalışmaların da bu durumdan olumsuz yönde etkilendiği öngörülebilir. Bu nedenle tanıda kabul edilmiş standartlara uygun bir prosedürün el altında olması tanının yaygınlaşmasını ve güvenilir sonuçlar üretilmesini teşvik edecek bir araç olarak önemli görünmektedir. Bu UMS belgesinde de tanıda geçerli teknikler ile *Shigella* spp'nin doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasına yardımcı bir Rehber verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

DCA	Deoksikolat sitrat agar
EUCAST	European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing
HE	Hektoen enterik (agar)
HÜS	Hemolitik üremik sendrom
KIA	Kligler iron agar
MAC	MacConkey agar
MHA	Mueller Hinton agar
ONPG	Orto-nitro-fenil β -galaktopiranozid (β -galaktozidaz testi)
PYR	Pirolidonil- β -naftilamid
SS	<i>Salmonella-Shigella</i> (agar)
TSI	Triple Sugar Iron (agar)
XLD	Xylose lysine deoxycholate (agar)

Genel Bilgi

Shigella enfeksiyonlarının önemi

Shigella spp akut gastroenteritlerin önemli bakteriyel etkenlerinden biridir. *Shigella dysenteriae* aynı zamanda serogrup A, *Shigella flexneri* serogrup B, *Shigella boydii* serogrup C ve *S. sonnei* de serogru D olarak bilinir.

İnsan ve diğer bazı büyük primatlar *Shigella* bakterilerinin tek doğal konağıdır. Bulaş; çoğunlukla kontamine su ya da gıda yoluyla. Özellikle içme-kullanma sularının kontaminasyonu, 10-100 kadar az sayıda *Shigella* bakterisinin alınmasıyla bile enfeksiyon gelişebildiğinden dolayı, etkenin hızla yayılmasına ve salgınlara neden olmaktadır. *Shigella* enfeksiyonları, hijyenin yetersiz olduğu durumlarda (ör., kreşler veya diğer bakım merkezleri) kişiden kişiye bulaşır. *Shigella* ayrıca cinsel yolla bulaşabilir ve sineklerle de yayılabilir. Eşcinsel erkekler arasında cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar bildirilmiştir (4).

Shigella spp dünya genelinde yaygın olmakla birlikte, temiz ve güvenilir içme suyu temini sorunlu olan ve kanalizasyon alt yapısı gelişmemiş yerleşimlerde, özellikle az gelişmiş ülkelerde daha sık görülmektedir. Suyla kanalizasyon karışması halinde patlama tarzında su kaynaklı epidemiler yapabildiği dikkati çeker. Dünyanın bazı endemik bölgelerinde (daha çok Afrika ülkelerinde), *S.dysenteriae* serotip 1'in pek çok antibiyotiğe dirençli kökenlerinin görülmesi, etkeni bu bölgelerde öncelikli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir.

Shigella türlerinin coğrafi dağılımı da gelişmiş ve gelişmemiş ülkeler arasında farklılık gösterir. Gelişmiş ülkelerdeki birçok enfeksiyon *S. sonnei* serogrubu ile oluşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise en sık neden *S. flexneri*'dir.

Shigella enfeksiyonları akut gastroenteritlerin bakteriyel etkenleri arasında genellikle *Salmonella* spp ve *Campylobacter* spp ile birlikte ilk üç sırada yer almaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığına laboratuvarlardan yapılan bildirim verilerine göre benzer bir durum gözlenmektedir; bakteriyel etkenler arasında *Shigella* sp'nin hemen hemen *Campylobacter* spp ile benzer sıklıkta görüldüğü ve *Salmonella* sp'den sonra ikinci sırada geldiği, yılda 200-400 arasında vaka kaydedildiği dikkati çekmektedir (Tablo 1). Ancak bu değerlerin epidemiyolojik tahminlerin çok altında olduğu düşünülmektedir. Durum kısmen bildirimin yetersizliğine (bazı laboratuvarların tanımlandıkları vakaları bildirmeyi ihmal edişine) bağlı olabileceği gibi, inceleme yapan laboratuvar sayısı ve/veya kullanılan tekniklerin yetersizliği de ilgili olabilir. Tanı kapasitesinin yetersizliği vakaların tanı alamamasına veya farklı tanımlar almasına yol açıyor olabilir. Tablo 1'de diğer bir akut kanlı ishal etkeni olan *Entamoeba histolytica*'nın görülüş sıklığının *Shigella* spp ile karşılaştırıldığında hayli yüksek oluşu da bu olasılığı desteklemektedir. Bir diğer ifade ile bu etkenlerin görülüş sıklığı için ülkemiz verileri epidemiyolojik durumdan ziyade laboratuvarların tanısal sorunlarının bir yansıması gibi görünmektedir; *Shigella* spp için beklenenden "düşük" tanı ('underdiagnosis'), *E. histolytica* için de "aşırı" tanı ('overdiagnosis') sorunu olduğundan söz edilebilir. Söz konusu enfeksiyonların ciddi birer halk sağlığı sorunu oldukları göz önüne alındığında, gerçek epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesinde ve uygun programların yürütülebilmesinde doğru ve güvenilir laboratuvar sonucunun önemi daha da belirginleşmektedir.

Tablo 1. 2008-2011 yıllarında ülke genelindeki laboratuvarlarda tanısı konmuş ve Sağlık Bakanlığına bildirilmiş bazı bakteriyel ve paraziter akut gastroenterit etkenlerinin (vakaların) dağılımı (Kaynak: THSK, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı [eski adı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü]; henüz yayınlanmamış veri)

Bildirilen etken/sendrom	2008	2009	2010	2011
<i>Salmonella</i> sp (gastroenterit etkeni olarak)	1993	2435	3463	2307
<i>Campylobacter</i> sp	170	313	157	182
<i>Shigella</i> sp	352	301	367	196
<i>Entamoeba histolytica</i>	32766	22278	22404	21692
<i>Giardia intestinalis</i>	14239	15322	14605	13426
Akut kanlı ishal*	7733	5939	88971	19733

* Akut kanlı ishal (AKI) bildirimi klinisyen tarafından semptomlara dayalı olarak yapılmaktadır. Karşılaştırma amacıyla tabloda verilmiştir.

Mikroorganizmanın özellikleri

Shigella'nın tarihsel olarak "tür" olduğu düşünülmüş dört alt grubu vardır: A alt grubu *S. dysenteriae*, B alt grubu *S. flexneri*, C alt grubu *S. boydii* ve D alt grubu *S. sonnei* olarak bilinir.

Genetik olarak dört *Shigella* türü ve *E. coli* tek bir genom türünü oluşturur; dört *Shigella* türü serolojik olarak tanımlanmış anaerojenik *E.coli* biyotipi gibi ele alınabilirler. *S. dysenteriae* türün tipik örneğidir. *S. flexneri* serotip 6 ve *S. boydii* serotip 14 gibi belirli suşlar dışında karbonhidrat fermentasyonundan gaz oluşturmazlar. *Escherichia*'lar ile karşılaştırıldığında. *Shigella* suşları karbonhidrat kullanmada daha az aktiftir. *S. sonnei* suşları uzamış inkübasyonda laktozu fermente edebilir. Diğer türler bilinen en klasik besiyerlerinde genellikle laktozu fermente etmezler (4).

Klinik özellikler

Shigella spp enfeksiyonları sıklıkla ateş ve karında krampların eşlik ettiği sulu ishale başlar; kan, mukus ve püy içeren dışkı ile karakterize olan klasik dizanteriye ilerler. Kan akımı enfeksiyonları nadiren gelişir.

Bakterinin ağız yoluyla alınmasını izleyen 2-6 gün sonra ateş, karın ağrısı ve sulu dışkılama başlamakta, izleyen birkaç gün içinde dışkı kanlı-mukuslu bir görünüm almaktadır. Çocuklarda yüksek ateş ve konvülsiyonlar tabloya eklenebilmektedir.

S. sonnei suşları ile bazen asemptomatik enfeksiyonlar görülebilmektedir.

Komplikasyon olarak tenesmus, rektal prolapsus, toksik megakolon, hipovolemik şok, HÜS, artrit ve konjonktivit gelişebilir.

Özellikle tedavinin yönlendirilmesinde (antimikrobiyal veya antiparaziter ilaç uygulaması ayrımı için) laboratuvar sonucu kritik önem taşımaktadır.

Mikrobiyolojik tanı

Shigella enfeksiyonlarının tanısı, diğer enterik patojenler için de geçerli olduğu gibi, her zaman benzer tablolara neden olabilecek etkenlerin tanısı ile birlikte düşünülmelidir. Bazı durumlarda aynı epidemiyolojik kaynaktan köken alan diğer patojenlerin de *Shigella* ile birlikte bireyi enfekte etmiş olabilecekleri ve aynı anda tanımlanabilecekleri hatırlanmalıdır.

Mikrobiyoloji laboratuvarları coğrafi olarak bulundukları bölgede sık rastlanan patojen etkenlere uygun yöntemleri gözden geçirir ve uygularlar; rutin amaçlar için ve salgın ya da diğer özel durumlar için olmak üzere tanı setleri oluştururlar. Mevcut epidemiyolojik göstergeler, özellikle son yıllarda, başta hızlı gıda sektörü olmak üzere kanatlı kümes hayvanları tüketiminin büyük artış göstermesine paralel olarak *Campylobacter* enfeksiyonlarının üst sıralara çıktığına işaret etmektedir ve bu nedenle akut gastroenteritler için standart (rutin) tanı setinde *Salmonella* spp, *Shigella* spp ve *Campylobacter* spp birlikte yer almaktadır (5).

Ülkemizdeki bütün klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da -hasta yönetimi ve epidemiyolojik açıdan maksimum yarar göz önüne alındığında- akut ishal yakınması ile başvuran bütün dışkı örneklerine **asgari** bu patojenlerin tanısı için gerekli teknikleri uygulamalıdır.

Shigella enfeksiyonlarının tanısında 'altın standart' kültürden etkenin izolasyonudur. Tam tanımlama (kesin tanı)

biyokimyasal tanımlamayı ve serogrubu belirlemeyi içerir. Diğer bir ifade ile **kesin tanı**; (i) kültür plaklarındaki şüpheli kolonilerden, (ii) biyokimyasal olarak *Shigella* türleri ile uyumlu bulunanların, (iii) özgül antiserumlar ile serogrubu tespit edilerek konur (5,6). Yalnızca biyokimyasal tiplendirmeye veya yalnızca serogrup tespitine dayalı sonuç tanı için geçerli kabul edilmez!

Zenginleştirme amacı ile Selenite-F veya GN sıvı besiyerine ekimlerin yalnızca temaslı veya taşıyıcı araştırmalarında (kreş, bakımevi, gıda sektörü gibi özel alan personelinden örnek alınmasında) uygulanması önerilir. Zenginleştirme işleminin *Shigella* spp izolasyon oranlarını %10 arttırdığı bilinmektedir. Selenit-F'in bazı suşları inhibe olasılığı vardır.

Kültür için koyun kanlı agar gibi bir genel besiyerinin yanısıra seçici/ayırt ettirici özellikte besiyerleri kullanılır. MacConkey agar (MAC) içerdiği kristal viyole ve safra tuzları ile gram pozitif mikroorganizmaları baskılayan, *Yersinia* spp dahil gram negatif enterik patojenlerin ise iyi üremesine ve koloni görünümüleri ile ayırt edilmesine izin veren düşük seçici özellikte bir besiyeridir. Hem *Shigella* hem de *Salmonella* izolasyonu için daha yüksek seçicilikte besiyerleri olarak XLD, DCA, SS ve HE sayılabilir. *S. dysenteriae* serotip 1 üremesini baskılama olasılığı nedeniyle SS agarın seçici besiyeri olarak tek başına kullanılmaması önerilir (5).

Shigella türü bakteriler oksidaz ve üre negatiftirler. Lizini dekarboksile etmezler ve *S. dysenteriae* serotip 1 dışında katalaz pozitif bakterilerdir. *S. sonnei* ve *S. dysenteriae* serotip 1 ONPG pozitifdir. *S. boydii* serotip 13 ornitini dekarboksile eder ve ONPG pozitifdir. Biyokimyasal testlerle *Shigella* sp olduğu anlaşılan bütün suşlara mutlaka polivalan *Shigella* antiserumları kullanılarak kesin tanı konur (4).

Akut gastroenterit tanısı için rutin bakteriyolojik inceleme seti asgari *Salmonella* spp, *Shigella* spp ve *Campylobacter* spp tanısını koymak için uygun teknikleri içerecek şekilde tasarlanmalıdır!

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Shigella dysenteriae, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* ve *Shigella sonnei*

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Dışkının mikrobiyolojik incelemesi, insanda patojen olan ve Risk Grubu 2 olarak sınıflandırılan pek çok mikroorganizmaya maruz kalma potansiyeli taşır. Bu mikroorganizmaların tanısı için kullanılan bütün incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir (BGD2 düzey, çalışma koşulları ve dikkat edilmesi gereken konular için bkz. Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi).

S.dysenteriae serotip 1'in bazı suşları Shiga-toksin üretebilir ve maruziyeti ciddi laboratuvar enfeksiyonları ile sonuçlanabilir. Klinik örneklerden izolasyon ve tanımlama işlemleri asgari BGD2 şartlarında, sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalı; böyle izolatların antijen üretimi vb amaçlar için yoğun kültürleri ile BGD3 laboratuvar şartlarında çalışılmalıdır.

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Boyanmış olsun olmasın bütün lamalar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Donanım

İnceleme örnekleri

Shigella spp tanısı için örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Dışkı ve rektal sürüntü örnekleri alınabilir.
- Dışkı, tanıda birinci seçenektir. Örnek, ishalin başladığı ilk günlerde (ilk 5-7 gün), mümkün olduğunca erken dönemde ve antibiyotik tedavisine başlanmadan önce alınmalıdır. En az 4-5 g (sulu ise 4-5 mL) taze dışkı örneği alınmalıdır.

- Rektal sürüntü – İşbirliği yapılamayan, dışkı veremeyen hastalarda ve bebeklerde tercih edilir. Aynı hastaya ait en az 2 sürüntü alınmalıdır. Eküvyon üzerinde gözle görülebilir miktarda fekal örnek olmalıdır.
- Dışkı ve rektal sürüntü alındıktan sonra eğer örneğin laboratuvara ulaşması 2 saatten uzun sürecek ise eküvyonlar taşıma ortamına konmalıdır. Bunun için Cary-Blair taşıma besiyeri kullanılması önerilir. Alternatif olarak; Amies taşıma besiyeri kullanılabilir.

ÖNEMLİ: Taşıma ortamı olarak Stuart besiyeri veya fosfat tamponlu gliserol uygun değildir, önerilmez (aynı örneklerden *Campylobacter* spp izole edilme olasılığı da düşünülerek!).

- Örneklerin en kısa sürede (<30 dk) laboratuvara ulaştırılması ve işleme alınmaları idealdir. Eğer laboratuvara ulaşması gecikecekse +4°C’de tutmak kaydı ile örnekler 48 saate kadar gönderilebilir. 48 saati aşan taşıma süreleri için örneklerin -70°C’de dondurulması ve kuru buz içinde laboratuvara gönderilmesi gerekir.
- Su (ve gıda) örnekleri – Vaka ve salgın araştırması amacıyla kuşkulu su kaynaklarından ve gerekli ise gıdalardan örnekler Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından alınır ve gönderilir. Su ve gıda örneklerinin alınması ve gönderilmesi ile ilgili detaylı bilgi için de “Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi”nin “Ekler” bölümüne bakılmalıdır.

Besiyeri / Reaktif / Kit / Suş

- *Shigella* izolasyonunda kullanılan besiyerleri, ticari olarak piyasadan hazır temin edilebildiği gibi laboratuvar koşullarında da hazırlanabilir. Başlıca zenginleştirme, temel ve seçici besiyerleri olmak üzere 3 grup besiyeri kullanılabilir (7).

- Zenginleştirme besiyerleri – Bu amaçla GN (Gram Negatif) buyyon veya Selenit-F buyyon kullanılabilir.
- Temel besiyerleri – %5 Koyun kanlı agar ve MAC.

ÖNEMLİ NOT: MAC yerine ENDO veya EMB de kullanılabilir. Ancak MAC agar öncelikli tercihtir, çünkü bu besiyerinde *Yersinia* spp’nin izole edilme şansı diğerlerinden daha yüksektir (5).

- Seçici besiyerleri - SS agar, HE agar, XLD agar ya da DCA’dan en az biri kullanılır. İzolasyon şansını yükseltmek için mümkünse iki değişik seçici besiyeri kullanılmalıdır (5).
- *Campylobacter* seçici besiyeri plağı (en az bir) (bkz. UMS, B-MT-10)
- Biyotiplendirme için besiyeri ve reaktifler – TSI/KIA, IMViC reaktifleri, üre besiyeri, amino asit (lizin) dekarboksilaz test besiyerleri, hareket besiyeri, oksidaz reaktifi, PYR, ONPG, Gram boyama ve Loeffler’in metilen mavisi reaktifleri (bkz. sayfa 19 “İlgili Diğer UMS Belgeleri”)
- Nutrient agar – suş taşımak için, tüpte yatık agar olarak hazırlanmış
- %16’lık gliserollü buyyon – suş saklamak için (bkz. UMS, B-TP-01)
- MHA besiyeri - *Shigella* türlerinin antimikrobiyal duyarlılık testi için.
- Polivalan *Shigella* antiserumları

- Tanımlama kitleri – (opsiyonel) Piyasada Gram negatif enterik bakterilerin biyokimyasal tanımlamasında kullanılabilecek çeşitli kitler ya da tanımlama setleri ticari olarak mevcuttur.
- Antibiyotik diskleri (8)
- Besiyeri kalite kontrolü için referans suşlar (*bkz.* Ek-1)

Diğer gereç, donanım

- İnkübatör, 35-37°C
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (9).
- McFarland 0.5 bulanıklık standardı, McFarland bulanıklık ölçer / turbidometri

2.4. Kalite kontrol

- Besiyerlerini kullanmadan önce son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır.
- Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarında standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.
 - (a) Sterilite kontrolü için; yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
 - (b) Üreme ve seçici özellik kontrolü için kullanılacak organizmalar ve beklenen kalite kontrol sonuçları Ek-1'de özetlenmiştir (ayrıca örnek uygulama için *bkz.* "UMS, B-MT-06 Lejyoner hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı, Ek-2").
- Aglütinasyon kitleri veya diğer tanımlama kitleri kullanılırken kontrol suşları da kitte verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır (mikroskop kalibrasyonu için *bkz.* UMS, P-TP-01).
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kullanılan kitin/besiyerinin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.

3 Shigella enfeksiyonlarının tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı için akış şeması

- Akut gastroenterit yakınması ile başvuran hastaların dışkı örneklerinin incelenmesinde *Shigella* spp varlığının araştırılması rutin tanının bir parçasıdır ve diğer bütün olası patojenlerle birlikte düşünülmelidir.
- Bu nedenle ishal yakınması ile gelen sulu ve/veya kanlı ve/veya mukuslu bütün dışkı örnekleri olası bütün patojenler bakımından uygun bir şema ile -olası paraziter ve viral etkenler (*Cryptosporidium* spp, amibiyaz, rotavirüs, norovirüs vb.) de göz önünde tutularak- incelemeye alınmalıdır.
- Dışkının incelenmesinde genel yaklaşım şeması Şekil 1’de verilmiştir.

3.2. Mikroskopik inceleme

- Laboratuvara gelen taze dışkı örneğinden metilen mavisi boyalı preparat yapıldıktan sonra örneğin lökosit içerip içermediği araştırılır.
- Lökosit varlığı invaziv enfeksiyona işaret etmesi bakımından değerlidir.
- Ancak lökosit bulunmayışı enfeksiyon olasılığını dışlamaz.

3.3. Kültür

Dışkının kültür plaklarına ekimi

- Bir öze dolusu dışkı ya da transport besiyerinden alınan örnek; temel ve seçici besiyerlerine ekilir (bkz. Şekil 1).
- Tam plak yüzeyine (plağı bölmeden) tek koloni ekimi yapılması esastır. Örnek eküvyon ile besiyerinin üst ¼’üne sürülür ve plağın geri kalan kısmına **azaltma** yöntemi ile yayılır.
- Koyun kanlı agar, MacConkey agar ile birlikte en az 1 seçici besiyerine (HE, XLD, DCA) ekim yapılır. İzolasyon şansını yükseltmek için ideal olan **2 farklı seçici besiyeri** kullanılmasıdır. Eğer SS kullanılacaksa, SS agar kesinlikle tek seçici besiyeri olarak seçilmez!

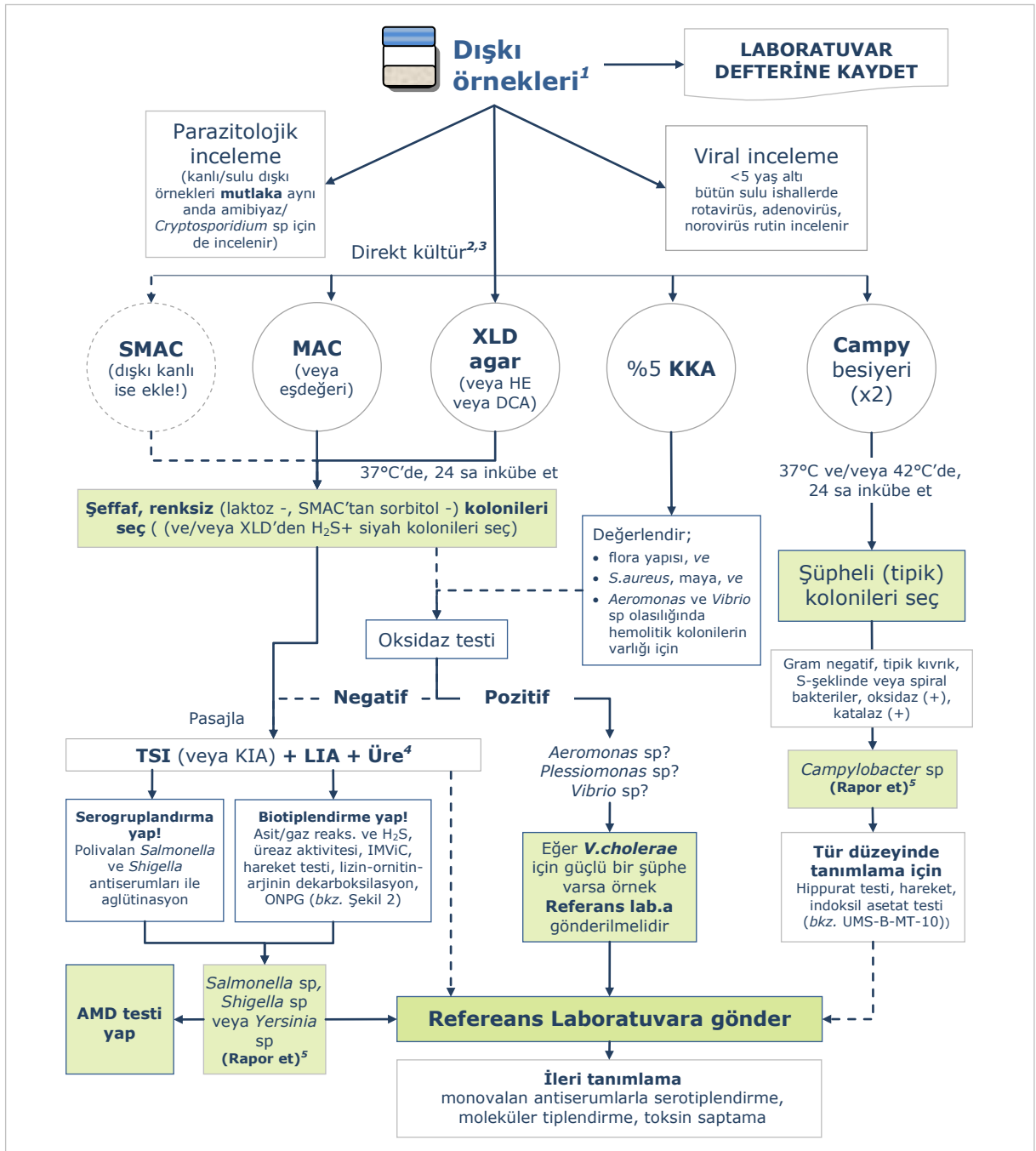
NOT 1: Dışkı ile atılan organizma sayısının düşük olduğu tahmin edilen durumlarda (ör., taşıyıcı/temaslı taramalarında) zenginleştirme amacıyla GN buyyon veya Selenit-F kullanılır. Bunun için dışkı örneği gelir gelmez buyyon içeren tüpe inoküle edilir ve 6 ila 8 saat inkübe edilir. Daha sonra üstte belirtilen besiyeri setine ekim yapılır.

NOT 2: Selenit-F bazı *Shigella* suşları için inhibe edici olabilir!

NOT 3: Sette *Campylobacter* besiyerleri de bulunmalı ve eş zamanlı ekim yapılmalıdır (diğer etkenler/olasılıklar için de ayrıca bkz. Şekil 1).

ÖNEMLİ: Kanlı dışkı örneği mutlaka Sorbitol-MAC’e de ekilmelidir!

- 35-37°C’de 18-24 saat inkübe edilir.



Şekil 1. Akut gastroenteritte etken tanısı için akış şeması.

¹ Rutin dışkı kültüründe *Salmonella* sp, *Shigella* sp ve *Campylobacter* sp **mutlaka** araştırılması gereken ajanlardır. EHEC tüm kanlı ishalli dışkıları ve HUS hastalarında araştırılmalı, kültür plakları setine SMAC eklenmelidir. EHEC laboratuvarın bulunduğu bölgedeki insidense göre ilaveten çocuk hastalarda, özellikle yaz aylarında araştırılabilir. *Yersinia* sp, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp, *Clostridium difficile* gibi patojenler hastanın kliniğine ve klinisyenin talebine göre çalışılabilir. Ancak yukarıdaki şemada kullanılan besiyerleri seti ile *Yersinia*, *V. cholerae*, *Aeromonas* izole etmek mümkündür ve özel olarak istenmemiş olsa da bu etkenlerden biri izole edildiğinde mutlaka tam tanımlama gerçekleştirilmeli, gerekiyorsa bunun için izolat Referans laboratuvara gönderilmelidir. Ayrıca dışkı örneklerinin farklı durumlarda inceleme kapsamı için bkz. "UMS, SY-01 Akut Gastroenteritte Sendromik Yaklaşım"

² Taşıyıcı/temaslı taramasında dışkıdan önce GN buyyona ekim yapılır; 4-6 sa inkübasyondan sonra besiyerlerine pasajlanır.

³ *Vibrio cholerae* şüphesinde burada verilen besiyeri setine TCBS besiyeri de eklenmelidir.

⁴ "TSI (KIA)+LIA+Üre" test paketi primer tanımlama için seçilebilecek en küçük biyokimyasal test setini oluşturur. Alternatif olarak "TSI (KIA)+IMViC+üre+lizin" kullanılabilir. Sonuç raporu tam bir biyotiplendirmeye ve en azından polivalan antiserumlarla yapılmış bir serotiplendirmeye dayanmalıdır.

⁵ Bütün bu etkenler (*Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Yersinia* sp, EHEC, *Campylobacter* sp) **laboratuvardan bildirimi zorunlu** etkenlerdir. İlgili birime hemen bildirim yapılmalıdır.

MAC, MacConkey agar; SMAC, Sorbitol MacConkey agar; KKA, Koyun kanlı agar; XLD, Xylose lysine desoxycholate agar; DCA, Deoxycholate citrate agar; HE, Hectoen-Enteric agar; Campy, *Campylobacter* sp besiyeri; Lab., laboratuvar; sa, saat; IMViC, indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat testleri; AMD, Antimikrobiyal duyarlılık; KIA, Kligler Iron Agar; TSI, Triple Sugar Iron Agar; LIA, Lysine Iron Agar; EHEC, Enterohemorajik *E. coli*; GN, Gram Negative (buyyon)

Kültür plaklarının değerlendirilmesi

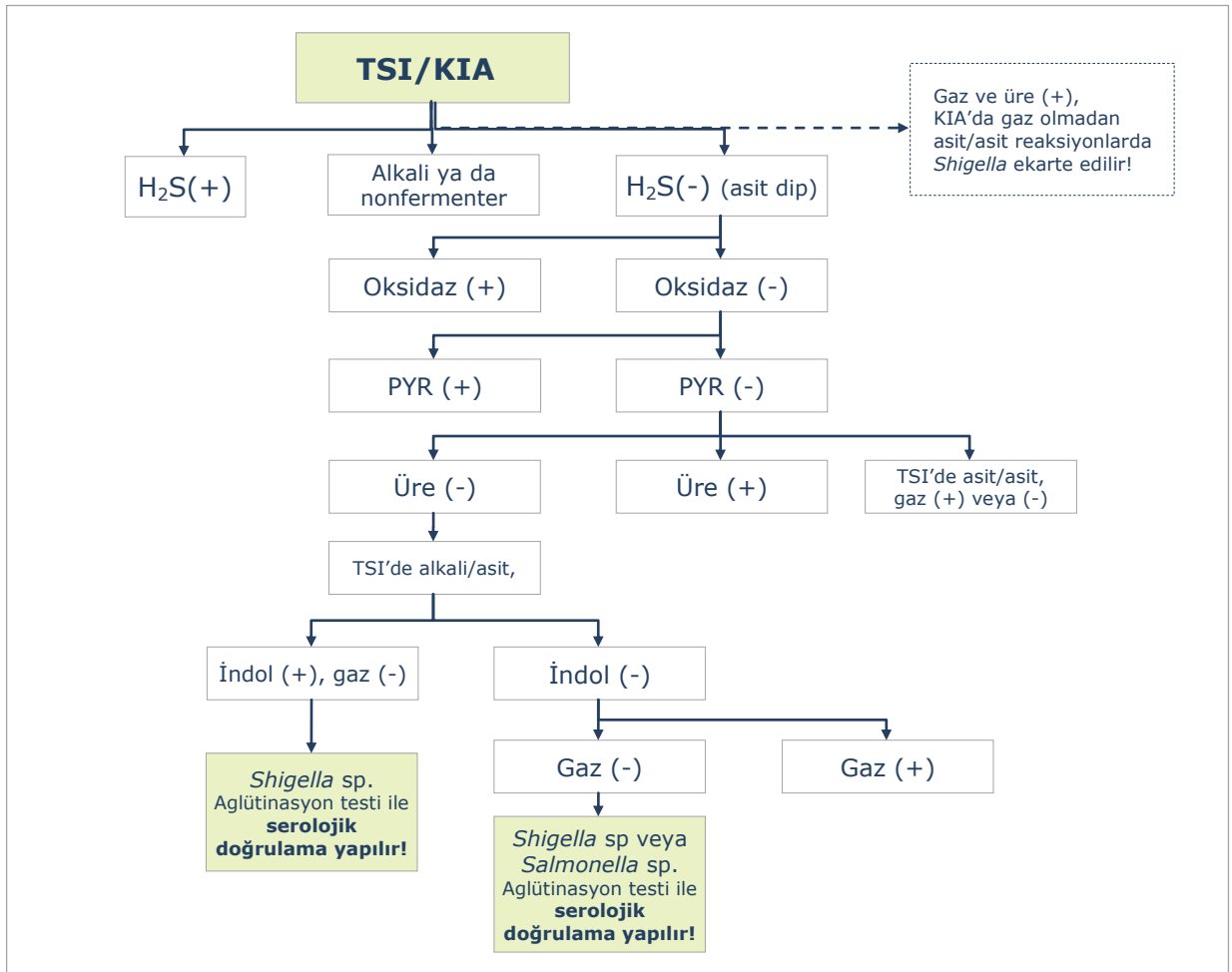
- İnkübasyon sonrasında bütün plaklar şüpheli enterik patojen kolonileri bakımından incelenirler. Genellikle temel ve seçici besiyerlerinde 18-24 saatte iyi gelişmiş koloniler görülmesi beklenir.
- Shigella* sp, XLD agarda 1-2 mm çaplı, besiyeri renginde, şeffaf-kırmızı renkli, DCA'da renksiz koloniler olarak görülür. *S. sonnei* geç laktoz fermentasyonu nedeniyle mat, pembe koloniler oluşturur. HE agarda yeşil (besiyeri renginde, şeffaf) renktedir (Tablo 1).

Tablo 1. *Shigella* spp izolasyonu için ekim yapılabilecek besiyerleri ve kültürlerde ilk üremelerin yorumlanması (ayrıca bkz. Ek-2)

Besiyeri	Yorum
GN buyyon	Dışkı ile atılan organizma sayısının düşük olduğu tahmin edilen durumlarda (ör., taşıyıcı/temaslı incelemesinde) zenginleştirme amacıyla kullanılır. Dışkı örneği bir tüp içindeki 5-7 mL besiyerine ekilip 6-8 saat inkübe edildikten sonra temel ve seçici besiyerlerine pasajlanır.
Selenite-F	Kullanım amacı GN buyyon gibidir. Bazı <i>Shigella</i> 'lar inhibe olabilir. Temel ve seçici besiyerlerine pasaj 8-24 saat inkübasyonu takiben yapılır.
MacConkey	Renksiz ve şeffaf koloniler
HE	Yeşil renkli (besiyeri renginde, şeffaf) koloniler
SS agar	Renksiz ve şeffaf koloniler (<i>Shigella sonnei</i> inhibe olabilir!)
XLD	Kırmızı (besiyeri renginde, şeffaf) koloniler
DCA	Renksiz ve şeffaf koloniler

Şüpheli kolonilerden tanımlama

- Şüpheli kolonilerden TSI veya KIA'ya pasaj yapılır ve 35-37°C'de 4-6 saat inkübe edilir.
- Bu sürenin sonunda TSI/KIA'da reaksiyonlar henüz değerlendirilemez ancak yeterli saf kültür üreme meydana geldiği için bazı tanımlama testlerinin yapılması adımlarına geçilebilir.
- Bu amaçla IMViC seti, üre ve amino asit dekarboksilaz testleri için amino-asit içeren tüplere (sette en azından lizin bulunmalıdır) inokülasyonlar yapılabilir ve TSI/KIA tüpleri dahil hepsi birlikte bir gece inkübe edilir. Ardından setteki tüplerde gözlenen reaksiyonlar değerlendirilerek karar verilir. IMViC setinin kullanımı ve diğer testler için ilgili UMS belgelerine bakılmalıdır.
- Tanımlama için Şekil 2'de verilen akış şemasından da yararlanılabilir. Bunun için TSI/KIA pasajının en az 18 saatlik inkübasyon süresi tamamlanmış ve beklenen reaksiyonların tam ayırt edilebilir hale gelmiş olması gerekir.
- Tanımlama basamaklarının sonunda izolatın *Shigella* sp olduğu söylenebilir. **Tür tayini** (kesin tanı) için aglütinasyon testi ile serolojik doğrulama (serogruplandırma) yapılmalıdır!



Şekil 2. Dışkı kültürlerinden TSI/KIA'ya yapılmış pasaj sonrası *Shigella spp* tanımlanması için izlenecek akış şeması.

Tablo 2. *Shigella* türlerinin serogrup ve serotip sistemi* (10)

<i>Shigella</i> (tür adı)	Serogrup adlandırması (polivalan antiserum)	Serotipler (monovalan antiserumlar)	(Ticari ürün üzerindeki etikette yazılı olabilecek diğer ifade)
<i>S. dysenteriae</i>	Group A	1 – 15 ^{a,b}	(A1, A2, A3,...,A13)
<i>S. flexneri</i>	Group B	1 – 6, X,Y	(B1, B2, B3, B4, B5, B6)
<i>S. boydii</i>	Group C	1 – 20 ^b	(C1, C2, C3,... ,C18)
<i>S. sonnei</i>	Group D	1	(D1)

* Yeni satın alınmış antiserumları kullanıma sokmadan önce prospektüse bakılmalı veya etiketi kontrol edilmelidir. Eğer ürün özelliği (içerdiği antiserumlar) için yeterli açıklama mevcut değilse üreticiye başvurulmalıdır. Tüm antiserum lotlarına kullanmadan önce kalite kontrol testi yapılmalıdır.

^a Virülansı ciddi derecede yüksek olan *S. dysenteriae* serotip 1'in saptanması yüksek ölüm oranları ile endemik veya epidemik dizanteriye neden olabildiğinden dolayı özel bir önem taşımaktadır. *S. dysenteriae* serotip 1'i tanımlayabilmek için sette monovalent antiserum (absorbe) bulunması gereklidir.

^b Ek 'geçici (provisional)' serotipler bildirilmiştir; bu yeni serotiplerin antiserumları henüz ticari olarak mevcut olmayabilir.

3.4. Serogruplandırma

- Biyokimyasal olarak *Shigella* türleri ile uyumlu izolatların **kesin tanısı** serogruplandırma yapılarak konur. Bunun için izolat nutrient agara pasajlanarak 35-37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra polivalan özellikteki antiserumlar ile aglütinasyon yapılır.

ÖNEMLİ: Laboratuvarlar, ticari *Shigella* antiserumlarının farklı isimlerle etiketlenmiş olabileceği konusunda dikkatli olmalıdırlar; iki farklı isimle etiketlenmiş ambalaj aynı antiserumları içeriyor olabilir *Shigella* polivalan ve monovalan antiserumları sistemi Tablo 2'de özetlenmiştir.

3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

- İzole edilen *Shigella* suşları doğrulama ve/veya ileri tanımlama, moleküler epidemiyolojik analiz ve antimikrobiyal duyarlılık testleri için Ulusal Referans Laboratuvara gönderilir.
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler.

Saklama

- Saklama için *Shigella* izolatlarının %16'lık gliserollü triptik soy buyyon içinde yoğun süspansiyonu yapılır ve -80°C'ye kaldırılır. Bu koşullarda bakteri 8-10 yıl saklanabilir. Yoğun süspansiyon hazırlayabilmek için izolatın nutrient agar plağına yapılmış yoğun pasajı kullanılmalıdır.
- İzolatların hem saklanması hem de yeniden canlandırılmasında gerekli besiyerleri ve teknikler için bkz B-TP-01 Suş Saklama Prosedürü.

Referans merkeze gönderme

- Ülkemizde yürürlükte olan bildirim sistemine göre *Shigella* sp **laboratuvardan** bildirimi zorunlu etkenler (Grup D etkenler). İlgili düzenlemelere göre "kesin tanı" almış sonuçlar bildirim esastır ve kesin tanı izolatın tür düzeyinde tanımlanmasını gerektirmektedir (1,2).
- Bu nedenle koloni görünümü ve temel biyokimyasal özellikleri ile *Shigella* sp olarak tanımlanmış suşların tür düzeyinde tanımlanması (serotiplendirilmesi) için izolatlar THSK Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarına gönderilmelidir.
- Tür düzeyinde tanımlama yapabilen laboratuvarların da epidemiyolojik incelemeler için bu izolatları Referans laboratuvara göndermeleri gerekmektedir (bkz. ilgili Sağlık Bakanlığı Yönergesi) (2,11).
- Suşlar yatık nutrient agara pasajlandıktan sonra bir gece 37°C'de inkübe edilerek Referans laboratuvara gönderilmek üzere hazırlanırlar.
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (12) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi). İzolatlara ait bilgileri içeren bilgi formu da *mutlaka* doldurularak paketin içine yerleştirilmelidir. Paket gönderilmeden önce laboratuvar telefon veya e-posta ile bilgilendirilmelidir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

4.1. Sonuçların raporlanması

- Biyokimyasal testler uygulanarak *Shigella* sp şeklinde tanımlanmış izolatlar hekime;
 “*Shigella* sp üredi. Serolojik tanımlama ve antimikrobiyal duyarlık testleri devam etmektedir.” şeklinde ön rapor ile bildirilir.
 ÖNEMLİ NOT: Eğer laboratuvar tür düzeyinde tanımlama yapamayacak ise bu raporda “Kesin tanısı ve antimikrobiyal duyarlılık testi Referans Merkez’de yapılacaktır” ifadesi yer almalı ve izolat Referans laboratuvara gönderilmelidir.
- Serolojik doğrulama testleri (serogruplama ile tür tayini) yapıldıktan sonra kesin rapor gönderilir. Kesin raporda izolatın cins ve tür adı açık olarak yazılı olmalıdır. Örneğin; “*Shigella sonnei* üredi” şeklinde.
 NOT 1: Ayrıca ilgili birimlere “kesin tanı” olarak bildirim yapılmalıdır.
 NOT 2: Bu izolatlar da Referans laboratuvara gönderilmelidir (bkz. ilgili Sağlık Bakanlığı Yönergesi) (2,11).
- Basilli dizanteri etkeni *Shigella*’lar sağlıklı çocuk ve yetişkinlerde kendini sınırlayan enfeksiyonlar oluştururlar. Yine de bütün *Shigella* enfeksiyonlarında antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması önerilir.
- Bazı bölgelerde antimikrobiyal ilaçlara çoklu direnç görülebilir. Tedavide kullanılması önerilen antimikrobiyal ilaçlar; ampisilin, trimetoprim-sülfametaksazol ve kinolon türevleridir.
- *Shigella* türlerinin antimikrobiyal duyarlılık testleri EUCAST önerileri doğrultusunda *Enterobacteriaceae* türleri için kullanılan disk difüzyon, mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri ile yapılır.
- Disk difüzyonda:
 - (a) Besiyeri - Mueller-Hinton agar
 - (b) İnokulum - 0.5 McFarland standardına uygun bulanıklıkta
 - (c) İnkübasyon - Normal atmosferde, 35±1°C, 18±2 saat
 - (d) Değerlendirme - İnhibisyon zonu sınırı, yansıyan ışıkla aydınlatılmış siyah bir zemin üzerinde plağa tersinden bakıldığında, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilir.
 - (e) Kalite kontrol suşu - *Escherichia coli* ATCC 25922

4.2. Bildirim

- *Shigella* spp ülkemizde bildirimi zorunlu etkenler arasındadır. Bildirim listesinde Grup D etkenleri içinde yer alır ve bildirimi doğrudan laboratuvarlar tarafından yapılır (2,11).
 - (a) Tür düzeyinde tanısı konmuş (kesin tanı) bütün vakaların, en kısa sürede bildirimleri toplayan ilgili birime ilgili Rehberdeki prosedür izlenerek bildirimi yapılmalıdır.

(b) Tanı sadece "*Shigella* sp" şeklinde konmuş ise tür tanısı için Referans laboratuvarından sonuç beklenirken bu izolasyon ilgili birime de haber verilmelidir.

- Her iki durumda da akılda tutulması gereken husus, vakanın bir salgınla ilişkili olabileceğidir. Bu nedenle her zaman sonuçlar ilgili sağlık otoriteleri ile mümkün olan en kısa süre içinde paylaşılmalıdır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Shigella*'ların bazı suşları -özellikle gastrointestinal sistem dışında izole edilenler- doğrulanmak üzere referans laboratuvara gönderilmelidir, zira bazı anaeroben *E. coli* suşları antiserumlarla çapraz reaksiyon vererek yanlış pozitif sonuçlara neden olurlar.
- Shigella*'lar kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olsa da kan kültürlerinde üremezler.
- SS agar, *S. dysenteriae* serotip 1 suşlarının üremesini baskılayabilir. Seçici besiyeri olarak tek başına kullanılmamalıdır.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 565 5507

Görev çerçevesi

Klinik örneklerden *Shigella* spp için tanı, doğrulama, serotiplendirme, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin ve moleküler tiplendirmelerin yapılması; dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması, "Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA)" kapsamında enterik bakterilerin laboratuvara dayalı sürveyans çalışmalarını yürütmek.

UEPLA, bildirimi zorunlu hastalıkların sürveyansı sistemine laboratuvarların etkin katılımını sağlamak amacıyla oluşturulan bir 'laboratuvara dayalı sürveyans ağı'dır. 2007 yılında kurulan bu ağ kapsamında *Salmonella*, *Shigella*, Enterohemorajik *E. coli* ve *Campylobacter* türleri incelenmekte olup, zaman içinde etken yelpazesinin genişletilmesi ve katılımcı laboratuvar sayısının artırılması ile ülkemizdeki enfeksiyon eğilimleri ve suş dağılımları hakkında bilgi edinilmesi ve bu verilerin halk sağlığının korunmasına yönelik kullanılması hedeflenmektedir.

UEPLA kapsamında 2007-2011 yılları arasında katılımcı laboratuvarlardan en sık *Salmonella* izole edilerek gönderilmiş olup, bunu *Shigella* ve *Campylobacter* izolatları izlemiştir. *Salmonella* serotipleri sıklık sırasına göre *S. Enteritidis* (%65.7), *S. Typhimurium* (%6.1) ve *S. Paratyphi B* (%5.7) olarak sıralanmıştır. *Shigella* izolatları ise *Shigella sonnei* (%68.3), *S. flexneri* (%26.1), *S. boydii* (%3.1) ve *S. dysenteriae* (%1.6) olarak serogruplandırılmıştır. En sık saptanan *Campylobacter* türleri *C.jejuni* (%69.3) ve *C. coli* (%28.1) olarak belirlenmiştir (13).

Ekler

Ek-1 Besiyeri kalite kontrol suşları ve beklenen reaksiyonlar

Enterik patojenlerin tanısında kullanılan besiyerleri	Kontrol suşu (ATCC) ¹	Üreme ve koloni görünümü ²
MAC		
MAC plakları uçuk kırmızımsı pembe ve hafif opalesan görünümündedir	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İyi üreme; pembe-kırmızı koloniler (safrayı presipite etmiş görünümde)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>S. aureus</i> 'un 18-24 saatlik buyyon kültüründen 10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğerlerinin ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İyi üreme; laktöz içermeyen besiyerinde renksiz koloni oluşumu
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (13048)	İyi üreme, pembe-kırmızı koloniler
	<i>Proteus mirabilis</i> (12453)	İyi üreme; renksiz koloni oluşumu
	<i>Salmonella</i> Enteritidis (13076)	İyi üreme; renksiz koloni oluşumu
	<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	İnhibe olur
	<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (kısmi veya tam)
SS medium		
SS agar plakları şeffaf ve uçuk ya da somon pembe görünümde olmalıdır.	<i>S. Typhimurium</i> (14028)	İyi üreme; renksiz koloniler, siyah merkezli, H ₂ S (+)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>E. coli</i> 'nin 18-24 saatlik buyyon kültürlerinden 10 ⁴ -10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğer organizmaların ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Shigella flexneri</i> (12022)	Orta veya iyi üreme; renksiz koloniler, H ₂ S (-)
	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İnhibe olur (kısmi); pembe-kırmızı koloniler, H ₂ S (-)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (tam)
HE Agar		
HE Agar plakları yeşil veya koyu yeşil renkli jel gibi görünmelidir	<i>S. Typhimurium</i> (14028)	İyi üreme; yeşilimsi mavi koloniler, siyah merkezli, H ₂ S (+)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>E. coli</i> 'nin 18-24 saatlik buyyon kültürlerinden 10 ⁴ -10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğer organizmaların ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Shigella flexneri</i> (12022)	İyi üreme; yeşilimsi mavi koloniler
	<i>E. coli</i> (25922)	İnhibe olur (kısmi), somon-turuncu koloniler, safrayı presipite edebilir
	<i>E. faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (kısmi veya tam)
XLD agar		
XLD agar plakları açık kırmızıdan kırmızımsı-turuncuya ve nispeten şeffaf görünüyör olmalıdır. ³	<i>S. Typhimurium</i> (14028)	İyi üreme; kırmızı koloniler, siyah merkezli, H ₂ S (+)
KK ekimleri için; <i>E. faecalis</i> ve <i>E. coli</i> 'nin 18-24 saatlik buyyon kültürlerinden 10 ⁴ -10 ⁵ cfu/plak olacak şekilde; diğer organizmaların ise 10 ³ -10 ⁴ cfu/plak olacak şekilde dilüsyonları kullanılır.	<i>Shigella flexneri</i> (12022)	İyi üreme; kırmızı koloniler
	<i>Escherichia coli</i> (25922)	İnhibe olur (kısmi veya tam); sarıdan sarı kırmızıya
	<i>Enterococcus faecalis</i> (29212)	İnhibe olur (kısmi)
KKA (%5 Koyun kanlı agar)		
KKA plakları parlak kan kırmızısı ve düzgün yüzeyli görünüyör olmalıdır. ⁴	<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	Beyaz/altın sarısı koloniler; β-hemoliz yapabilirler
ÖNEMLİ: Kanın ilave edildiği sıcaklık yüksek olduğunda görünümün kahverengine döneceği ve hemolizin izlenemeyeceği hatırlanmalıdır.	<i>Streptococcus pyogenes</i> (19615)	Grimsi koloniler; β-hemoliz yapar
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (6303)	Gri-yeşilimsi koloniler; α-hemolitik, yeşilimsi bir halo ile çevrelenmiş gibi görünüm; mukoid olabilirler

¹ Alternatif olarak listedeki kontrol suşlarının yerine, biyokimyasal olarak tam tanımlanmış klinik izolatlar kullanılabilir.

² Plaklar 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında üreme, koloni büyüklüğü, reaksiyonlar ve seçicilik açısından incelenir

³ Yüksek ısı presipitasyona neden olur. Bu durumda reaksiyonlar uygun, ancak koloniler hafifçe ufaktır. Agar yüzeyi düz ve aşırı olmamak kaydıyla nemli olmalıdır.

⁴ KKA'da β-hemolitik görünen diğer organizmalar da (ör., *Listeria*, *Corynebacteria*, *E. coli*'nin hemolitik kökenleri, *Pseudomonas* türleri vb.) KK suşları olarak kullanılabilirler.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (*Shigella* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, SY-01	Akut gastroenteritte sendromik yaklaşım
UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-04	Hareket testi
UMS, B-TP-06	IMVIC testleri
UMS, B-TP-09	Karbonhidrat fermentasyon ve oksidasyon testleri
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-11	KIA/TSI testleri
UMS, B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/dihidrolaz testleri
UMS, B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler's) boyama
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, B-TP-17	ONPG testi
UMS, B-TP-19	PYR testi
UMS, B-TP-22	Üreaz testi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, B-MT-06	Lejyoner hastalığının mikrobiyolojik tanısı Ek-2 (besiyeri kalite kontrolü için örnek prosedür)
UMS, B-MT-08	<i>Salmonella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-10	<i>Campylobacter jejuni/coli</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi (EUCAST)
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 4 Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 603-626

- 5 York MK, Rodrigues-Wong P. Fecal culture for aerobic pathogens of gastroenteritis. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.8.1.1 – 3.8.1.21.
- 6 UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Shigella* species. Bacteriology – Identification, ID 20, Issue no: 2.1, Issue date: 21.10.11. <http://www.hpa.org.uk/SMI> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 7 Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü. 2008
- 8 European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2013. <http://www.eucast.org> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 9 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press , Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 10 Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. Center for Diseases Control and World Health Organisation, 2003.
- 11 S.B. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünün 24.02.2004/1534 tarih-sayılı Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Yönergesi. 2004.
- 12 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 13 Levent B, Güleşen R, Kalaycıoğlu H, Sezen F, Gözalan A, on behalf of UEPLA participants. National Enteric Pathogens Laboratory-based Surveillance Network (UEPLA) in Turkey, July 2007-June 2011. 22nd ECCMID, 31 Mar-3 Apr 2012, Londra, UK. 2012, p. 698.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Campylobacter jejuni/coli Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-10
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Hastalığın önemi.....	3
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikler.....	5
Mikrobiyolojik tanı	5
TEKNİK BİLGİLER	7
1 Hedef mikroorganizmalar	7
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	7
3 <i>Campylobacter</i> spp tanısında kullanılan teknikler	10
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	14
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	15
6 Referans Laboratuvar	16
EKLER.....	17
Ek-1 Modifiye Cary-Blair Transport besiyeri ^{13,20}	17
Ek-2 EUCAST Disk Difüzyon	18
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	19
KAYNAKLAR.....	19

Kapsam ve Amaç

Campylobacter jejuni ve *Campylobacter coli* akut bakteriyel gastroenteritlerin önde gelen nedenleri arasındadır. Daha az sıklıkla olmakla beraber diğer bazı *Campylobacter* türleri de akut gastroenteritlere neden olabilmektedir. Klinik bulgular özgül olmadığından tanı yalnızca laboratuvar incelemesiyle konabilir.

Kampilobakteriyoz dünya genelinde yaygın bir zoonozdur. Bugün *C. jejuni/coli* dünyanın pek çok yerinde *Salmonella* spp ve *Shigella* spp kadar sık izole edilen enterik patojenler olarak dikkati çekmektedir. Enfeksiyonun yayılmasından kontamine gıdalar ve su sorumludur. Evcil veya vahşi hayvanlar ve kuşlar doğada sulara bulunan *Campylobacter* organizmalarının en önemli kaynaklarıdır. Diğer enterik patojenler gibi *C. jejuni* için de ayrıca fekal-oral yol ve kişiden kişiye bulaş bildirilmiştir (1).

Campylobacter spp gıda (ve bazen su) kaynaklı kitlesel salgınlar yapabildiğinden, halk sağlığı önemine sahip patojenlerdir ve ülkemizde **laboratuvar**dan bildirimi zorunludur (2,3). Ancak ülkemizde klinik laboratuvarların çok azı bu etkenin tanısı ile ilgili inceleme yapabilmektedir. 2012 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından ulusal mikrobiyoloji laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun incelendiği bir çalışmanın sonuçlarına göre klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının (n=530) sadece %3.2'sinin *Campylobacter* spp izolasyonu yapabildikleri gözlenmiştir (4). Vakaların önemli bir kısmının hatta salgınlarının bu nedenle tanı alamadığı düşünülürse, uygun bir prosedürün el altında olması tanının yaygınlaşmasını da teşvik edecek bir araç olarak önemli görünmektedir. Nitekim bu UMS belgesinin amacı klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına akut gastroenterit tanısında bakteriyel etkenler tanı paneli içinde *Campylobacter* türlerinin tanısının da konulabilmesi için geçerli tanı yöntemlerine dair yardımcı bir rehber sunmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST	European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing
Gullian-Barre Sendromu	Periferik sinir sisteminin akut başlangıçlı, bağışıklık sistemi bozukluğuna bağlı olarak genellikle enfeksiyon sonrasında gelişen, gevşek felçle seyreden hastalığı

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Campylobacter türlerinin neden olduğu akut gastroenteritler dünyanın pek çok bölgesinde *Salmonella* spp ve *Shigella* spp ile birlikte ilk üç sırada yer almaktadır. Epidemiyolojik araştırmalar Afrika ve Asya'da insidansın %19 ila %38 arasında olabildiğini, özellikle çocuklarda asemptomatik taşıyıcılık oranlarının da %9 ila %40 arasında olabildiğini göstermektedir (1,5).

Laboratuvar tanısının yeterince yaygın olmayışı ve bağlı olarak bildirimlerin yetersizliği nedeniyle ülkemizde *C. jejuni* /*coli* enfeksiyonlarının yaygınlığına dair bilgilerimiz yapılan genellikle küçük ölçekli araştırmalarda elde edilen bulgularla sınırlıdır. Buna göre görülüş sıklığının %0.63 ila %16.4 arasında değişebildiği ve bazı serilerde *Salmonella* ve *Shigella* türlerinden daha sık izole edildiği dikkati çekmektedir (6,7,8,9,10).

C. jejuni /*coli* gastrointestinal sistemin önemli invaziv patojenleridir. Diğer bir invaziv etken olan *Escherichia coli* O157:H7 enfeksiyonunda da hemolitik üremik sendroma (HÜS) görülebilmesi nedeniyle, etkenin tanımlanması hem hasta yönetimi hem de enfeksiyonun kaynağına yönelik incelemeler ve kontrol önlemleri açısından önem taşımaktadır (11).

Gastrointestinal sistemden sıklıkla *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. helveticus* ve *C. upsaliensis* izole edilirken, barsak dışı (yara, abse vb.) enfeksiyonlarda *C. fetus* subsp. *fetus*, ve daha az sıklıkla *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. sputorum* etken olarak saptanabilmektedir. *C. curvus*, *C. rectus* ve *C. gracilis* de periodontal hastalık ile ilişkili bulunmuştur (11,12).

Gastrointestinal sistemin *Campylobacter* enfeksiyonlarının %90'ından fazlasında, dışkı kültürlerinde *C. jejuni* tanımlanır. Ayrıca ishali olgularda daha az sıklıkla *C. coli* ve *C. fetus* subsp. *fetus* izole de edilir. *C. jejuni* gastroenteriti kendi kendini sınırlayan bir enfeksiyon olmasına rağmen bazen gençlerde ve immün düşkün hastalarda ciddi seyredebilir. Diğer türler, tanımlanma ve izolasyon zorluğu nedeniyle birçok laboratuvar da çalışılmamaktadır (11,13).

İnsanlarda hastalığın kaynağının en fazla kontamine kümes hayvanı etleri olduğu kabul edilmektedir. Bulaş enfekte tavuk etlerinin iyi pişirilmeden yenmesi, çapraz bulaşa açık mutfak tezgahlarında hazırlanan taze gıdalar, bazen de iyi pastörize edilmemiş süt yoluyla olmaktadır. Kedi ve köpek gibi ev hayvanları da taşıyıcı olabilirler. Enfeksiyonlarına özellikle erken ilkbahar ve sonbahar aylarında (kanatlıların da en fazla enfekte oldukları aylara paralel) rastlanır.

Campylobacter türlerine bağlı gastroenterit olgularının tavuk eti tüketiminin son yıllardaki artışına paralel olarak artması, araştırmacıları bu ilişkiyi tanımlamak üzere harekete geçirmiş; yapılan çalışmalar, tavuk etinin mezbahalarda kesim işlemleri sırasında bağırsak içeriği ile kontamine olduğunu göstermiştir. Ayrıca, marketlerde satılan kullanıma hazır tavuk etlerinin neredeyse tamamında *Campylobacter jejuni* saptanmıştır (14).

Mikroorganizmanın özellikleri

Campylobacter cinsi bakteriler son zamanlarda geliştirilen genetik teknikler ile 16S rRNA yönünden 3 ayrı cinse ayrılmıştır. *Campylobacter*, *Helicobacter* ve *Arcobacter* olarak isimlendirilen bakteriler mikroaerofilden anaerobiğe değişen özellikler gösterirler. *Campylobacter* türleri kıvrık, helezonik sarmallı, gram negatif bakterilerdir. Hastalık yelpazesi "iyi bilinen" (*C. jejuni* ve ishal ilişkisi gibi) ya da "tartışmalı" olanlar yanında (*Arcobacterium* türleri gibi insanda hastalık yaptığı tam bilinmeyen suşlar), sorun olarak "yeni tanımlanmış türler"e kadar genişir (*C. upsaliensis* ve *Helicobacter rappini* gibi). Sıcaklık, inkübasyon atmosferi gibi üreme özellikleri nedeniyle bu cins içinde yalnızca en iyi bilinen birkaç tür klinik laboratuvarlarda araştırılır (11,15).

Campylobacter spp, mikroaerofilik (%5-10 CO₂ gereksinimi) ve termofiliktir (42°C ile 37°C'de ürerken 25°C'de ürememe özelliği).

İnsanda patojen kabul edilen *Campylobacter* türleri termofilik *Campylobacter*'ler olarak isimlendirilmektedir. *Campylobacter* cinsi içindeki tüm türler 37°C'de üreyebilir. Patojen termofilik türler ise 42°C'de daha iyi üreme gösterir. Termofilik olmaları, primer enfeksiyon kaynağı kabul edilen kuşların gastrointestinal sistemlerine uyum göstermelerini sağlar (14).

Seçici besiyerlerinde kreme kaçan gri ya da gri/beyaz, nemli koloniler oluştururlar; hareketli ve oksidaz pozitiftir (15).

Campylobacter türlerinin üreyebilmesi için düşük oksijen ve yüksek karbondioksit konsantrasyonu gerekmektedir. Isı düştüğünde, ortamdaki besin miktarı azaldığında hızla, kültürde üretilemeyen ancak canlı ortamda enfeksiyon oluşturabilen formlara dönüştükleri, bu sayede besinler üzerindeki ve doğadaki varlıklarını sürdürebildikleri bilinmektedir (14).

Klinik özellikler

Campylobacter türlerine bağlı intestinal enfeksiyonlar hafif kendini sınırlayan bir ishalden, yüksek ateş ve kas ağrılarının da görüldüğü ciddi fulminan enterokolite kadar değişen görünümelerde ortaya çıkabilir. İnkübasyon süresi alınan bakteri miktarına da bağlı olarak bir-yedi gün arasındadır. Genellikle, mikroorganizmanın ağız yoluyla alınmasını izleyen 2-5 gün içinde ishal, karın ağrısı ve ateş ile başlar. Karın ağrısı abdominal kramplar şeklindedir. Dışkı başlangıçta mukoid ve sıvı karakterde iken giderek kan ve pürülan kısımlar içeren bol sulu bir ishale ilerleme olabilir. Semptomlara bulantı ve kusma eşlik edebilir. Enfeksiyon genellikle bir haftada kendini sınırlar ancak bağışık sistemi baskılanmış kişilerde kan dolaşımı enfeksiyonları izlenebilir. Vakaların %25'inde nöks görülürse de seyir ilk ataktan daha ılımlıdır (1,5).

Kümes hayvancılığı sektöründe yaygın kinolon kullanımı son yıllarda artmış (%10 ila %40) kinolon direncine neden olmuş, bu nedenle tedavide eritromisin yeniden öncelikli seçenek haline gelmiştir. Ancak eritromisine de zaman zaman direnç görülebilmektedir. Tedavi planlanan hastalara, direnç olasılığının araştırılması için AMD testi yapılması önerilmektedir. Rutin AMD testi önerilmez (11,16).

Mikrobiyolojik tanı

Campylobacter enfeksiyonlarının kesin tanısı mikrobiyolojik incelemeye dayanır ve kültür 'altın standart' tanı yöntemidir. İnsanda enfeksiyonun araştırılmasında temel sorunlardan biri *Campylobacter* spp'nin dışkıdan izolasyonunun görece güç ve biraz zaman alıcı olmasıdır (11). Buna bağlı olarak da özellikle kaynakları sınırlı bölgelerde tanısı yaygın konulamamakta; dolayısı ile vakaları ve hatta salgınları önemli ölçüde atlanmaktadır.

Campylobacter türleri dışkıdan ve ayrıca enfeksiyonun yerine göre kan kültürü örneklerinden ya da yara/abse örneklerinden uygun besiyeri ve uygun atmosferik şartlarda üretilebilirler. Akut ishale dışkıdan izolasyonda *Campylobacter* spp üremesini destekleyen ve flora bakterilerinin üremesine izin vermeyen seçici besiyerleri kullanılır. Bugüne kadar çok çeşitli seçici besiyerleri geliştirilmiştir.

Önerilen seçici besiyerleri başlıca iki tipte olabilir; *birincisi* kan içermeyen seçici besiyerleridir ki CCDA (kömürlü sefaperazon deoksikolat agar) ve CSM (kömür bazlı selektif besiyeri) bunlar arasındadır. *İkinci* grupta ise kan içeren besiyerleri bulunur ve bunlar başlıca Campy-CVA (sefoperazon, vankomsin, amfoterisin), Skirrow ve Butzler besiyerleridir (15). İzolasyon başarısı en yüksek olan besiyerinin Campy-CVA olduğu ileri sürülmektedir. Öte yandan araştırmalar bu besiyerlerinden yalnızca birinin izolasyonda yeterli olmayabileceğini; bir kan içeren besiyerinin (Campy-CVA) yanında bir kömür içeren besiyerinin de kullanılmasının izolasyon şansını %15 kadar artırabileceğini göstermektedir ve laboratuvarların böyle bir kombinasyonu kullanması önerilmektedir (15).

Kültür plaklarında mikroaerofil ortamda 42°C'de üremiş kolonilerin oksidaz pozitif bulunması ve Gram boyası ile karakteristik boyanması (gram negatif, kıvrık, S biçimli vb) izolatu *Campylobacter* spp olarak tanımlamak için yeterlidir (11,12,15). Oksidaz negatif olan örneklerin ise, koyun kanlı agara yapılan pasajlarından en az 24 saat sonra tekrarlanan oksidaz testini takiben ekarte edilmesi önerilir (11).

Klinik mikrobiyologlar normalde bakteriyel gastroenterit tanısı için gelen dışkı örneklerinden Gram boyama yapmayı düşünmezler, ancak bu *Campylobacter* enteritlerinin ön tanısında hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Karakteristik morfolojisi ile *Campylobacter* spp akut ishalde dışkı örneklerinden Gram boyama ile %66-94 duyarlılık ve %95'in üzerinde özgüllük ile tanımlanabilmektedir. Faz kontrast ve karanlık alan mikroskopisi de taze dışkı örneklerinin incelenmesinde ve doğrudan hareketli *Campylobacter*lerin gözlenmesinde kullanılabilir, ancak bu yöntemlerin duyarlılığı henüz yeterince değerlendirilmemiştir ve daha fazla teknik deneyim gerektirmektedir (15). *Campylobacter* enfeksiyonu sırasında kültür pozitif olguların %25-80'inde fekal lökositlerin görülebildiği bildirilmiştir.

Tanıda hızlı antijen saptama yöntemleri de geliştirilmiştir. Bu testlerin kültürle karşılaştırıldığında duyarlılığı %89-96 arasında değişmektedir, özgüllüğü ise %97'den fazladır. Doğrudan dışkıdan EIA ile çalışılıp 2-3 saat içinde sınırlı bir sonuç alabilmek mümkündür (11,13).

Ticari olarak dışkıdan *Campylobacter* spp'nin amplifikasyonu için kullanılabilen kitler mevcut olmamakla birlikte, tanıda moleküler yöntemlerden yararlanılabilir. Ancak maliyeti rutinde kullanmak için henüz uygun değildir (11,13).

C. jejuni/coli'nin ishalleri olgulardan tanısı için yöntemler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *Campylobacter* spp mikrobiyolojik tanı yöntemleri ve yorumlama

Tanı Yöntemi	Besiyeri	Yorum	Sonuçlanma süresi
Gram boyama		Zıt boya olarak %10 karbol fuksin kullanıldığında karakteristik kıvrık, helezonik sarmal görünüm	1/2 gün*
Kültür	Seçici <i>Campylobacter</i> besiyeri** tercihen 1 kanlı ve 1 kömürlü by plağı	Mikroaerofilik atmosferik şartlarda inkübe edilir. Şeffaf ve nemli görünümlü zor üreyen, agar yüzeyinden taşmış görünümü veren, oksidaz pozitif, gram negatif boyanan koloniler	2-4 gün*

* Sonucun çıkış süresi için laboratuvar ile bağlantı kurulmalıdır.

** Kömürlü besiyerleri: CCDA (kömürlü sefaperazon deoksikolat agar) ve CSM (kömür bazlı selektif besiyeri); kanlı besiyerleri Campy-CVA (sefoperazon, vankomsin, amfoterisin) ve Skirrow besiyeri

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Campylobacter jejuni ve diğer *Campylobacter* türleri

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Dışkının mikrobiyolojik incelemesi, insanda patojen olan ve Risk Grubu 2 olarak sınıflandırılan pek çok mikroorganizmaya maruz kalma potansiyeli taşır. Bu mikroorganizmaların tanısı için kullanılan bütün incelemeler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir (BGD2 düzey, çalışma koşulları ve dikkat edilmesi gereken konular için bkz. Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi).

Bu prosedür uygulanırken daima **eldiven** giyilmelidir!

Boyanmış olsun olmasın bütün lamalar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

C.jejuni/coli tanısı için örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Dışkı ve rektal sürüntü örnekleri alınabilir.
- **Dışkı**, tanıda birinci seçenektir. Örnek, ishalin başladığı ilk günlerde, mümkün olduğunca erken dönemde ve antibiyotik tedavisine başlanmadan önce alınmalıdır. En az 4-5 g (sulu ise 4-5 mL) taze dışkı örneği alınmalıdır. Örneklerin laboratuvara ulaşması 2 saati aşacak ise, dışkı örnekleri Modifiye Cary-Blair veya kömürlü Amies besiyeri gibi bir taşıma besiyeri içinde gönderilmelidir (15,17).

NOT: *Campylobacter* şüphesinde izolasyon şansını artırmak için, özellikle laboratuvara ulaşma süresi 2 saatin üzerinde olan durumlarda, hastadan ikinci bir örneğin de alınması önerilir (15).

- **Rektal sürüntü**, aynı hastaya ait en az 2 sürüntü şeklinde olmalıdır. Rektal sürüntü alındıktan sonra eğer örneğin laboratuvara ulaşması 2 saatten uzun sürecek ise eküvyonlar taşıma ortamına konmalıdır. Bunun için Modifiye Cary-Blair taşıma besiyeri kullanılması önerilir. Alternatif olarak; kömürlü Amies taşıma besiyeri kullanılabilir.
ÖNEMLİ: Taşıma ortamı olarak Stuart besiyeri veya fosfat tamponlu gliserol uygun değildir, önerilmez!
- Örneklerin en kısa sürede (<30 dk) laboratuvara ulaştırılması ve işleme alınmaları idealdir. Eğer gecikecekse mümkünse taşıma besiyeri içinde veya +4°C'de tutmak kaydı ile örnekler 48 saate kadar gönderilebilir. 48 saati aşan taşıma süreleri için örneklerin -70°C'de dondurulması ve kuru buz içinde laboratuvara gönderilmesi gerekir.

Besiyerleri

- *Campylobacter* taşınmasında ve izolasyonunda kullanılan besiyerleri ve antibiyotik supplementler piyasadan hazır temin edilebildiği gibi laboratuvar da hazırlanabilir.
- Modifiye Cary-Blair taşıma besiyeri - 5 g/L yerine 1.6 g/L agar içerir (13). Laboratuvar da hazırlanışı için bkz. Ek-1.
- Kömürlü Amies taşıma besiyeri
- *Campylobacter* seçici besiyerleri - Hazırlanmaları genellikle zahmetlidir ve standardizasyon sorunu olabilir. Tamamında, seçici özellik için antibiyotikler kullanılır. Antibiyotikler laboratuvar da ayrı ayrı hazırlanıp (uygun konsantrasyonda) derin dondurucuda saklanarak besiyerine katılabilir (bkz. antibiyotik supplement hazırlanması için örnek prosedür "UMS, B-MT-01 Boğmaca, Ek-2"). Kan (defibrine koyun kanı veya at kanı) %5-10 oranında olacak şekilde eklenir. Besiyerleri aşağıda listelenmiş ve başlıca özellikleri verilmiştir:
 - (a) **CCDA** (Charcoal cefaperazon deoxycholate agar) - Kömür, deoksikolat ve sefaperazon içerir. Kan gerektirmediği için görece kolay hazırlanır.
 - (b) **Kansız kömürlü Columbia agar** - Kömür, pirüvat ve hemin içerir; sefaperazon, vankomisin ve amfoterisin B eklenir. Kan eklenmediği için görece kolay hazırlanır.
 - (c) **Campy-CVA** - *Brucella* agar baza %5 **koyun kanı** ve sefaperazon, vankomisin, amfoterisin B eklenerek hazırlanır.
 - (d) **Skirrow** besiyeri - kalp infüzyonu, kazein, pepton, maya özütü, sodyum klorid içeren baz besiyerine defibrine **at kanı**, vankomisin, trimethoprim ve polimiksin B eklenerek hazırlanır.
 - (e) **Butzler** besiyeri - Et özütü ve pepton içeren baz besiyerine defibrine **at kanı**, novobiyosin, kolistin, sefazolin, basitrasin ve klorheksimid eklenerek hazırlanır.
- Koyun kanlı agar - %5 koyun kanlı hazırlanmış genel amaçlı besiyeri
- MH-F - Mueller-Hinton agar bazına defibrine at kanı (%5) ve β -NAD (20 mg/L) eklenerek hazırlanır. EUCAST standartlarında antimikrobiyal duyarlılık testinde kullanılan besiyeridir.

Reaktif / Kit / Suş

- Biyotiplendirme için reaktifler –Gram boyama ve Loeffler’in metilen mavisi reaktifleri, oksidaz, katalaz, hippurat reaktifleri, indoksil asetat diskleri (bkz. sayfa 19 “İlgili Diğer UMS Belgeleri”)
NOT: Gram boya seti karbol fuksin içermelidir (bkz. UMS, B-TP-03)
- Bazik fuksin, %0.1’lik - *Campylobacter* spp için alternatif zıt boyama reaktifi (bkz. UMS, B-TP-03)
- Sefalotin (30 µg) ve Nalidiksik asit (30 µg) diskleri – kısa süre için +4°C’de, uzun süre için -20°C’de saklanmalıdır. Kullanım öncesi son kullanma tarihi kontrol edilmelidir
- Antibiyotik diskleri (18)
- *C. jejuni* ATCC 33560 (EUCAST) ve diğer kalite kontrol suşları

Diğer gereç, donanım

- İnkübatörler, 42°C ve 35-37°C’ye ayarlanmış
- Mikroaerofilik ortam sağlamak için jar
- Mikroaerofilik ortam gaz paketleri - %5 O₂, %10 CO₂, %85 N₂ içeren atmosferik şartları sağlayacak özellikte, katalizörsüz, anaerobik jarda kullanıma uygun olmalıdır.
- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (19).
- 0.5 McFarland bulanıklık standardı, McFarland bulanıklık ölçer / turbidometri
- Membran filtre, sellüloz asetat, steril; por çapı 0.65 µm, 47mm çaplı
- Vorteks

2.4. Kalite kontrol

- Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır. Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir. Antimikrobiyaller zaman içinde yıkılabilir. Bu nedenle, antibiyotik içeren besiyerlerinin etkinliği de zamanla azalabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarında standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.

- (a) Sterilite kontrolü için; yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
- (b) Üreme ve seçici özellik kontrolü için kullanılacak organizmalar ve beklenen kalite kontrol sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir (ayrıca örnek uygulama için bkz. "UMS, B-MT-06 Lejyoner hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı, Ek-2").
- Kitler kullanılırken kontrol serumları/örnekleri de kitte verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
 - Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır (mikroskop kalibrasyonu için bkz. UMS, P-TP-01).
 - Bütün kalite kontrol sonuçları, kullanılan kitin/besiyerinin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.

Tablo 2. Kalite kontrol suşları ve besiyeri kalite kontrolünde beklenen sonuçlar (20)

Organizma (ATCC)*	Beklenen sonuçlar**
<i>Campylobacter jejuni</i> (33291 veya 33560)	Üreme
<i>Escherichia coli</i> (25922)	İnhibisyon
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	Kısmi veya tam inhibisyon
<i>Candida albicans</i> (10231)	Kısmi veya tam inhibisyon
<i>Proteus mirabilis</i> (12453)	Üreme veya kısmi inhibisyon

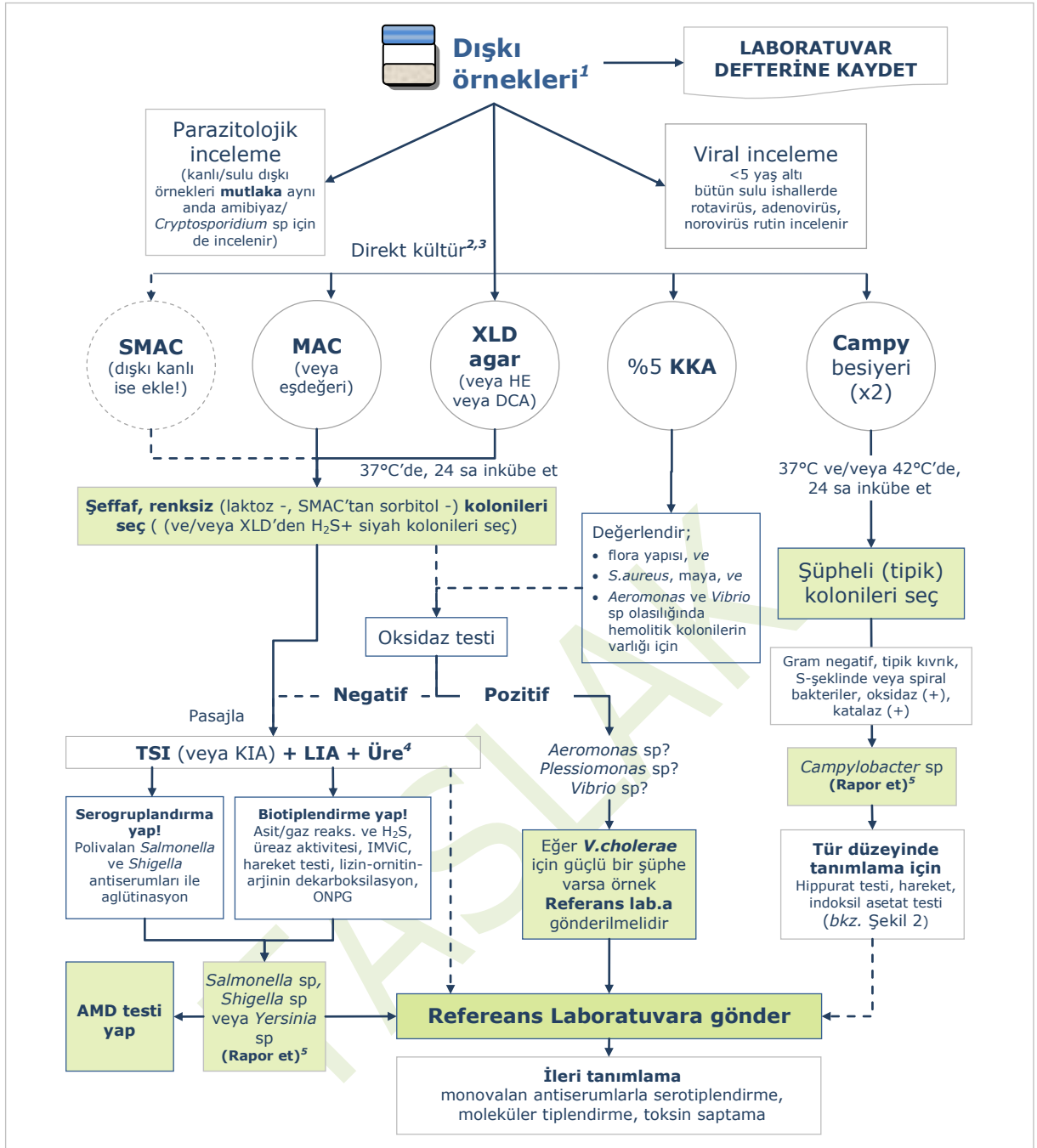
* yerine bu organizmaların tam tanımlanmış laboratuvar izolatları da kullanılabilir.

** besiyerine göre değişebilir.

3 *Campylobacter* spp tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı için akış şeması

- Akut gastroenterit yakınması ile başvuran hastaların dışkı örneklerinin incelenmesinde *Campylobacter* spp varlığının araştırılması rutin tanının bir parçası kabul edilmektedir. Bu nedenle ishal yakınması ile gelen sulu ve/veya kanlı ve/veya mukuslu bütün dışkı örnekleri olası bütün patojenler bakımından uygun bir şema ile -olası paraziter etkenler (*Cryptosporidium* spp, amibiyaz, rotavirüs, norovirüs vb.) de göz önüne alınarak- incelemeye alınmalıdır. Dışkının incelenmesinde genel yaklaşım şeması Şekil 1'de verilmiştir.
- İdeal olan her akut ishal vakasında dışkı örneklerinin *Campylobacter* spp varlığı yönünden araştırılmasıdır (12,13,15). Bu amaçla örnekler hem diğer enterik patojenlerin izolasyonunda kullanılan besiyerlerine hem de seçici *Campylobacter* besiyerlerine ekilmelidir.
- *Campylobacter* spp için kültürün yanı sıra dışkının Gram boyalı yaymalarının incelenmesi de tanıda yardımcıdır.



Şekil 1. Akut gastroenteritte etken tanısı için akış şeması.

MAC, MacConkey agar; SMAC, Sorbitol MacConkey agar; KKA, Koyun kanlı agar; XLD, Xylose lysine desoxycholate agar; DCA, Desoxycholate citrate agar; HE, Hectoen-Enteric agar; Campy, *Campylobacter* sp besiyeri; Lab., laboratuvar; sa, saat; IMViC, indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat testleri; AMD, Antimikrobiyal duyarlılık; KIA, Kligler Iron Agar; TSI, Triple Sugar Iron Agar; LIA, Lysine Iron Agar

¹ Rutin dışkı kültüründe *Salmonella* sp, *Shigella* sp ve *Campylobacter* sp **mutlaka** araştırılması gereken ajanlardır. EHEC tüm kanlı ishallerde dışkı ve HUS hastalarında araştırılmalı, kültür plakları setine SMAC eklenmelidir. EHEC laboratuvarın bulunduğu bölgedeki insidense göre ilaveten çocuk hastalarda, özellikle yaz aylarında araştırılabilir. *Yersinia* sp, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp, *Clostridium difficile* gibi patojenler hastanın kliniğine ve klinisyenin talebine göre çalışılabilir. Ancak yukarıdaki şemada kullanılan besiyerleri seti ile *Yersinia*, *V. cholerae*, *Aeromonas* izole etmek mümkündür ve özel olarak istenmemiş olsa da bu etkenlerden biri izole edildiğinde mutlaka tam tanımlama gerçekleştirilmeli, gerekiyorsa bunun için izolat Referans laboratuvara gönderilmelidir. Ayrıca dışkı örneklerinin farklı durumlarda inceleme kapsamı için bkz. "UMS, SY-01 Akut Gastroenteritte Sendromik Yaklaşım"

² Taşıyıcı/temaslı taramasında dışkıdan önce GN buyyona ekim yapılır; 4-6 sa inkübasyondan sonra besiyerlerine pasajlanır.

³ *Vibrio cholerae* şüphesinde burada verilen besiyeri setine TCBS besiyeri de eklenmelidir.

⁴ "TSI (KIA)+LIA+Üre" test paketi primer tanımlama için seçilebilecek en küçük biyokimyasal test setini oluşturur. Alternatif olarak "TSI (KIA)+IMViC+üre+lizin" kullanılabilir. Sonuç raporu tam bir biyotiplendirmeye **ve** en azından polivalan antiserumlarla yapılmış bir serotiplendirmeye dayanmalıdır.

⁵ Bütün bu etkenler (*Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Yersinia* sp, EHEC, *Campylobacter* sp) **laboratuvardan bildirimi zorunlu** etkenlerdir. İlgili birime hemen bildirim yapılmalıdır.

3.2. Mikroskopik inceleme

- Laboratuvara gelen taze dışkı örneğinden metilen mavisi boyalı preparat yapıldıktan sonra örneğin lökosit içerip içermediği araştırılır. Lökosit varlığı invaziv enfeksiyona işaret etmesi bakımından değerlidir. Ancak lökosit bulunmaması enfeksiyon olasılığını dışlamaz.
- Dışkı örneğinden hazırlanan yaymalar *Campylobacter* spp varlığını (tipik morfolojisini) değerlendirmek amacıyla Gram boya ile boyanarak incelenebilir. Bunun için zıt boya olarak karbol fuksin veya bazik fuksin kullanılması gerektiği hatırlanmalıdır (bkz. UMS, B-TP-03).
- Etken mikroorganizma, incelemede martı kanadı şeklinde kıvrık basiller olarak görülür. Testin %66-94 duyarlılık ve %95'in üzerinde özgüllüğü vardır. *Campylobacter* ön tanısı için hayli yararlı olduğu kabul edilmekle birlikte işlem yükü fazla laboratuvarlarda dışkı örneklerine rutin Gram boyama önerilememektedir (15).

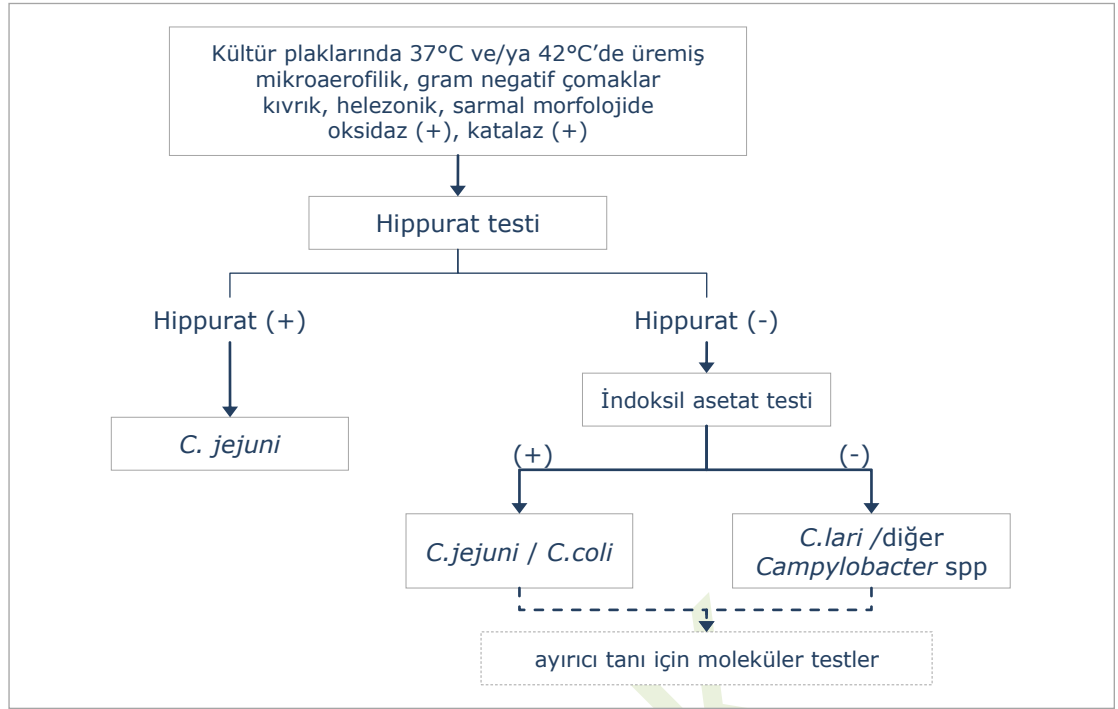
3.3. Kültür

Dışkının kültür plaklarına ekimi

- Bir öze dolusu dışkı ya da transport besiyerinden alınan örnek; seçici besiyerine (CCDA veya diğer seçici besiyerlerinden birisine) ekilir.
NOT: İki tip seçici besiyeri plağının birlikte kullanılması izolasyon şansını yükseltmektedir.
- Tek koloni ekimi yapılması esastır.
- Plaklar mikroaerofilik atmosfer koşullarında 72 saate kadar inkübe edilirler. Termotoleran *Campylobacter* türleri için 42°C'de, *C. jejuni* ve *C.coli* dışındaki türlerin izolasyonu için ayrıca 35-37°C'de inkübasyon önerilir.
NOT: Maliyet gerekçesiyle her iki inkübasyon sıcaklığı aynı anda kullanılamıyorsa laboratuvar kendi şartlarına uygun olanını seçmelidir.
- Kan kültürleri 37°C'de inkübe edilebilir.

Kültür plaklarından tanımlama

- Gri, yassı, düzensiz, 1-2 mm çapında, bazen mukoid görünümlü kolonilerden hemen Gram boyama yapılır.
- Gram boyalı preparatın mikroskopik incelemesinde spiral, martı kanadı, virgül şeklinde gram negatif basiller, eskimiş kültürlerden ya da uzun süre değişken atmosfer koşullarında kalmış plaklardan yapılan preparatlarda basil yerine gram negatif koklar şeklinde gözlenir.
- Oksidaz ve katalaz testleri yapılır; *Campylobacter* sp için her ikisi de pozitifdir. Eğer laboratuvar diğer tanımlama testlerini yapamayacak ise izolatu bu özellikleri ile "*Campylobacter* sp" olarak rapor edebilir.
- Kültürde *Campylobacter* türlerinden şüphe edildiği takdirde lateks aglütinasyon yöntemi ile tanımlanmasını sağlayan ticari lateks aglütinasyon testleri bulunmaktadır.



Şekil 2. *Campylobacter* tür ayrımı için akış şeması (6).

3.4. Tanıda diğer yöntemler

- Hızlı antijen saptama - Doğrudan dışkı örneklerinden EIA yöntemi hızlı antijen saptanmasına imkan veren ticari kitler vardır. Bu kitlerin kültüre göre duyarlılığı %89-96, özgüllüğü ise %97'den fazladır.
- Ticari olarak dışkıdan amplifikasyon yolu ile *Campylobacter* araştıran bir test mevcut olmamasına rağmen geleneksel laboratuvar yapımı testlerle çalışmalar mevcuttur. Ancak rutinde kullanılmaları henüz önerilmemektedir.

3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

- İzole edilen *Campylobacter* suşları; ileri tanımlama, moleküler epidemiyolojik analiz ve antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları için Ulusal Referans Laboratuvara gönderilir.
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler. Dolayısı ile kısa ve uzun dönem saklama yöntemlerine ihtiyaç duyulur.

Kısa süreli saklama

- *Campylobacter* izolatlarının bir hafta gibi kısa bir süre ile korunması bilhassa izolatların Referans laboratuvara gönderilmesi süresince korunması sağlamak bakımından kullanışlıdır.
- Bu amaçla CCDA veya benzeri besiyerinde izolatın yoğun saf kültürü hazırlanır. Plak yüzeyinden steril öze/eküvyonla toplanan yoğun inokulum kömürlü Amies taşıma besiyerine daldırılarak +4°C'de, 1 haftaya kadar Referans laboratuvara gönderilebilir.

Uzun süreli saklama

- Uzun süreli saklama için *Campylobacter* izolatlarının steril 'skim-milk' ya da gliserol içeren sıvı besiyeri içinde yoğun süspansiyonu da yapılabilir.
- Bunun için izolatın CCDA veya benzeri besiyeri plaklarında yoğun pasajı hazırlanır ve 42°C'de 48 saat inkübe edilir (yöntem uygulamasının diğer detayları için bkz. UMS, B-TP-01).
- Yoğun *Campylobacter* süspansiyonu -80°C derin dondurucuda veya daha düşük sıcaklıkta (likit nitrojen tankında, -120°C) yıllarca saklanabilir.
- Bir -20°C dondurucu da kullanılabilir; ancak canlılık kaybı hızlıdır ve birkaç hafta ya da aylık saklamalar için elverişli olabilir.
- Bazı laboratuvarlar izolatlarını liyofilize ederek saklayabilmektedirler. Liyofilizasyon için ise 'skim milk', serum temelli bir besiyeri veya polivinil-pirolidon kullanılır.

Referans merkeze gönderme

- Ülkemizde yürürlükte olan bildirim sistemine göre *Campylobacter* sp **laboratuvar**dan bildirim zorunlu etkindir. İlgili düzenlemelere göre "kesin tanı" almış sonuçlar bildirim esastır ve kesin tanı da izolatın tür düzeyinde tanımlanmasını gerektirmektedir (2,3).
- Bu nedenle koloni morfolojisi, üreme ve temel biyokimyasal özellikleri ile *Campylobacter* sp olarak tanımlanmış suşların tür düzeyinde tanımlanması için böyle izolatlar THSK Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarına gönderilmelidir.
- İzolatlarını tür düzeyinde tanımlayabilen laboratuvarların da diğer tiplendirmeler ya da epidemiyolojik incelemeler için bu izolatları Referans laboratuvara göndermesi gerekmektedir (bkz. ilgili Sağlık Bakanlığı Yönergesi) (3,21).
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (22) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi). İzolatların beraberinde, mutlaka bu izolatlara ait bilgileri içeren bilgi formu da doldurularak paketin içine yerleştirilmelidir. Paket gönderilmeden önce laboratuvar telefon veya e-posta ile bilgilendirilmelidir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- **Dışkının** zıt boya karbol fuksin kullanılarak boyanması ile; martı kanadı şeklinde, kıvrık, gram negatif basiller mevcut ise hekime ön rapor olarak "**olası** *Campylobacter* sp" gözlendiği bildirilmelidir.
- Seçici besiyerlerinde 42°C'de, mikroaerofilik koşullarda üreyen tipik kolonilerden mikroskopik incelemede karakteristik Gram morfolojisinde organizmalar ayırt edilmiş ise sonuç raporu "*Campylobacter* sp üredi" şeklinde verilmelidir.

ÖNEMLİ NOT: Eğer laboratuvar tür düzeyinde tanımlama yapamayacak ise bu raporda "Kesin tanısı ve antimikrobiyal duyarlılık testi Referans Merkez'de yapılacaktır" ifadesi yer almalıdır ve izolat Referans laboratuvara gönderilmelidir.

- Laboratuvar tür düzeyinde tanımlama yapabiliyorsa (bkz. Şekil 2) tanımlama sonucuna göre izolat cins ve tür adı açık yazılarak, ör., "*Campylobacter jejuni* üredi" şeklinde raporlanmalıdır.

NOT 1: Ayrıca ilgili birimlere "kesin tanı" olarak bildirim yapılmalıdır.

NOT 2: Bu izolatlar da Referans laboratuvara gönderilmelidir (bkz. ilgili Sağlık Bakanlığı Yönergesi) (3,21).

NOT 3: Eğer laboratuvar yapabiliyorsa bu izolatlar gerekli durumlarda antimikrobiyal duyarlılık testlerini uygulayabilmesi için göz önünde tutulacak hususlar şunlardır (5):

- (a) CLSI prosedürlerinde agar dilüsyon yöntemi dışında standardize edilmiş bir duyarlılık yöntemi bulunmamaktadır.
- (b) Antimikrobiyal duyarlılık testleri, EUCAST önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile yapılır (bkz. Ek-2)
- *Campylobacter* spp ülkemizde bildirimi zorunlu etkenler arasındadır. Bildirim listesinde Grup D etkenleri içinde yer alır ve bildirimi doğrudan laboratuvarlar tarafından yapılır (3,21).
 - (a) Tür düzeyinde tanısı konmuş ("kesin tanı") bütün vakaların, en kısa sürede bildirimleri toplayan ilgili birime ilgili Rehberdeki prosedür izlenerek bildirimi yapılmalıdır.
 - (b) Tanı sadece "*Campylobacter* sp" şeklinde konmuş ise tür tanısı için Referans laboratuvardan sonuç beklenirken bu izolasyon ilgili birime de haber verilmelidir.
- Her iki durumda da akılda tutulması gereken husus, vakanın bir salgınla ilişkili olabileceğidir. Bu nedenle her zaman sonuçlar ilgili sağlık otoriteleri ile mümkün olan en kısa süre içinde paylaşılmalıdır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Mikrobiyolojik tanıda kültür altın standarttır. Ancak kültürde üreme saptanmaması *Campylobacter* spp tanısını dışlamaz. Bu nedenle kültürden izolasyon olasılığını arttırmak için uygun zamanda, doğru örneğin alınması ve uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir. Bazı durumlarda erken dönemde ikinci bir örneğin incelenmesi tanı şansını yükseltebilir (15).
- Antibiyotik tedavisi başladıktan sonra alınan örneklerin kültüründe izolasyon şansı çok düşüktür.
- Koloni görünümü *Campylobacter*'e benzeyen, ancak oksidaz testi negatif sonuç veren suşlar kanlı agara pasajlanarak, 24 saatlik inkübasyon sonrasında yeniden oksidaz testi değerlendirilmelidir.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 565 5507

Görev çerçevesi

Klinik örneklerden *Campylobacter* spp için tanı, doğrulama, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin ve moleküler tiplendirmelerin yapılması; dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması ve "Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA)" kapsamında enterik bakterilerin laboratuvara dayalı sürveyans çalışmalarını yürütmek.

UEPLA, bildiri zorunlu hastalıkların sürveyansı sistemine laboratuvarların etkin katılımını sağlamak amacıyla oluşturulan bir 'laboratuvara dayalı sürveyans ağı'dır. 2007 yılında kurulan bu ağ kapsamında *Salmonella*, *Shigella*, Enterohemorajik *E. coli* ve *Campylobacter* türleri incelenmekte olup, zaman içinde etken yelpazesinin genişletilmesi ve katılımcı laboratuvar sayısının artırılması ile ülkemizdeki enfeksiyon eğilimleri ve suş dağılımları hakkında bilgi edinilmesi ve bu verilerin halk sağlığının korunmasına yönelik kullanılması hedeflenmektedir.

UEPLA kapsamında 2007-2011 yılları arasında katılımcı laboratuvarlardan en sık *Salmonella* izole edilerek gönderilmiş olup, bunu *Shigella* ve *Campylobacter* izolatları izlemiştir. *Salmonella* serotipleri sıklık sırasına göre *S. Enteritidis* (%65.7), *S. Typhimurium* (%6.1) ve *S. Paratyphi B* (%5.7) olarak sıralanmıştır. *Shigella* izolatları ise *Shigella sonnei* (%68.3), *S. flexneri* (%26.1), *S. boydii* (%3.1) ve *S. dysenteriae* (%1.6) olarak serogruplandırılmıştır. En sık saptanan *Campylobacter* türleri *C.jejuni* (%69.3) ve *C. coli* (%28.1) olarak belirlenmiştir (23).

Ekler

Ek-1 Modifiye Cary-Blair Transport besiyeri^{13,20}

Maddeler

Sodyum tiyoglukolat	1.5 g
Disodyum fosfat	1.1 g
Sodyum klorid	5.0 g
Fenol red	0.003 g
Agar	1.6 g
Distile/deiyonize su	991 mL

Hazırlanması

- 1 Bütün maddeler suda karıştırılır. Manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak eritilir.
- 2 50°C'ye soğutulur 9 mL %1'lik CaCl₂ eklenir.
- 3 pH 8.4'e ayarlanarak 15 dk içinde steril, vida kapaklı tüplere aktarılır.
- 4 Bütün tüpler etiketlenir ve +4°C'de saklanır; 1 yıl raf ömrü vardır.

Kalite kontrol

Hazırlanan Modifiye Cary-Blair tüplerinin taşıma sırasında incelenecek bakterilerin canlılığını istenen düzeyde koruyup korumayacağı bakımından **kontrol** edilmesi gerekmektedir (13). Bunun için;

- 1 Standart suşlar *C. jejuni* ATCC 33291, *S. flexneri* ATCC 12022, ve *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 veya bu bakterilerin iyi tanımlanmış laboratuvar izolatları kullanılır.
- 2 Her üç bakteriden de birer öze dolusu inokulum yeni hazırlanmış Modifiye Cary-Blair tüplerine inoküle edilir.
- 3 Tüpler 1 gece 35°C'de inkübe edilir.
- 4 İnkübasyon sonrasında tüplerden her bakteri kendisi için uygun besiyerlerine pasaj yapılır.
- 5 Pasajlanan plaklar 1-2 gece 35°C'de inkübe edilir.
- 6 Üreme olması beklenir. Üreme görülmeyen besiyeri serisi atılmalıdır.
- 7 Bütün kalite kontrol sonuçları, besiyerinin lot numarası ve hazırlanma tarihi bilgileri de dahil olmak üzere düzenli olarak kaydedilir.

Ek-2 EUCAST Disk Difüzyon

Antimikrobiyal ▪ Tablo 4’de listelenmiştir.

Besiyeri

- MH-F: Mueller-Hinton agara %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β -NAD eklenerek hazırlanmış.
- NOT: MH-F plakları bakterinin yayılmasını azaltmak için inokülasyon öncesinde kurutulmalıdır. Bunun için 20-25°C’de gece boyunca veya 35°C’de plağın kapağını aralayarak, 15 dk)
- Besiyerinin hazırlanışı için bkz. “UMS, AMD-TP-01-AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması”.

İnokulum ▪ McFarland 0.5 bulanıklık standardına göre

İnkübasyon ▪ Mikroaerofilik ortamda, 41±1°C’de, 24 sa. Süre sonunda yetersiz üreme gösteren kökenler tekrar inkübe edilirler.

Değerlendirme

- İnhibisyon zonu sınırı, yansıyan ışıkla aydınlatılmış ve kapağı açık plağa ön yüzünden bakıldığında, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilir.
- Değerlendirme Tablo 3’de verilen değerlere göre yapılır.

Kalite kontrol suşu ▪ *Campylobacter jejuni* ATCC 33560

Tablo 3. *Campylobacter jejuni* ve *coli* için EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Florokinolonlar					
Siprofloksasin	0.5	0.5	5	26	26
Makrolidler					
Azitromisin	-	-		-	-
Klaritromisin	-	-		-	-
Eritromisin, <i>C. jejuni</i>	4	4	15	20	20
Eritromisin, <i>C. coli</i>	8	8	15	24	24
Tetrasiklinler					
Doksisiklin	-	-		-	-
Tetrasiklin	2	2	30	30	30

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (*Campylobacter jejuni/coli* Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, SY-01	Akut gastroenteritte sendromik yaklaşım
UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-04	Hareket testi
UMS, B-TP-05	Hippurat hidrolizi
UMS, B-TP-07	İndoksil asetat testi
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler'in) boyama
UMS, B-TP-15	Nitrat / Nitrit redüksiyonu testleri
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi (EUCAST)
UMS, B-MT-01	Boğmacanın Mikrobiyolojik Tanısı, Ek-2 (antibiyotik suplement hazırlama için örnek prosedür)
UMS, B-MT-06	Lejyoner hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı Ek-2 (besiyeri kalite kontrolü için örnek prosedür)
UMS, B-MT-08	<i>Salmonella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-09	<i>Shigella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Franco DA, Williams CE. *Campylobacter jejuni*. In: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR (Eds). *Foodborne Disease Handbook*, Volume 1: Bacterial Pathogens. 2nd Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 2001, p. 83-99
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 4 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 5 Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2nd ed., WHO, Geneva, Switzerland. 2003.

- 6 Kizirgil A, Karakoç S. Çocukluk yaş grubu akut gastroenteritlerinde etiyolojik ajanların belirlenmesi. *Nobel Med* 2012;8(3):60-65
- 7 Özkan A. Çocukluk çağı akut gastroenterit olgularında etiyolojik ajanların belirlenmesi. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana. 2005. <http://library.cu.edu.tr/tezler/5425.pdf> (son erişim tarihi: 24.03.2014)
- 8 Kanan B, Akşit F. Akut gastroenteritli olgularda *Campylobacter* sıklığının araştırılması. *İnfek Derg* 2003;17(1):11-14.
- 9 Yazıcı V, Gültekin B, Aydın N, Aral YZ, Aydoğdu A, Karaoğlu AÖ. Akut gastroenteritli olguların dışkı örneklerinde bazı bakteri ve virüslerin araştırılması. *ANKEM Derg* 2009;23(2):59-65
- 10 Zarakolu P, Akbaş E, Levent B ve ark. İshalli çocuk hastalardan izole edilen bakteriyel patojenlerin dağılımı. *Flora* 1999;4:190-4.
- 11 Jerris RC, Fields PI, Nicholson MA. Fecal culture for *Campylobacter* and related organisms. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.8.2.1 – 3.8.2.16.
- 12 UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Campylobacter* species. Bacteriology – Identification, ID 23, Issue no: 2.1, Issue date: 21.10.11. <http://www.hpa.org.uk/SMI> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 13 York MK, Rodrigues-Wong P. Fecal culture for aerobic pathogens of gastroenteritis. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.8.1.1 – 3.8.1.21
- 14 Darka Ö, Yılmaz YÖ. Tavuk eti ve campylobacteriosis. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35:100-102
- 15 Fitzgerald C and Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter* In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C 2011, p. 885-899
- 16 Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, 2008.
- 17 Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberleri: Steril Vücut Sıvıları Örnekleri. KLİMUD, Ankara, 2013.
- 18 European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2013. <http://www.eucast.org> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 19 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 20 Jenkins SG, Sewell DL. Quality Control. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 14.2.1 - 14.2.34
- 21 S.B. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 24.02.2004/1534 tarih-sayılı Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Yönergesi. 2004.
- 22 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 23 Levent B, Güleşen R, Kalaycıoğlu H, Sezen F, Gözalan A, on behalf of UEPLA participants. National Enteric Pathogens Laboratory-based Surveillance Network (UEPLA) in Turkey, July 2007-June 2011. 22nd ECCMID, 31 Mar-3 Apr 2012, Londra, UK. 2012, p. 698.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Koleranın (*Vibrio cholerae* enfeksiyonu) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-12
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikler.....	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizmalar	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Kolera tanısı için akış diyagramı	8
4 Kültür	10
5 Diğer yöntemler	15
6 Saklama, Referans merkeze gönderme	16
7 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	16
8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	17
9 Referans Laboratuvar	17
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	18
KAYNAKLAR.....	18

Kapsam ve Amaç

Kolera *Vibrio cholerae*'nin neden olduğu, başlıca kontamine sularla yayılan akut ishalleri bir hastalıktır. Kolayca önlenir. Öte yandan tedavisiz olgularda hayatı tehdit edicidir. Ülkemizde son yıllar boyunca görülmemektedir. Buna karşın başta Afrika, Güneydoğu Asya ve Haiti'de olmak üzere dünyanın çeşitli bölgelerinde görülmeye devam etmektedir ve özellikle 2005 yılından bu yana giderek küresel bir artış eğiliminde olduğu belirtilmektedir (1). Dünya genelinde her yıl 3-5 milyon vaka ve 100.000'den fazla ölüm olduğu tahmin edilmektedir.

Kolera ülkemizde bildirimi zorunlu bir hastalıktır (2,3). Salgın dönemlerinde, salgın tanısı konduktan sonra vakalara klinik bulgular temelinde tanı konabilirse de özellikle salgın dışı dönemlerde (olası sporadik vakalar; örneğin, seyahat ilişkili vb.) kolera tanısı mikrobiyolojik incelemeye dayanır. Ülkemizde salgınların daha sıkça görüldüğü yıllarda klinik mikrobiyoloji laboratuvarları kolera tanısında ciddi tecrübe kazanmışlardır. Genel olarak enterik patojenleri tanımlayabilen laboratuvarların *V. cholerae*'nin izolasyonuna ve tanımlanmasına yatkın oldukları da ileri sürülebilir. Bununla birlikte uzunca bir aradan sonra ortaya çıkabilecek bir tek vaka veya bir salgının başlangıcında 'ilk vaka' tanısını koymak laboratuvara önemli sorumluluk yüklemektedir ve belirli bir "hazırlıklılık" yaklaşımını gerektirmektedir.

Bu UMS belgesi, kolera tanısı için geçerli yöntemlere dair prosedürleri kapsamaktadır. Belgenin amacı ise olası bir vakanın tanısında izlenecek adımlar, yöntemlerin seçimi ve sorumluluklar hakkında bilgi vermektedir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

AMD	Antimikrobiyal duyarlılık (testi)
APS	Alkali peptonlu su
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Peterson testi
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
HIA	Kalp infüzyon agar
IMVIC	İndol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, Sitrat (test seti)
KIA	Kligler Iron Agar
MHA	Mueller-Hinton Agar
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
RPLA	'Reverse passive' lateks aglütinasyon
TCBS	Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar
TSI	Triple Sugar Iron (agar)
TSB	Triptik soya besiyeri

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Vibrio cholerae epidemik ve pandemik koleranın etkenidir. Kolera *V. cholerae*'nin toksijenik O1 ve O139 serogrupları tarafından oluşturulan; belirtisiz bir enfeksiyondan ağır diyare, kusma, ileri derecede sıvı kaybı ile şok ve ölüme kadar değişen klinik tablolar gösterebilen bir enfeksiyondur. O1 serogrubu Klasik ve El-Tor olmak üzere iki biyotipe ayrılmaktadır (4,5,6).

Dünyada bugüne kadar sekiz pandemi meydana gelmiştir ve son ikisi halen devam etmektedir. İlk altı pandemide etken *V. cholerae* O1'in klasik biyotipidir. Yedinci pandemi Endonezyalı bir hacıdan Mısır'ın El-Tor kasabasında izole edilmiş ve adını da buradan almıştır. Son yıllara kadar O1 serogruplarının epidemik koleraya neden olan tek tip olduğu bilinmekteydi. O139'a bağlı ilk salgın 1992 yılında Madras'tan (Hindistan) başlayarak yayılmış ve klinik olarak O1'den ayırt edilmeyen epidemik kolera vakaları görülmeye başlamıştır. Etkilenen grup başlıca erişkinler olup El-Tor'a göre daha hızlı seyretmiştir ve sekizinci pandeminin etkeni olarak belirtilmiştir (7,8,9). Koleranın küresel yayılımını etkileyen faktörler tam olarak bilinmemektedir, bu yüzden yeni bir salgının nerede ve ne zaman çıkacağını tahmin etmek olanaksızdır.

Mikroorganizmanın özellikleri

Vibrionaceae ailesinde yer alan *Vibrio* cinsi içinde en az 34 tür tanımlanmıştır. Bunlardan sadece 12'si insanlar için patojen olup diğerleri çevresel izolatlardır ve deniz *Vibrio*'ları olarak adlandırılır (7,9,10).

V. cholerae aerob, fermentatif, oksidaz pozitif, polar flajellaları ile oldukça hareketli, gram negatif, kıvrık, virgüle benzeyen basillerdir. Hücre duvarının O somatik antijen yapısındaki farklılıklara göre 150'nin üstünde farklı serogruba ayrılırlar. Sadece toksijenik serogrup O1 ve O139 epidemik koleraya neden olur. Diğer serogruplar (nontoksijenik O1/O139 serogrupları) genellikle sporadik özellikteki ishal olgularından sorumludur, koleraya neden olmazlar (7,9).

V. cholerae O1 serogrubu Inaba, Ogawa ve Hikojima olmak üzere üç serotipe ayrılmaktadır. O139'da serotip bulunmamaktadır (4,5,6).

V. cholerae'nin doğal ortamı sulardır. Bakteri sularda algilere, su kabuklularına, zooplanktonlara yapışarak yaşamaktadır (5,7,8).

V. cholerae'nin dış etkilere karşı direnci azdır. 55°C'de 10-15 dakikada, 100°C'de ise 1-2 dakikada ölür. Kuruluğa, güneş ışığına, asitlere duyarlıdır. Mide asiditesi, vibrioları kısa sürede inaktive eder ve bu durum birçok bireyi koleraya yakalanmaktan kurtarır. Çeşitli eşya ve besinler üzerinde birkaç saat ile birkaç gün arasında canlı kalabilirler (6)

Enfeksiyonun tek kaynağı insandır. Yayılım fekal-oral yol ile olmaktadır. Kaynak hemen her zaman insan fekal atıkları ile kontamine olmuş sulardır. Kontamine sularla bulaşmış gıdalar da (sebzeler, yeşillikler vb) kaynak olabilir. Güvenli kanalizasyon sisteminin olmadığı yerleşimlerde içme sularının enfekte bireylerin dışkıları ile kirlenmesi sonucu hastalık hızla yayılabilir (1,4,5,6).

Şiddetli vakalardan ziyade asemptomatik kişiler hastalığın yayılımında daha önemlidirler. Böyle vakalar, epidemiler arasındaki dönemde etkenin canlılığını sürdürme işlevi görürler. Pratik olarak hastalığın kişiden kişiye doğrudan bulaşmadığı kabul edilir. Enfektif dozu 10^{11} organizmadır (1,4,5,6).

Klinik özellikler

V. cholerae'ye bağlı enfeksiyonlar ılımlı bir tablodan ciddi ölümcül hastalığa kadar geniş bir yelpazede görülebilir. Enfeksiyon sıklıkla kendini sınırlayan bir akut gastroenterit tablosu şeklinde görülür veya asemptomatiktir. Ancak yaklaşık 20 vakada bir (%5) enfekte bireylerde şiddetli ishal, kusma ve bacaklarda kramplarla ağır hastalık tablosu gelişmektedir.

Koleranın inkübasyon periyodu çok kısadır, 2 saat ile 5 gün arasında değişir. Bu durum vaka sayısının hızlı bir şekilde artışı ve salgınlar için yüksek potansiyel demektir. Oral yolla vücuda giren *V. cholerae* ince bağırsaklarda kolonize olur. Patogeneze esas olarak oluşturduğu kolera toksini (enterotoksin) sorumludur. Koleranın kliniği hafiften ağıra doğru şu şekilde sıralanabilir (5,6,8):

Asemptomatik enfeksiyon, klinik bulgular oluşmadan dışkıda bakterinin bulunduğu durumdur. **Kolera diyaresinde** hastalar ayaktadır ve 2-3 gün içinde iyileşirler. Kusma, ishal ve bulantı kaybolur. Ancak bir süre sonra şikayetler tekrar ortaya çıkar. Bu tip hastalar koleranın yayılmasında önemli olduklarından tanılarının konup tedavilerinin yapılması gerekmektedir. **Hafif kolera** şekli (kolerin) kolera gravisin hafif seyirli şeklidir.

Kolera gravis esas kolera olarak da bilinir. Kolera toksini sekretuar hücrelerde adenilat siklaz enzimini aktive eder bunun sonucunda c-AMP artar ve ince bağırsak lümenine sıvı ve elektrolit kaybı olur. Villöz hücrelerden sodyum ve klor absorpsiyonu bozulur. Sonuçta elektrolit konsantrasyonu plazmaya eşit olan sulu ishal ortaya çıkar. Toksin duodenum ve proksimal jejunumda etkilidir. Sodyum, klor ve bikarbonat kaybı meydana gelir. Piring suyu görünümünde tipik ishal ortaya çıkar. Hastanın kan basıncı hızla düşer, nabız yüzeysel ve hafiftir. Gözler içeriye çöker, cilt buruşur, eller çamaşırcı eline benzer. Hastada ani kilo kaybı olur. Karın kayık gibi içeriye çöker. İdrar çıkışı giderek kaybolur. Hastanın mental fonksiyonları yerindedir.

Kolera sikka koleranın en ağır şeklidir. Hızlı başlar, ishal oluşmadan kollaps, şok ve ölüm gelişir. **Tifoid kolera** tifo ile karışabilen klinik durumdur.

Laboratuvar tanısı

Tanı, özellikle salgın dışı zamanlarda laboratuvar incelemesinde dayanır. Etkenin kültürden izolasyonu ve tanımlanması tanıda 'altın standart'tır. *V. cholerae* kültürü en kolay olan bakterilerden biridir. Primer kültür besiyerleri olarak koyun kanlı agar ve TCBS agar (veya eşdeğeri bir besiyeri) kullanılır (10,11).

Taze dışkı örneklerinin direkt mikroskopik incelemesine, özellikle salgınlarda hızlı bir ön tanı için başvurulabilir. Mikroskopta inceleme alanında çok hızla hareket eden, alanı hızla terk eden bakterilerin gözlenmesi ve O1 veya O139 antiserum ile hareketin immobilizasyonu ön tanı koymaya yardımcı olabilir (10).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Vibrio cholerae 01 ve O139

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Vibrio türleri risk grubu 2 mikroorganizmalardır ve bu organizmalarla ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalıdır. Aerosol oluşturma muhtemel tüm laboratuvar çalışmaları bir biyolojik güvenlik kabini içinde yapılmalıdır (BGD2 düzey, çalışma koşulları ve dikkat edilmesi gereken konular için bkz. Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi).

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen koleradan şüpheleniyorsa **kültür için** örnekleri laboratuvara göndermeden önce, laboratuvarın gerekli hazırlığı yapabilmesi için laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Koleranın tanısında örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli hususlara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Dışkı - Sulu ishali olan hastalardan örnekler özellikle hastalığın erken döneminde (tercihen ilk 24 saat) ve antibiyotik tedavisi başlanmadan alınmalıdır. Dışkı örneklerinin sürgülerden alınmaması gereklidir.
 - (a) Dışkı örnekleri 2 saat içinde incelenecekse 4°C'de saklanabilir.
 - (b) Kültür hemen yapılmayacak ya da uzak bir yere gönderilecekse (>6 saat) örnek taşıma besiyerine alınmalıdır. Taşıma besiyeri olarak modifiye Cary-Blair veya APS kullanılır. APS'ye konan dışkı örneği miktarı besiyeri volümünün %10'undan fazla olmamalıdır.

(c) Salgın vb. acil durumda uygun bir taşıma besiyeri mevcut değilse örnekler 3×5 cm'lik filtre kağıdı ya da gazlı beze emdirilerek naylon poşet içine yerleştirilir; nem için birkaç damla SF ilave edilerek ve poşetin sızdırmazlığı sağlanarak laboratuvara gönderilir.

- Rektal sürüntü – İşbirliği yapılamayan hastalarda ve bebeklerde tercih edilir. Aynı hastaya ait en az 2 sürüntü alınmalıdır. Rektal sürüntü alındıktan sonra eğer örneğin laboratuvara ulaşması 2 saatten uzun sürecek ise eküvyonlar Cary-Blair veya APS tüpüne konmalıdır.

ÖNEMLİ: Gliserol içeren besiyerleri taşıma için uygun değildir. Bazı gliserol ürünleri vibriolar üzerine toksik olabilir.

- Kusmuk - Geniş ağızlı, vida kapaklı plastik kaplara alınarak gönderilir.
- Su (ve gıda) örnekleri – Vaka ve salgın araştırması amacıyla kuşkulu su kaynaklarından ve gıdalardan örnekler Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından alınır ve gönderilir (detaylı bilgi için bkz. "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nin "Ekler" bölümü).

Besiyeri / Reaktif

- Zenginleştirme besiyerleri – APS kullanılır. Laboratuvarda hazırlanabilir.
- Temel besiyerleri – %5 Koyun kanlı agar, MAC, HIA.
- TCBS agar - *Vibrio*'ların kültürlerden izolasyonunda seçici besiyeridir. Piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvarda da hazırlanabilir.

NOT: Diğer enterik patojenlerin izole edilme olasılığı için seçici besiyerleri (SS, HE agar, XLD ya da DCA'dan en az biri) de kullanılır. Kolera kliniği tipik olmayan vakalarda ve/veya salgın-dışı dönemde sete *Campylobacter* seçici besiyeri plağı da eklenmelidir.

- Biyotiplendirme için besiyeri ve reaktifler – TSI/KIA, IMViC reaktifleri, üre, amino asit (lizin) dekarboksilaz test besiyerleri, hareket besiyeri, oksidaz reaktifi, PYR, ONPG, Gram boya ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri (bkz. sayfa 18 "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- %0.5'lik sodyum deoksikolat -
- Pteridin O129 diski (10 µg ve 150 µg'lık diskler)
- O1 ve O139 antiserumları, monovalan Inaba, Ogawa antiserumları
- Nutrient agar – suş taşımak için, tüpte yatık agar olarak hazırlanmış
- AMD testi için MHA ve antibiyotik disk ve stok solüsyonları

Diğer gereç, donanım

- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır! (12).

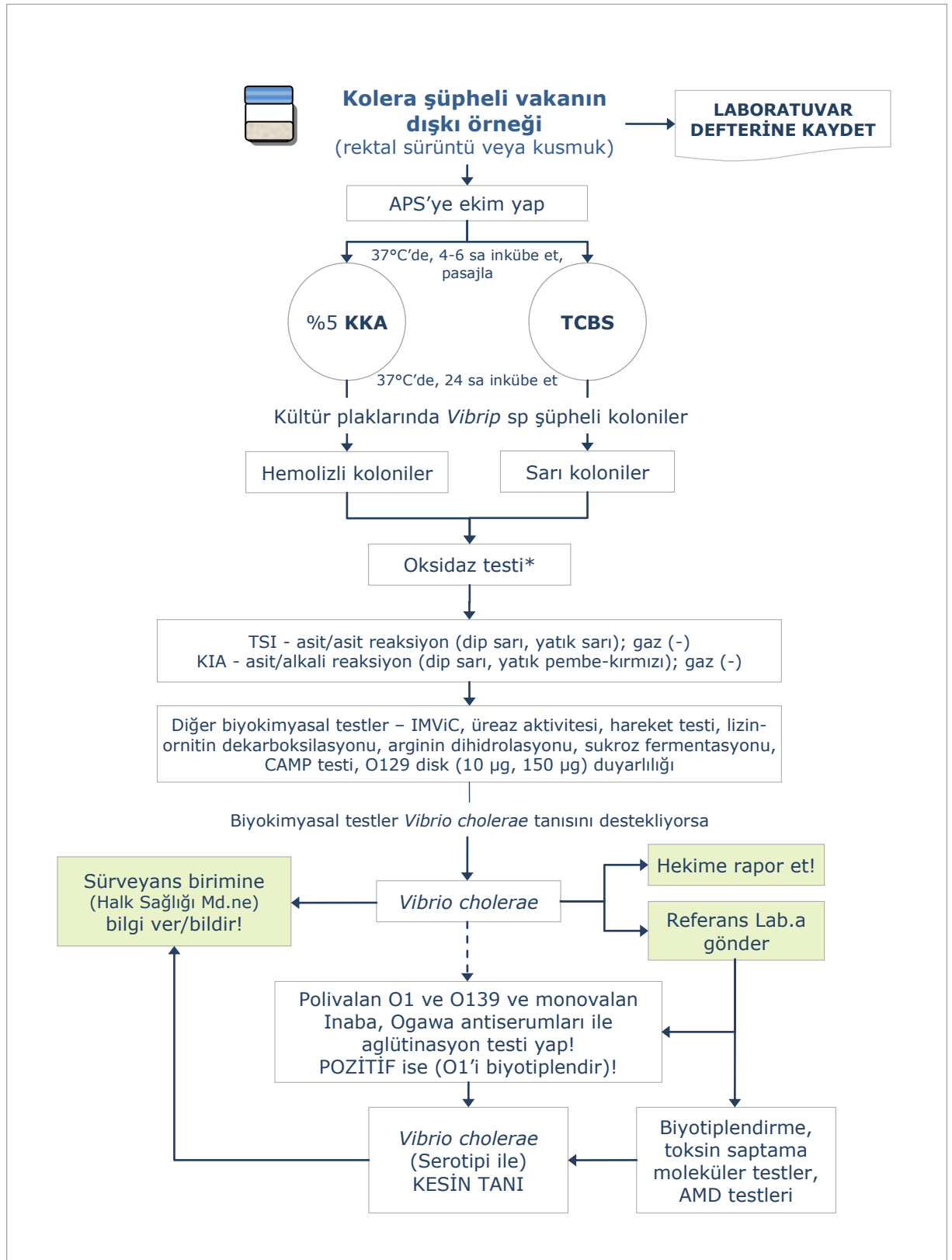
- Karanlık alan mikroskobu (opsiyonel)
- Biyogüvenlik kabini, sınıf-IIA, sertifikalı
- İnkübatör, 35-37°C
- McFarland 0.5 bulanıklık standardı

2.4. Kalite kontrol

- Besiyerlerini kullanmadan önce son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır. Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarda standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.
 - (a) Sterilite kontrolü için; yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
 - (b) TCBS besiyerinin üreme ve seçici özellik kontrolü için kontrol suşları besiyerine pasajlandıktan sonra 35°C'de bir gece inkübe edilir. Kullanılacak kontrol suşları ve beklenen kalite kontrol sonuçları aşağıdaki gibidir:
 - Vibrio alginolyticus* ATCC 17749 - Sarı koloni oluşturur
 - Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 - Yeşil koloni oluşturur
 - Escherichia coli* ATCC 25922 - Baskılanır (üremez)
- Aglütinasyon kitleri veya diğer tanımlama kitleri kullanılırken kontrol suşları da kitte verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır (mikroskop kalibrasyonu için bkz. UMS, P-TP-01).
- Bütün kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Kolera tanısı için akış diyagramı

- Koleranın laboratuvar incelemesi için başlıca iki durum vardır: birincisi salgın durumu, ikincisi de uzun zaman boyunca vakanın görülmediği salgın-dışı durum.
- *Salgın-dışı* durumda ise öncelikle vakanın klinik olarak akla gelmiş olması gerekir. Hekimin laboratuvara haber vermesini, laboratuvarın da hızla besiyeri vb. hazırlığı yapmasını gerektirir.
- *Salgın* durumunda tanı birçok nedenle nispeten kolaydır.
- *Salgın* durumunda diğer akut gastroenterit etkenleri de ayırıcı tanı açısından önemini koruyor olacağından laboratuvar *Vibrio* izolasyon besiyerlerini rutin dışkı inceleme setine ilave etmelidir. Örnek ayrıca parazitolojik yönden de mutlaka incelenmelidir; *Cryptosporidium* spp bazen kolerayı taklit edecek kadar bol sulu dışkılama ile karakterli enfeksiyon yapabilmektedir.
- Akut gastroenterit etkenlerinin rutin mikrobiyolojik incelemesi için akış diyagramı ilgili UMS belgelerinde (B-MT-08, 09 ve 10) verilmiştir. Burada kolera tanısı için bu sete ilave olarak kullanılacak TCBS pasajından itibaren *V. cholerae*'ye özel izolasyon ve tanımlama basamakları verilecektir. Akış diyagramı Şekil 1'de yer almaktadır.



Şekil 1. *V.cholerae*'nin klinik örneklerden izolasyonu, tanımlanması, raporlanması ve bildirimi için akış şeması.

* Oksidaz testi KKA'dan direkt yapılabilir ancak TCBS'den direkt yapılmamalıdır. TCBS'den Nutrient agara (veya inhibitör içermeyen bir genel üretim besiyerine) pasajlanmış koloniden oksidaz yapılır. KKA, Koyun kanlı agar; Lab., laboratuvar; sa, saat; AMD, antimikrobiyal duyarlılık testleri

3.1. Örneklerin direkt mikroskopik incelemesi

- Laboratuvara gelen taze dışkı örneğinden metilen mavisi boyalı preparat yapılabilir ve lökosit içerip içermediği araştırılır. Kolera vakalarında dışkıda eritrosit ve lökosit görülmez.
- Dışkının *V. cholerae* varlığı açısından rutin mikroskopisi önerilmez. Çünkü diğer bakterilerden ayırım yapılamaz. Direkt mikroskopide bakterinin hareketlerinin (sinek uçuşması gibi, hızla alanı terk eden, telaşlı) değerlendirilmesi deneyim isteyen bir iştir ve tipik olarak endemik bölgelerde veya salgında hızlı tanı gereken durumlarda saha şartlarında başvurulur. Geleneksel yöntemlerden biri mikroskopik immobilizasyon testidir ve inceleme sırasında preparata *V. cholerae* O1 antiserumu damlatılarak hareketin durduğunun görülmesine dayanır. Test O139 antiserumu ile de yapılabilir (10). Ön tanı koydurur. Salgın durumunda ilk vaka kesinlikle **kültürle** doğrulanmalıdır!
- Dışkının Gram boyamasında; gram negatif, virgül şeklinde kıvrık basiller izlenir. Özellikle salgın durumlarında, preparatta yoğun olarak görülmesi anlamlı olabilir.

4 Kültür

4.1. Örneklerden ön işlemler

- Etkenin kültürde üretilip gösterilmesi tanının konmasında altın standarttır.
- Primer kültür besiyerleri olarak %5 koyun kanlı agar ve TCBS agar (veya eşdeğer besiyeri, Monsur vb) kullanılır.
- Örneklerin primer besiyerlerine ekilmesinden önce zenginleştirme önerilir. Özellikle salgın-dışı durumlarda vakanın kolera **olmadığını** söyleyebilmek için yöntemin duyarlılığını olabildiğince artırıcı önlemler önem kazanmaktadır.
- Ön zenginleştirme amacıyla laboratuvara -taze dışkı olarak veya Cary-Blair taşıma besiyerinde- gelen örnekler hemen APS içeren tüplere inoküle edilir ve 35-37°C'de 6-8 saat inkübe edilir.
- İnkübasyonu takiben APS'den -özellikle yüzeyinden olacak şekilde- bir öze dolusu TCBS ve koyun kanlı agar besiyerine ekimler yapılmalıdır.
NOT 1: *V. cholerae* aerofil bir organizmadır. Yüksek oksijen ihtiyacı onu sıvı besiyerinde hemen yüzey bölgesinde üremeye zorlar. Pasajın yüzeyden yapılması izolasyon şansını yükseltir. Bu nedenle pasaj öncesi sıvı besiyerinin çalkalanmamasına özen gösterilmelidir!
- NOT 2: Eğer TCBS agara pasaj 6-8 saatten daha geç kalacaksa, yeni bir APS tüpüne -ikinci kez- ekim yapılarak 6-8 saat daha inkübe edilir ve ardından bu ikinci sıvı besiyerinden TCBS'e pasaj yapılır.
- Besiyerlerine yapılan ekimler 35-37°C'de, aerobik olarak 18-24 saat inkübe edilir.

4.2. Kültür plaklarının değerlendirilmesi

- İnkübasyon sonunda kanlı agarda 2-3 mm çapında nemli koloniler izlenir. Bazı suşlarda hemoliz görülebilir.
- Kültür setinde bulunan MacConkeyde ve seçici besiyeri olarak SS agar kullanıldığı durumda *V. cholerae* **laktoz negatif** reaksiyon nedeniyle renksiz/şeffaf koloniler şeklinde görülür.
- Eğer sette gram negatif enterik patojenler için HE, XLD gibi sukroz içeren besiyerleri bulunuyorsa, *V. cholerae* **sukroz pozitif** olduğundan dolayı bu besiyerlerinde floradaki sukroz pozitif diğer bakterilerden ayırt edilemez.
- TCBS besiyerinde 2-3 mm çapında sukroz fermentasyonuna bağlı sarı koloniler göze çarpar. Sukrozu fermente etmeyen bakteriler TCBS'de yeşil koloniler oluşturur.

NOT: TCBS kültürleri, inkübatörden çıkarıldıktan sonra hemen değerlendirilmelidir. Çünkü *V. cholerae* gibi, sarı koloni oluşturan kültürler oda sıcaklığına bırakıldığında renk yeşile dönüşebilir.

- TCBS besiyerinde diğer *Vibriolar* ve diğer bazı bakteriler de üreyebilir. Çeşitli *Vibrio* suşlarının tanımlanması, karşılaştırmaya dayanan görsel bir yöntemdir. Bu nedenle tanımlama testlerinin yapılması gereklidir.
- TCBS'te üreyen bakterinin türüne göre beklenen koloni morfolojileri aşağıda görülmektedir (13):
 - *V.cholerae*; 2-3 mm çapında, sarı renkli, yassı koloniler
 - *V. parahaemolyticus*; 3-5 mm çapında, yeşil koloniler
 - *V. alginolyticus*; 3-5 mm çapında, sarı renkli koloniler
 - *V. metschnikovii*; 3-4 mm çapında, sarı koloniler
 - *V. fluvialis*; 2-3 mm çapında, sarı koloniler
 - *V. vulnificus*; 2-3 mm çapında, yeşil koloniler
 - *V. mimicus*; 2-3 mm çapında, yeşil koloniler
 - *Enterococcus* suşları; 1 mm çapında, sarı koloniler
 - *Proteus* suşları; 1 mm çapında, sarı-yeşil koloniler
 - *Pseudomonas* suşları; 1 mm çapında, mavi-yeşil koloniler
 - *Aeromonas hydrophila*; Bazı suşları sarı koloniler oluşturur
 - *Plesiomonas shigelloides*; Genellikle TCBS'de iyi üremez.

4.3. Şüpheli kolonilerden tanımlama (6,7,13)

Koloniden mikroskopik inceleme

- Koloniden yapılan lam-lamel arası (daha iyisi asılı damla) preparat karanlık alan mikroskopunda incelendiğinde bakterinin hareketleri **sinek uçuşması** şeklinde gözlenir. Ortama özgül antiserum (O1 veya O139) ilavesi ile bakterilerin hareketinin inhibe olduğunun gözlenmesi, özellikle salgın durumunda hızlı ön tanı sağlar. Kesin tanı için koloniden bütün diğer tanımlama basamakları gerçekleştirilmelidir.
- Kolonilerden yapılan Gram boyalı yaymada gram negatif, virgül şeklinde kıvrık basiller gözlenir (bkz. UMS-B-TP-03).

Oksidaz testi

- *Vibrio* türleri oksidaz pozitifdir.
- Oksidaz testi *Vibrio* türlerinin diğer gram negatif enterik patojenlerden ayırımında ilk basamak testtir. Eğer şüpheli izolat oksidaz negatif ise tanımlama basamakları farklı bir yola girer; koleradan uzaklaşılır. Bu nedenle yalancı negatiflik olasılığı tam olarak dışlanmalıdır.
- TCBS ve karbonhidrat içeren besiyerlerinden yapılan oksidaz testi yalancı negatif sonuç verebilir. Bu nedenle nutrient agar veya kanlı agara subkültür yapılarak test tekrarlanmalıdır (bkz. UMS-B-TP-16).

Biyokimyasal testler

- Biyokimyasal reaksiyonlar incelemek için şüpheli kolonilerden KIA veya TSI besiyerine ekim yapılır ve 35-37°C'de 4-6 saat inkübe edilir.
- Bu sürenin sonunda TSI/KIA'da reaksiyonlar henüz değerlendirilemez ancak yeterli saf kültür üreme meydana geldiği için bazı tanımlama testlerinin yapılması adımlarına geçilebilir.
- Bu amaçla IMViC seti, üre ve amino asit dekarboksilaz testleri için amino-asit içeren tüplere (sette en azından lizin bulunmalıdır) inokülasyonlar yapılmalıdır. TSI/KIA tüpleri dahil hepsi birlikte bir gece inkübe edilir. Ardından setteki tüplerde gözlenen reaksiyonlar değerlendirilerek karar verilir. IMViC setinin kullanımı ve diğer testler için ilgili UMS belgelerine bakılmalıdır.
- Bir gecelik inkübasyon süresinin sonunda TSI/KIA tüpleri ve diğer test tüplerindeki reaksiyonlar değerlendirilir:
 - (a) KIA veya TSI'de kesinlikle gaz meydana gelmemiş olmalıdır.
 - (b) KIA'da dip sarı, yatık kısım kırmızı (asit/alkali) görünür.
 - (c) TSI'de ise hem dip, hem de yatık kısım sarı (asit/asit) görünür.
 - (d) İndol ve metil kırmızısı testi pozitifdir.
 - (e) Sitratı kullanmış, besiyeri rengi maviye dönmüştür.
 - (f) Üre negatifdir.
 - (g) Lizin dekarboksilasyonu pozitifdir.

O129 diskinе duyarlılık

- Vibriostatik bir ajan olan O129 (2,4-Diamino-6,7-di-iso-propilpteridin fosfat) *Vibrio* türlerinin *Aeromonas* türlerinden ayırımında kullanılır.
- Test için kanlı agar ya da MHA yüzeyine ekim yapılır ve üzerine 10 µg ve 150 µg'lık O129 diskleri yerleştirilir. Bir gece 35-37°C'de inkübe edildikten sonra inhibisyon zonları değerlendirilir.
- Çoğu *V. cholerae* kökenleri (%99) ve diğer *vibrio* türlerinin çoğu 150 µg'lık diske duyarlı iken 10 µg'lık diske duyarlılık değişkenlik göstermektedir. *V. cholerae*'nin Hindistan ve Bengaldeş kökenlerinde direnç oranının giderek arttığı, özellikle O139'ların dirençli olduğu belirtilmektedir (10).
- *Aeromonas* türleri O129 diskinе dirençlidirler.

String test

- Bu test genellikle *V. cholerae*'nin *Aeromonas* türlerinden ayrımı için kullanılmaktadır. HIA gibi selektif olmayan bir besiyerinden alınan kolonilerin bir damla %0.5'lik sodyum deoksikolat (bkz. Ek-1) ile muameleden sonra hücreler parçalanmakta ve DNA ortaya çıkmaktadır.
NOT: %0.5'lik sodyum deoksikolat hazırlamak için 0.05 g sodyum deoksikolat, 100 mL steril distile su içinde iyice karıştırılır. Oda ısısında 6 ay saklanabilir. Hazırlanan her lota kalite kontrol uygulanmalı ve sonuçları kaydedilmelidir. Pozitif kontrol olarak *V.cholerae* O1, negatif kontrol olarak *Aeromonas* spp veya *Plesiomonas* spp suşları kullanılır.
- Testin sonucunda visköz bir süspansiyon elde edilir. Karışım öze ile kaldırıldığında ip şeklinde uzama görülürse test pozitif olarak kabul edilir. *V. cholerae* pozitif, *Aeromonas* türleri negatiftir. Diğer *Vibrio* türleri pozitif ya da zayıf pozitifdir

Ticari tanımlama sistemlerinin kullanımı

- Ticari yarı otomatize ve otomatize tanımlama sistemleri ile de *Vibrio* türlerinin tanımlaması yapılabilir. Ancak bu sistemler ile *V. cholerae* ve genel olarak da *Vibrio* türlerinin tanımlanmasının sorunlu olabileceği, bazılarının veri tabanlarının bütün türleri kapsamadığı ve dikkatli olunması gerektiği *önemle* belirtilmektedir (10).

ÖNEMLİ NOT:

Buraya kadarki basamaklarda (biyokimyasal testlerle) elde edilen sonuçlarla izolatın *Vibrio cholerae* olduğu tanımlanabilir. Böyle izolatların hastalığın etkeni olup olmadığının söylenebilmesi (kesin tanı) için O1 ve O139 antiserumları ile aglütinasyon (serotiplendirme), O1 suşları için biyotiplendirme (El-Tor veya Klasik ayrımı) yapılması ve toksin üretiminin gösterilmesi gereklidir. Bu işlemler Referans Laboratuvarın sorumluluğudur ve ideal olarak izolatlar bu aşamadan itibaren **Referans Laboratuvara** gönderilmelidir. İzolatların Referans laboratuvara gönderilmesi için bkz. sayfa 16)

4.4. Serotiplendirme

- TCBS besiyerinden alınan koloniler yapışkan özelliktedir ve serotiplendirme için uygun değildir. Serotiplendirme için lam aglütinasyon testinden önce kolonilerin, nutrient agar veya seçici olmayan bir besiyerine pasajlanması gereklidir.
- *V.cholerae* şüpheli taze pasajdan polivalan O1 ve O139 antiserumları kullanılarak lam aglütinasyonu yapılır. Öncelikle O1 antiserumu ile aglütinasyon bakılır. Negatif ise O139 ile aglütinasyon incelenir.
- *V.cholerae* O1 pozitif saptanan örnekler monovalan Ogawa ve Inaba antiserumlarıyla test edilir. *V.cholerae* O1 serogrubu Inaba, Ogawa ve Hikojima olmak üzere üç serotipe ayrılmaktadır. Serotiplendirme tipe özgül O antijenlerini içeren monovalan antiserumlarla yapılmaktadır. Bir *V.cholerae* O1 izolatının tanısının **doğrulanmasında** Ogawa veya Inaba antiserumlarından biri ile pozitiflik vermesi yeterlidir.

NOT: Serotipe özgül antiserumun absorbe edilme derecesine bağlı

olarak, serotipin biri diğerine göre daha yavaş veya zayıf aglütinasyon verebilir. Bu nedenle Ogawa ve Inaba antiserumu ile aglütinasyon aynı anda incelenmeli ve daha hızlı ve güçlü reaksiyon veren pozitif kabul edilmelidir. Her iki antiserumla da güçlü ve eşit aglütinasyon nadir görülür. Bu durumda izolat referans laboratuvara gönderilmeli ve "muhtemel Hikojima serotipi" olarak belirtilmelidir.

- O139 serogrubu serotip içermemektedir.
- O1 veya O139 antiserumları ile aglütinasyon vermeyen *V. cholerae* izolatları NCV ('noncholera') veya NAG ('nonagglutinable') vibriolar şeklinde adlandırılır ve "*V. cholerae* non-O1 üredii" şeklinde rapor edilir. Böyle suşların ılımlı kolera-benzeri klinik tablolardan ve bazen salgınlardan sorumlu olabildikleri bildirilmiştir (14).

4.5. *V. cholerae* O1 suşlarının biyotiplendirilmesi

- *V. cholerae* O1 izolatları, ait oldukları biyotipin (El-Tor veya klasik) belirlenmesi için tiplendirilmelidirler.

NOT: Önce O1 ve O139 antiserumları ile aglütinasyon yapılmış ve serotipin tayin edilmiş olması gerekir.

- *V. cholerae* O1 suşlarının biyotiplendirilmesinde kullanılan özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *V. cholerae* O1 suşlarının biyotiplendirilmesinde kullanılan özellikler

Test	Klasik	El-Tor
String test	+	+
Koyun kanlı agarda beta hemoliz	-	+
Voges-Proskauer testi	-	+
Tavuk eritrositlerinin aglütinasyonu	-	+
Polimiksin B (50 U) duyarlılığı	S	R
CAMP	-	+
Faj IV duyarlılığı	S	R

(+), pozitif test; (-), negatif test; S, duyarlı; R, dirençli

- El-Tor biyotipi hemoliz yapma özelliği ile klasik O1 izolatlardan ayrılır.

CAMP Testi

- β -hemolitik *Staphylococcus aureus* veya *Rhodococcus equi* kültürleri birbirine paralel olarak taze koyun kanlı agar plağına ekilir. Ekim çizgilerinin arasına, onlara dokunmaksızın, 2-3 mm yakınından başlayarak ve dik yönde olmak üzere, pozitif kontrol ve test suşları inoküle edilir. Birden fazla örneğin ekimi yapılabilir. Plak 35-37°C'de 24-48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda *V. cholerae* O1 El-Tor biyotipinde, *S. aureus* ekim çizgisine yakın, hemolizde artış gözlenir. El-Tor biyotipi sosis şeklindeki hemoliz zonu ile daha dar hemoliz yapan O1-dışı izolatlardan ayrılır (15).

Toksin üretiminin gösterilmesi

- *V. cholerae*'nin kesin tanısı biyotiplendirme ve serotiplendirme ile birlikte toksin üretiminin de gösterilmesi ile konur. İzolatlarda toksin üretiminin gösterilmesinde RPLA ve hücre kültüründen yararlanılabilir. PCR ile toksin genlerinin gösterilmesi de mümkündür.

4.6. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

- *V.cholerae* O1 ve O139 suşlarında antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç gelişimi arttığından dolayı duyarlılık testlerinin yapılması önemlidir. AMD testleri Referans Laboratuvarın sorumluluğudur.
- *Vibrio* türleri için CLSI disk difüzyon yöntemi için MHA, mikrodilüsyon yöntemi için katyon katkılı MHA besiyerini önermektedir (16).
- *V. cholerae* izolatlarının *in-vitro* duyarlılık testlerinde önerilen antimikrobiyal ilaçlar ampisilin, azitromisin, doksisisiklin, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametaksazol, kloramfenikol ve sülfonamidlerdir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK düzeyi belirlenerek disk difüzyon ile uyumlu olduğu test edilmelidir.
- Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kalite kontrol amacıyla *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 35218 (sırasıyla beta laktam ve beta laktamaz inhibitörleri için) kullanılmaktadır (4,16).
- Sıvı mikrodilüsyon için direnç sınır değerleri ve disk difüzyon yöntemi için inhibisyon zon çapları Tablo 2'de sunulmuştur.

5 Diğer yöntemler

- Koleranın hızlı tanısında moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Özellikle toksin geninin PCR ile saptanmasında toksinin A ünitesini kodlayan *ctxA* geninin ve toksin 'co-regulated pilus'u kodlayan *tcpA* geninin saptanması mümkündür. Yine PCR ile *V. cholerae* O1 serogrubunun biyotip ayrımı da yapılabilmektedir.
- Referans laboratuvar moleküler tiplendirme yöntemleri ile (PFGE) hastadan ve olası kaynaktan elde edilen *Vibrio* izolatlarının epidemiyolojik ilişkisi olup olmadığını analiz edebilir, bir salgınla ilişkileri olup olmadığını ortaya koyabilir. Bu incelemeler halk sağlığı önlemleri için ilgili otoritelere yol gösterici sonuçlar üretir.

Tablo 2. *V.cholerae* için AMD testlerinde kullanılan inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri

Antimikrobiyal ajan	Diskin potensi (µg)	Zon çapları (mm)			MİK (µg/mL)		
		R	I	S	R	I	S
Ampisilin	10	≤13	14-16	≥17	≤32	16	≤8
Azitromisin	-	-	-	-	-	-	≤2
Doksisisiklin	-	-	-	-	≤16	8	≤4
Tetrasiklin	30	≤11	12-14	≥15	≤16	8	≤4
Trimetoprim-sülfametoksazol	1.25 /23.75	≤10	11-15	≥16	4/76≤	-	≤2/38
Sülfonamidler	250 veya 300	≤12	13-16	≥17	≤512	-	≤256
Kloramfenikol	30	≤12	13-17	≥18	≤32	16	≤8

S, duyarlı; R, dirençli, I, orta duyarlı

6 Saklama, Referans merkeze gönderme

- İzolatlar ileride epidemiyolojik amaçlarla kullanılabileceği düşünülerek saklanmalıdır.
- *Vibrio* izolatlarının saklanması kısa süreli saklamada yatık nutrient agar, uzun süreli saklamada %16 gliserol içeren triptik soya besiyeri kullanılabilir (bkz. B-TP-01 Suş saklama prosedürü).
- Koloni morfolojisi, üreme ve biyokimyasal özellikleri *V. cholerae* ile uyumlu bulunan suşlar doğrulama, serotiplendirme, biyotiplendirme, AMD testleri ve toksin varlığının saptanması için THSK, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı'na gönderilmelidir (bkz. ilgili Sağlık Bakanlığı Yönergesi) (3,17).
- *V. cholerae* şüpheli suşlar yatık nutrient agara pasajlanıp ve bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra gönderilir. Nutrient agarın tercihen steril, vida kapaklı, plastik tüpte hazırlanmış ve taşıma sırasında olası bir sızmayı engellemek için kapağın etrafının Parafilm ile sarılmış olması önerilir. Daha sonra tüp (izolat) taşıma için paketlenir.
- İzolatın gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (18) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi). İzolatlara ait bilgileri içeren bilgi formu da *mutlaka* doldurularak paketin içine yerleştirilmelidir. Paket gönderilmeden önce laboratuvar telefon veya e-posta ile bilgilendirilmelidir.

7 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Negatif kültürler "Patojen etken üremedi" şeklinde rapor edilir.
- Biyokimyasal testler uygulanarak *Vibrio cholerae* şeklinde tanımlanmış izolatlar hekime; "*Vibrio cholerae* üredi. Doğrulama testleri ve toksin üretiminin analizi için Referans Merkez'e gönderilmiştir." şeklinde ön rapor ile bildirilir ve izolat Referans laboratuvara gönderilir.
- *V. cholerae* O1 veya O139 antiserumları ile aglütinasyon veren pozitif kültürler "*Vibrio cholerae* üredi. Serotip... Biyotip..." şeklinde bakterinin adı, serotipi ve biyotipi açıkça yazılarak rapor edilir.
- Tanı sadece biyokimyasal testlerle "*Vibrio cholerae*" şeklinde konmuş ise doğrulama için Referans laboratuvardan sonuç beklenirken bu izolasyon sürveyanstan sorumlu ilgili birime de haber verilmelidir.
- *V. cholerae* O1 veya O139 antiserumları ile aglütinasyon vermeyen pozitif kültürler "*Vibrio cholerae* NAG (nonagglutinable) üredi" şeklinde rapor edilir.
- *Vibrio cholerae* O1 veya O139 ülkemizde bildirimi zorunlu etkenler arasındadır. Vaka bildirimi hemen tüm sağlık merkezlerinden Halk Sağlığı Müdürlüğü'ne en acil şekilde yapılmalıdır (3,17).
- Vaka bir salgınla ilişkili olabilir. Bu nedenle her zaman sonuçlar ilgili sağlık otoriteleri ile mümkün olan en kısa süre içinde paylaşılmalıdır.

8 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Mikrobiyolojik tanıda kültür 'altın standart'tır. Ancak kültürde üreme olmaması *V. cholerae* tanısını dışlamaz. Bu nedenle kültürden izolasyon olasılığını arttırmak için uygun zamanda, doğru örneğin alınması ve uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir.
- Antibiyotik tedavisi başladıktan sonra alınan örneklerin kültüründe izolasyon şansı çok düşüktür.

9 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 565 5507

Görev çerçevesi

Klinik örneklerden *Vibrio* spp için tanı, doğrulama, toksin varlığının gösterilmesi, serotiplendirme ve moleküler tiplendirmelerin yapılması; dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması ve "Ulusal Enterik Patojenler Laboratuvar Sürveyans Ağı (UEPLA)" kapsamında enterik bakterilerin laboratuvara dayalı sürveyans çalışmalarını yürütmek.

UEPLA, bildirim zorunlu hastalıkların sürveyansı sistemine laboratuvarların etkin katılımını sağlamak amacıyla oluşturulan bir 'laboratuvara dayalı sürveyans ağı'dır. 2007 yılında kurulan bu ağ kapsamında *Salmonella*, *Shigella*, Enterohemorajik *E. coli* ve *Campylobacter* türleri incelenmekte olup, zaman içinde etken yelpazesinin genişletilmesi ve katılımcı laboratuvar sayısının artırılması ile ülkemizdeki enfeksiyon eğilimleri ve suş dağılımları hakkında bilgi edinilmesi ve bu verilerin halk sağlığının korunmasına yönelik kullanılması hedeflenmektedir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Koleranın Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, SY-01	Akut gastroenteritte sendromik yaklaşım
UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-04	Hareket testi
UMS, B-TP-06	IMVIC testleri
UMS, B-TP-08	Karanlık alan mikroskopisi
UMS, B-TP-09	Karbonhidrat fermentasyon ve oksidasyon testleri
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-11	KIA/TSI testleri
UMS, B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/dihidrolaz testleri
UMS, B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler'in) boyama
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, B-TP-17	ONPG testi
UMS, B-TP-22	Üreaz testi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, B-MT-06	Lejyoner hastalığının mikrobiyolojik tanısı Ek-2 (besiyeri kalite kontrolü için örnek prosedür)
UMS, B-MT-08	<i>Salmonella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-08	<i>Shigella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-10	<i>Campylobacter jejuni/coli</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi (CLSI)
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 CDC. Cholera - *Vibrio cholerae* infection. <http://www.cdc.gov/cholera/general/index.html> (son erişim tarihi: 28.03.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 4 Keddy KH, Sooka A, Parsons MB, et al. Diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 Infection in Africa. *J Infect Dis* 2013;208 (Suppl 1):23-31

- 5 Harris JB, LaRocque RC, Qadri F et al. Cholera. *Lancet* 2012;379(9835):2466–2476
- 6 Wells J. *Salmonella* serotype Typhi, *Shigella*, and *Vibrio cholerae*. In: Perilla MJ (ed). Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. CDC National Center for Infectious Diseases and World Health Organization Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO. 2003, p. 102-162.
- 7 Curved Gram-negative Bacilli and Oxidase-Positive Fermenters: *Campylobacteraceae* and *Vibrionaceae*. In: Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL (eds). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins. 2007, p. 392-428.
- 8 Akgün Y. *Vibrio cholerae* ve diğer *Vibrio* türleri In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds) *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitabevleri*. 2008, s. 2201-2211
- 9 WHO. Global Task Force on Cholera Control: Prevention and control of cholera outbreaks: WHO policy and recommendations.
<http://www.who.int/cholera/technical/prevention/control/en/index.html> (son erişim tarihi: 28.01.2014)
- 10 Abbott SL, Janda JM, Johnson JA, Farmer III JJ. *Vibrio* and Related Organisms. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 666-676
- 11 York MK, Rodrigues-Wong P. Fecal culture for aerobic pathogens of gastroenteritis. In: Garcia LS (ed. in chief) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 3.8.1.1-21.
- 12 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 13 UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Vibrio* species. Bacteriology – Identification, ID 19, Issue no: 2.1, Issue date: 21.10.11.
http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1313155005555 (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 14 Benenson AS. Cholera. In: Evans AS, Brachman PS. *Bacterial Infection of Humans: Epidemiology and Control*. 2nd ed., Plenum Publishing Corporation, New York. 1991, p. 207-225.
- 15 Lesmana M, Subekti D, Tjaniadi P, Pazzaglia G. Modified CAMP test for biogrouping *Vibrio cholerae* O1 strains and distinguishing them from strains of *V. cholerae* non-O1. *J Clin Microbiol* 1994;32(1):235-237
- 16 CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline- second edition. M45-A2 Volume 30, No.18 CLSI, 2011.
- 17 S.B. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünün 24.02.2004/1534 tarih-sayılı Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Yönergesi. 2004.
- 18 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Yersiniyozun (*Yersinia* sp enfeksiyonu) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-13
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Epidemiyolojisi	4
Klinik özellikler	5
Mikrobiyolojik tanı	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizmalar	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Yersiniyoz tanısında kullanılan teknikler.....	9
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	16
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	16
6 Referans Laboratuvar	16
EKLER.....	17
Ek-1 Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar	17
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	18
KAYNAKLAR.....	18

Kapsam ve Amaç

Yersinia enfeksiyonu, psödoappendiküler sendromdan sepsisemi, farenjit, artrit ve osteomiyelit gibi eklem ve kemik enfeksiyonlarına kadar değişen farklı klinik formlara neden olmaktadır. *Yersinia enterocolitica* diğer üç tür içinde insanlarda en fazla ve en değişken enfeksiyona neden olan türdür.

Yersinia spp ülkemizde laboratuvarından bildirimi zorunlu etkenlerdir (1,2). *Yersinia* enfeksiyonlarının tanısı bakterinin kültürden izolasyonuna dayanır; kesin tanı için özellikle dışkıdan elde edilen izolatların biyotip ve serotipinin de tayini gerekmektedir. *Enterobacteriaceae* üyesi olmaları nedeniyle, akut ishal tanısı için dışkı kültürleri *Yersinia* spp'nin izolasyonu ve tanımlanmasına da imkan sağlar. Ancak bu bakterilerin daha özel şartlara gereksinim duyabildiği ve izolasyon şansını artmak için klinik laboratuvarlarca yeri geldiğinde uygulanabilmesi önem kazanır. Bu nedenle bu UMS belgesinde *Yersinia* enfeksiyonlarının tanıda geçerli teknikler ile doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasına yardımcı bir Rehber verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

AMD	Antimikrobiyal duyarlılık (testi)
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
KIA	Krigler Iron agar
MHA, MHB	Mueller-Hinton agar, Mueller-Hinton buyyon
PBS	Phosphate buffered saline
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
SZB	Soğukta zenginleştirme besiyeri
TSB	Triptik soy buyyon
TSI	Triple Sugar Iron

Genel Bilgi

Yersinia enterocolitica ve *Yersinia pseudotuberculosis*'e bağlı enfeksiyonlar insanlarda barsak ve barsak dışı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu bakterilere bağlı en sık görülen enfeksiyonlar enterokolit, mezenter adenit, terminal ileit, sepsisemi ve ayrıca reaktif artrit gibi otoimmün hastalıklardır.

Yersinia'ların neden olduğu gastrointestinal enfeksiyonlar kontamine gıda ve suların fekal-oral yoldan bulaşması, kontamine hayvanlara veya karkaslarına direkt el-ağız yoluyla maruz kalınması ya da nadiren kontamine kan transfüzyonu ile bulaşmaktadır. *Y. enterocolitica* ve *Y. pseudotuberculosis* yaşlılar, immün sistemi baskılanmış kişiler ve altta yatan metabolik hastalığı olanlarda sepsisemiye neden olabilmektedir (3,4). Enterokolite neden olan *Yersinia* türleri izole edildiği takdirde bildirilmeleri önem arz etmektedir.

Mikroorganizmanın özellikleri

Yersinia türleri *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan pleomorfik gram negatif basillerdir. *Yersinia*'lar 11 tür içerirler. *Y. pestis* dışında, insanlarda en sık enfeksiyon yapan türler *Y. enterocolitica* ve *Y. pseudotuberculosis*'dir.

Y. enterocolitica'nın 60 serotipi ve 6 biyotipi tanımlanmıştır. En sık O:3,O:5, O:8 ve O:9 serotipleri hastalıkta izole edilirken, biyotipler içinde en sık görülenler ise biyotip 2,3 ve 4'tür. *Y. pseudotuberculosis* somatik antijenlerine göre 6 serotipe (I-VI) ve 4 alt tipe ayrılmaktadır. O grup 1 insanlarda enfeksiyonların %80'inden sorumludur.

Yersinia türleri fakültatif anaerob, oksidaz negatif, laktoz negatif, üreaz pozitifdir. Bu türler 37°C'de hareketsiz, 25°C'de hareketlidirler. Her iki tür de beyin kalp infüzyon, MacConkey agar (MAC) ve SS agarda, oda sıcaklığında ve 37°C'de, fosfat tamponlu tuzlu suda ise +4°C'de üreyebilmektedir. Ekilen besiyerlerinde koloniler genellikle 48 saat inkübasyon sonucunda ayırt edilebilir hale gelirler (4).

Epidemiyolojisi

Y. enterocolitica tüm dünyada yaygın olup kaynak kontamine su, yiyecekler, vahşi ve evcil hayvanlardır. En sık kuzey Avrupa ülkelerinde ve Kanada'da izole edilmekte, Güney Amerika, Afrika, Asya ülkelerinden de bildirilmektedir.

Y. enterocolitica ile enfeksiyon, kişinin yaşına bağlı olarak farklı semptomlara neden olabilir (3). Çocuklarda enterokolit tablosu daha sık görülmekte, bu formun özellikle 1-4 yaşı etkilediği gözlenmektedir. Mezenter adenit ve terminal ileit tablosu ise daha çok ileri yaş çocukları ve genç erişkinleri etkilemektedir.

Y. enterocolitica en sık kontamine yiyecek ve suların alınmasıyla fekal-oral yolla, daha az sıklıkla ise enfekte hayvan ve insandan direkt temas ile bulaşmaktadır. Domuz, kemirici, tavşan, koyun, deve, at, köpek ve kediler *Y. enterocolitica*'nın zoonotik kaynakları arasındadır. Enfeksiyon insanlara köpek, kedi veya onların dışkıları ile temas sonucu bulaşabilir. *Y. enterocolitica* patojenik serotiplerinin taşıyıcılığı en sık domuzlarda görülmektedir; bu nedenle bazı özel çığ veya az pişmiş domuz eti ürünlerinin tüketimi gastroenterit için başlıca risk faktörüdür. Buzdolabında +4°C'de saklanan etlerin enfeksiyon için iyi bir kaynak olduğu düşünülmektedir (4,5). *Y. enterocolitica* ile ilişkili kronik taşıyıcılık bildirilmemiştir. Türkiye'de bu konuda yapılan çalışmalar sınırlıdır. Kontamine süt ve dondurmaya bağlı epidemiler bildirilmiştir.

Y. enterocolitica ile ilgili olarak dikkat edilmesi gereken bir durum da kan transfüzyonu reaksiyonları ile ilgilidir. Bakterinin soğukta üreyebilme özelliği, kan ve ürünlerinin soğukta depolanması sırasında bakterinin üremesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle, kan kullanımı sonrasında oluşan reaksiyonlarda bu bakteriye bağlı bakteriyemi veya endotoksemi oluşabileceği akla getirilmelidir.

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde *Y. enterocolitica*'ya bağlı septisemi ve lokalize metastatik enfeksiyonlar görülmektedir. Şeker hastalığı, malignensi, immünsüpresif tedavi, kronik karaciğer hastalığı, alkolizm, malnütrisyon, ileri yaş, hemolitik anemiye bağlı yüksek doz demir kullanımı bu enfeksiyonlar için en önemli risk faktörleridir (5).

Y. pseudotuberculosis'e bağı enfeksiyonlar daha nadir görülmektedir. Bu bakteri de doğada yaygın olarak bulunmakta, kemiriciler, tavşan, deve, çiftlik hayvanlarından, vahşi ve evcil kuşlardan izole edilmektedir. Kontamine yiyecek ve suların alınması ve enfekte hayvanlarla direk temas sonucu bulaşmaktadır. Enfeksiyonları daha çok Avrupa'da 5-14 yaş grubu kişilerden bildirilmiştir. Erkeklerde kadınlara oranla 3 kere daha fazla rastlanmaktadır. Hastalık daha çok kış aylarında saptanmaktadır (5).

Klinik özellikler

Y. enterocolitica'ya bağı enfeksiyonlar 1-3 hafta devam eden ateş, diyare ve karın ağrısı yakınmaları ile başlamaktadır. Olguların %15-40'ında bulantı ve kusma görülebilir. Dışkıda lökosit, kan ve mukus saptanabilir. Ağır olgularda ileumda perforasyon ve rektal kanama gözlenmektedir. Mezenterik adenit veya terminal ileit olan hastalarda sağ alt kadranda ağrı, hassasiyet ve lökositoz belirlenmektedir. Bu bulgu daha çok adolesan ve erişkinlerde görülmekte ve akut apandisit ile karışabilmektedir (5).

Reaktif poliartrit *Yersinia* enfeksiyonlarının komplikasyonu olarak dikkati çeker. Akut diyareden birkaç gün veya bir ay sonra dizlerde, ayak bileğinde ve parmaklarda inflamasyon görülmektedir. Olguların 2/3'ünde bir aydan fazla, 1/3'ün de ise 4 aydan fazla sürebilmektedir. Nadiren ankilozan spondilit görülebilmektedir. Sinoviyal sıvı incelemesinde bol miktarda polimorfonükleer lökosit saptanabilir. Kültürden izolasyon nadirdir.

Eritema nodosum İskandinav ülkelerinde %30 oranında görülmektedir. Ateş ve karın ağrısından 2-20 gün sonra bacak ve gövdede deri lezyonları gözlenmektedir. Hastaların çoğu bir ay içinde kendiliğinden iyileşmektedir.

Y. enterocolitica'ya bağı eksudatif farenjit olguları da belirlenmiştir. Olguların %8'inde diyare olmaksızın akut farenjit gelişebilmektedir. Nadir olarak pnömoni, ampiyem ve akciğer hastalığı da bildirilmektedir. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalar, yaşlılar ve yüksek doz demir kullanan olgularda *Y. enterocolitica*'ya bağı sepsisemi görülebilmektedir.

Y. pseudotuberculosis'in en sık neden olduğu klinik form ise akut apandisiti taklit eden mezenterik adenit tablosudur. Bunun yanında eritema nodosum, poliartrit ve sepsisemi de olguları da bildirilmektedir (5,6).

Mikrobiyolojik tanı

Y. enterocolitica ve *Y. pseudotuberculosis*'e bağı enfeksiyonlarda rutin laboratuvar testleri özgül değildir. Lökosit sayısı normal veya hafif yüksek olabilir.

Tanı bakterinin kültürden izolasyonuna dayanır. Bu türler dışkıdan ve klinik forma göre mezenterik lenf nodları, faringeal eksuda, kan ve diğer steril vücut sıvıları ile apseden izole edilebilmektedir. *Y. enterocolitica* ve *Y. pseudotuberculosis*'i üretmek için seçici CIN agar ve soğukta zenginleştirme yöntemleri kullanılır. Kültürde üreyen kolonilerden biyokimyasal özelliklerine göre ayırma gidilmekte, kesin tanı referans laboratuvarlarında biyotiplendime ve serotiplendirme ile konmaktadır (4,7).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Yersinia enterocolitica ve *Yersinia pseudotuberculosis*

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Yersinia türleri risk grubu 2 mikroorganizmalardır ve bu organizmalarla ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalıdır. Aerosol oluşturmaması muhtemel bütün işlemler sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır (ayrıca bkz. Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi).

Boyanmış olsun olmasın bütün lamalar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk oluştururlar!

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen yersiniyozdan şüpheleniyorsa örnekleri laboratuvara göndermeden önce -*özel besiyerleri ve üretim tekniğine ihtiyaç olduğu için*- laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir (8,9).

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Donanım

İnceleme örnekleri

Yersinia spp tanısı için örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- *Yersinia* türlerinin başarılı bir şekilde izolasyonu için öncelikle klinik örneklerin doğru bir şekilde alınması ve uygun şartlarda laboratuvara iletilmesi gereklidir.
- Dışkı - Akut enterokolit olgularında tercih edilen örnektir. Akut ishal başlangıcında, mümkünse antimikrobiyal tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır. En az 4-5 g veya sulu ise 4-5 mL dışkı örneği alınmalıdır. Yatalak hastalarda steril sürgü kullanılır. Örneklerin laboratuvara ulaşması >2 saat ise, bir miktar dışkı eküvyon ile Modifiye Cary-Blair veya kömürlü Amies taşıma besiyerine aktarılır ve gönderilir.

- Rektal sürüntü – İşbirliği yapılamayan, dışkı veremeyen hastalarda ve bebeklerde tercih edilir. Aynı hastaya ait en az 2 sürüntü alınmalıdır. Eküvyon üzerinde gözle görülebilir miktarda fekal örnek olmalıdır (10).
NOT: Rektal sürüntü alındıktan sonra örneğin laboratuvara ulaşması 2 saatten fazla süreceksa eküvyonlar Modifiye Cary-Blair veya kömürlü Amies taşıma besiyerine konmalıdır.
ÖNEMLİ: Taşıma ortamı olarak Stuart besiyeri veya fosfat tamponlu gliserol uygun değildir, önerilmez (aynı örneklerden *Campylobacter* spp izole edilme olasılığı da düşünülerek!).
- Diğer klinik örnekler – Yersiniyoz şüphesinde kan kültürü, mezenter lenf biyopsisi, steril vücut sıvıları ve serolojik tanı için serum alınabilir.

Besiyeri / Reaktif / Kit

- MAC (MacConkey Agar) - *Yersinia* türlerinin izolasyonunda **temel** bir besiyeridir. Piyasadan temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir.
- CIN agar - *Yersinia* spp izolasyonunda **seçici** bir besiyeridir. Piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir (bkz. Ek-1).
- SZB - 0.067M PBS'dir. *Yersinia* spp'nin soğukta zenginleştirilmesi için kullanılır. Dışkı 0.067M PBS içeren tüpe inoküle edilir; +4°C'de 21 gün inkübe edilir; 7, 14 ve 21. günlerde seçici besiyerine pasajları yapılır.
- TSB - Doku örneklerinin transportunda ve işlenmesinde kullanılır.
- MHA, MHB ve antibiyotik diskleri - Antibiyotik duyarlılık testi için.
- Biyokimyasal testler için besiyeri ve reaktifler – TSI/KIA, IMViC reaktifleri, üre besiyeri, amino asit (lizin) dekarboksilaz test besiyerleri, hareket besiyeri, oksidaz, katalaz reaktifleri, PYR, ONPG, Gram boyama ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri (bkz. sayfa 18 "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- Nutrient agar – suş taşımak için, tüpte yatık agar olarak hazırlanmış
- %16'lık gliserollü TSB – suş saklamak için (bkz. UMS, B-TP-01)
- Tanımlama kitleri – (opsiyonel) Piyasada gram negatif enterik bakterilerin biyokimyasal tanımlamasında kullanılabilecek çeşitli kitler ya da tanımlama setleri ticari olarak mevcuttur.
- Serolojik tanı için antijen veya ELISA kiti

Diğer gereç, donanım

Besiyeri hazırlamak için

- pH metre, manyetik karıştırıcı ve manyetik balıklar
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Erlen (25 mL, 500 mL, 2 L)
- Burgu kapaklı steril tüpler, pipet, steril pipet, pipetleme ekipmanı
- Membran filtre (enjektör tipi, polikarbonat, 0.2µm) ve enjektör
- Steril Petri kabı, tek kullanımlık

Kültürlerden izolasyon-tanımlama için

- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (11).
- İnkübatör, 35-37°C ve 25°C

Seroloji için

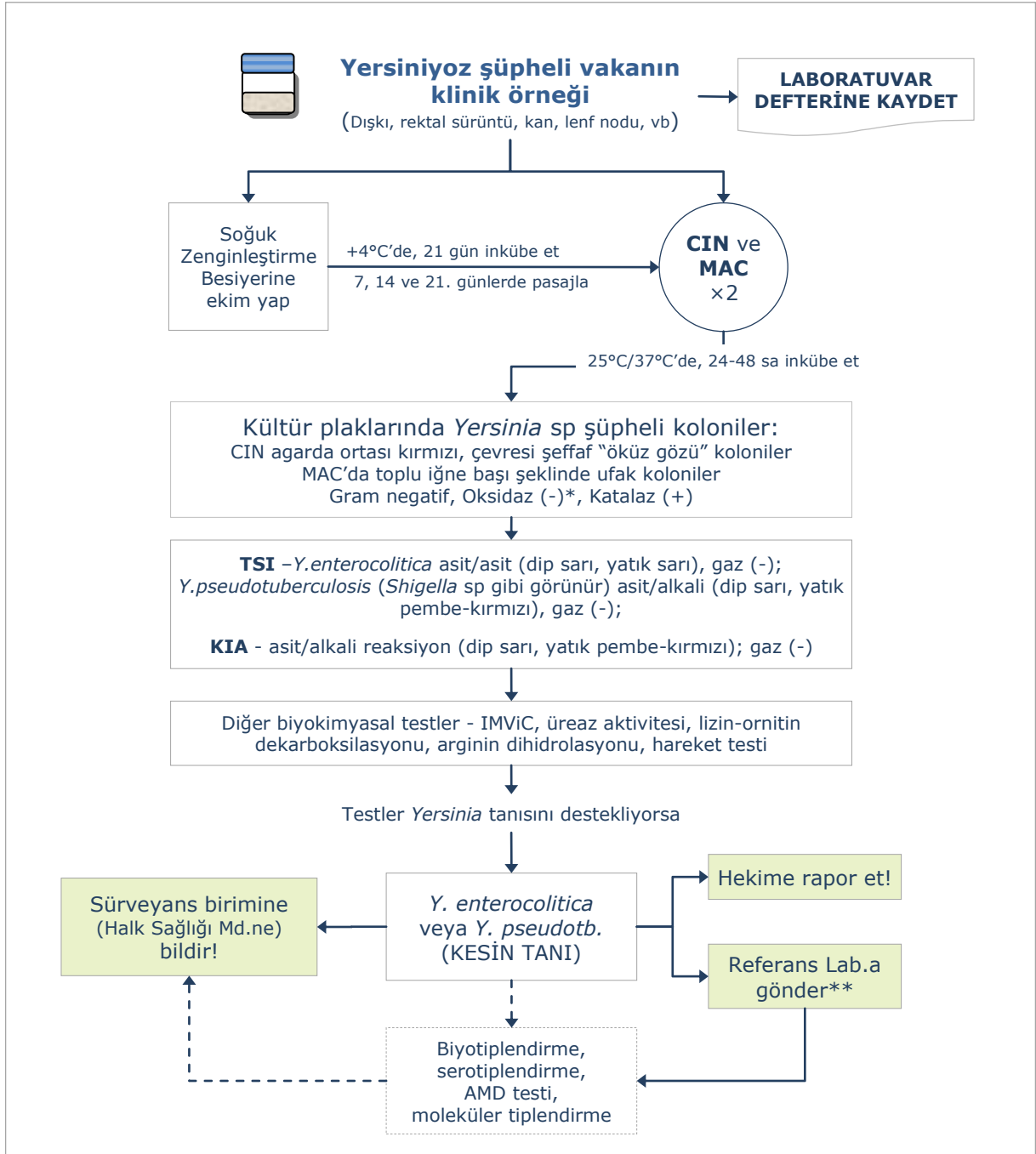
- ELISA okuyucu, yıkayıcı (eğer ELISA formatında test yapılıyorsa)
- Santrifüj
- Tek/çok kanallı otomatik pipet, zaman alarmı (timer)

2.4. Kalite kontrol

- Besiyerlerini kullanmadan önce son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır.
- Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir. Antimikrobiyaller zaman içinde yıkılabilir. Bu nedenle, antibiyotik içeren besiyerlerinin etkinliği de zamanla azalabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarında standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.
 - (a) Sterilite kontrolü için, yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
 - (b) CIN agarda üreme ve seçici özellik kontrolü için *Y. enterocolitica* (ATCC 9610) ve *Aeromonas hydrophilia* (ATCC 7965) pozitif kontrol organizmaları ve *Escherichia coli* (ATCC 12453) negatif kontroldür.
NOT: Enterik bakterilerin izolasyonunda kullanılan seçici besiyerleri, kalite kontrol suşları ve beklenen reaksiyonlar için *bkz.* "UMS, B-MT-09 *Shigella*, Ek-1". Örnek besiyeri kalite kontrol uygulaması için *bkz.* "UMS, B-MT-06 Lejyoner hastalığı, Ek-2"
- Aglütinasyon kitleri veya diğer tanımlama kitleri kullanılırken kontrol suşları da kitte verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır (mikroskop kalibrasyonu için *bkz.* UMS, P-TP-01).
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kullanılan kitin/besiyerinin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine veya kartlarına kaydedilmelidir.

3 Yersiniyoz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı için akış diyagramı



Şekil 1. *Yersinia* spp'nin klinik örneklerden izolasyonu, tanımlanması, raporlanması ve bildiri için akış şeması. sa, saat; Lab., laboratuvar; AMD, antimikrobiyal duyarlılık testleri; *Y.pseudotb.*, *Yersinia pseudotuberculosis*

* Oksidaz testi MAC veya CIN'den direkt yapılmamalıdır. Nutrient agara (veya inhibitör içermeyen bir genel üretim besiyerine) pasajlanmış koloniden oksidaz yapılmalıdır.

** İzolat nutrient (adi) agarda Referans Laboratuvara gönderilir (1).

- Yersiniyozun laboratuvar incelemesi için başlıca iki durum vardır: *birincisi* akut gastroenterit etkenlerinin rutin mikrobiyolojik incelemesi esnasında tesadüfen tanımlanması; *ikincisi* de klinisyenin yersiniyozdan şüphelendiği ve araştırılmasını özellikle istediği durum.
- Akut gastroenterit etkenlerinin rutin mikrobiyolojik incelemesi için akış şeması ilgili UMS belgelerinde (B-MT-08, 09 ve 10) verilmiştir.
- Burada yersiniyozdan özellikle şüphelendiği bir durumda tanı için bu sete ilave olarak kullanılacak CIN agar ve soğukta zenginleştirme pasajından itibaren yürütülecek izolasyon ve tanımlama basamakları verilecektir. Akış şeması Şekil 1'de yer almaktadır.
- Bütün örnekler öncelikle çalışma formuna ve laboratuvar protokol defterine kaydedilmelidir.

3.2. Mikroskopik inceleme

- Laboratuvara gelen taze dışkı örneğinden metilen mavisi boyalı preparat yapıldıktan sonra örneğin lökosit içerip içermediği araştırılır.
- Lökosit varlığı invaziv enfeksiyona işaret etmesi bakımından değerlidir.
- Ancak lökosit bulunmayışı enfeksiyon olasılığını dışlamaz.

3.3. Kültür

Hazırlık

- Kültür için en az iki tip besiyerine (MAC+CIN) ve soğuk zenginleştirme için SZB'ye ekim yapılacaktır. Bu amaçla uygun sayıda plak ve tüp buzdolabından çıkarılır.
- Benzer görünümlü besiyerleri birbiriyle karışabileceğinden karışıklık yaşanmaması için plakların üzerleri önceden -MAC, CIN, SZB vb yazılarak- etiketlenmiş olmalıdır.
- Plakların ve SZB tüplerinin üzeri ayrıca hasta adı, örneğin cinsi, ekim tarihi ve defter protokol numarası yazılarak da etiketlenir.

Direkt ekimler

- **Dışkı** steril bir eküvyon ile alındıktan sonra MAC, CIN ve SZB'ye inoküle edilir. Her bir besiyerine ekim yapılırken eküvyonla yeni örnek alınması önerilir.
 - (a) Plak besiyerlerinde (MAC, CIN) **tam** plak yüzeyine (plağı bölmeden) tek koloni ekimi yapılması esastır. Örnek eküvyon ile besiyerinin üst ¼'üne sürülür ve plağın geri kalan kısmına öze kullanarak **azaltma** yöntemi ile yayılır.
 - (b) Dışkı örnekleri **2 set** halinde ekilir, biri 25°C'de, diğeri ise 37°C'de aerobik olarak, 24-48 saat inkübe edilir.
 - (c) SZB'ye ekim yapıp buzdolabına (+4°C) kaldırılır. SZB tüplerinden 7, 14 ve 21. günlerde CIN besiyerine inokülasyon yapıp 25°C'de aerobik olarak inkübe edilir.

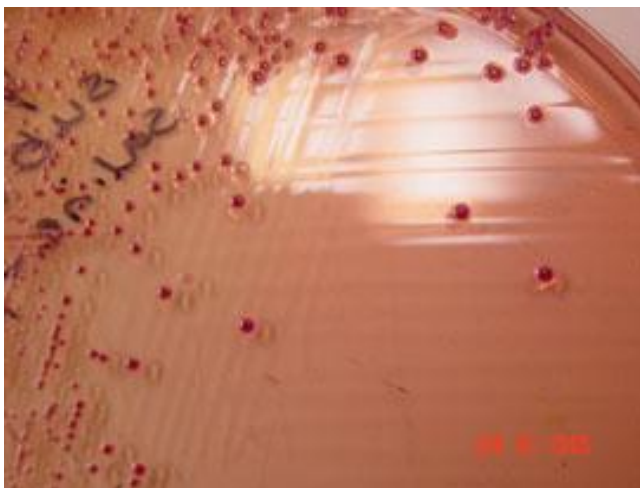
- **Steril vücut sıvıları** (plevra sıvısı vb.) 1500 x g'de 20 dk santrifüj edilir. Tüpün dibinde 0.3-0.5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant dökülür. Sediment vorteks ile karıştırılır. Steril Pastör pipeti ile her plağa 2 damla örnek konur ve L öze ile besiyeri yüzeyine yayılır.
- **Doku biyopsisinin** en fazla zeytin büyüklüğünde bir parçası 5 ml TSB içine konur. Mekanik bir doku öğütücü ile homojenize edilir. Steril bir Pastör pipeti kullanılarak homojenattan alınır ve her plağa 2 damla örnek konur; L öze ile tüm yüzeye yayılır

NOT 1: Steril vücut sıvıları ve biyopsi örnekleri iki set halinde ekilir, biri 25°C de aerobik olarak, diğeri ise 37°C'de 24-48 saat inkübe edilir.

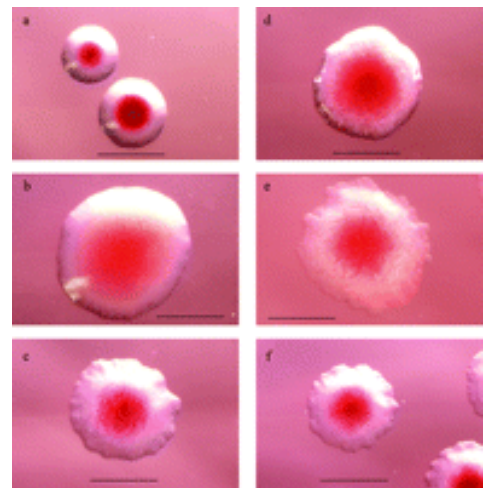
NOT 2: 25°C'ye ayarlanabilir ikinci bir inkübatörü olmayan laboratuvar bu plakları ortam sıcaklığı 22-25°C olan bir odada tutabilir.

Kültür plaklarının değerlendirilmesi

- *Yersinia* kolonileri MAC agarda, 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında ufak, 1 mm'den küçük veya toplu iğne başı şeklinde, hafif pembe laktoz negatif koloniler olarak görülmektedir. Bu tür koloniler gözlemlendiğinde inkübasyon 24 saat daha artırılmalıdır.
- CIN agarda *Y. enterocolitica* kolonileri tipik olarak, ortası kırmızı, etrafı transparan görünümde "öküz gözü" şeklindedir. *Y. pseudotuberculosis* kolonileri daha küçük, kırmızı merkezli ve etrafında daha keskin transparan bir zon içerirler (bkz. Şekil 2 ve 3).
- CIN agarda *Serratia*, *Morganella* ve *Citrobacter* türleri gibi diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri de üreyebilir ve *Yersinia* ile benzer ancak daha büyük koloniler oluştururlar. *Aeromonas* türleri CIN agarda üreyebilir ve pembe merkezli etrafı düzgün olmayan koloniler oluşturur. Ayrıca *Pseudomonas* ve *Plesiomonas* türleri de üreyebilir.



Şekil 2. *Yersinia* kolonilerinin CIN agardaki görünümü (www.fda.gov)



Şekil 3. *Yersinia* kolonilerinin CIN agardaki kolonilerinin yakından görüntüleri (www.asm.org)

Mikroskopik görünüm ve Gram boyama

- Işık mikroskopunda gram negatif, kutupsal boyanma özelliği gösteren basiller gözlenir. Basiller tek tek, çiftler veya kısa zincirler şeklinde gözlenebilir.

Biyokimyasal testler

- *Y. enterocolitica* ön tanısı, CIN agardaki tipik koloni görünümüleri, TSI'deki reaksiyonları ve üreaz pozitiflikleri ile konur.
- Primer kültür vasatlarındaki şüpheli kolonilerden biyokimyasal reaksiyonları incelemek için KIA ya da TSI agara pasaj yapılır (bir şüpheli koloni bir TSI/KIA tüpüne olacak şekilde) ve 28-30°C'de 24-48 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında TSI/KIA üremeleri gerekli testler için kullanılır. Bu amaçla IMViC seti, üre ve amino asit dekarboksilaz testleri için besiyeri içeren tüplere (sette en azından lizin bulunmalıdır) inokülasyonlar yapılmalıdır. Tüpler bir gece inkübe edilir. Ardından setteki tüplerde gözlenen reaksiyonlar değerlendirilerek karar verilir.

NOT 1: IMViC setinin kullanımı ve diğer biyokimyasal testler için ilgili UMS belgelerine bakılmalıdır.

NOT 2: Yarı otomatize veya otomatize sistemlerle de *Yersinia* türlerinin ayırımı yapılabilmektedir. Bazı yavaş üreyen türlerin tanımlanmasında yeterli olmayabilecekleri akılda tutulmalıdır.

- Tablo 1'de *Yersinia* türlerinin biyokimyasal test sonuçları verilmiştir.
- *Yersinia* türleri oksidaz negatif, katalaz pozitifdir.

Tablo 1. *Yersinia* türlerinin biyokimyasal test sonuçları

Testler	<i>Y.enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Diğer <i>Yersinia</i> spp.
Glukoz fermentasyonu	+	+	+
Laktoz fermentasyonu	-	-	Değişken
Sukroz fermentasyonu	+	-	Değişken
Glukozdan gaz oluşumu	-	-	Değişken
H ₂ S oluşumu	-	-	-
İndol	Değişken	-	Değişken
Metil red	+	+	Değişken
Voges-Proskauer	25°C (+), 37°C (-)	-	-
Sitrat	-	-	Değişken
Üre (25°C)	+	+	+
Ornitin dekarboksilaz	+	-	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-*
Oksidaz	-	-	-
Hareket	25°C (+), 37°C (-)	25°C (+), 37°C (-)	25°C (+)**, 37°C (-)

* *Yersinia ruckerii*'de değişkendir.

** 25°C'de *Yersinia ruckeri* değişken hareketli, *Y. pestis* hareketsizdir (4).

- TSI/KIA üremeleri aşağıdaki gibidir:
 - (a) TSI'de;
 - *Y. enterocolitica* asit/asit (dip sarı, yatık sarı), gaz (-);
 - *Y. pseudotuberculosis* asit/alkali (dip sarı, yatık kırmızı), gaz (-) görünür. Bu görünüm *Shigella* sp'nin görünümüne benzer.
 - (b) KIA'da, her iki enteropatojen *Yersinia* türü de *Shigella* sp'nin görünümüne benzer; asit/alkali reaksiyon (dip sarı, yatık pembe-kırmızı); gaz (-).
 - (c) LIA (lizin iron agar) kullanılmış ise, lizin dekarboksilaz her iki türde de negatif olduğundan asit/alkali (dip sarı, yatık mor) görünür.

ÖNEMLİ NOT:

Buraya kadarki basamaklarda (biyokimyasal testlerle) elde edilen sonuçlarla izolatın *Yersinia enterocolitica* veya *Yersinia pseudotuberculosis* olduğu tanımlanabilir. Ancak, bu izolatların hastalığın etkeni (patojen) olup olmadığının söylenebilmesi (kesin tanı) için biyotiplendirme ve patojen kökenlerin antiserumları ile aglütinasyon (serotiplendirme) verip vermediğinin gösterilmesi gereklidir. Bu işlemler ve AMD testleri Referans Laboratuvarın sorumluluğudur ve ideal olarak izolatlar bu aşamadan itibaren **Referans Laboratuvara** gönderilmelidir. İzolatların Referans laboratuvara gönderilmesi için bkz. sayfa 15)

Biyotiplendirme

- *Y. enterocolitica*, eskülin, indol, D-ksiloz, trehaloz, pirazinamidaz, β -D-glukosidaz ve lipaz reaksiyonlarına göre altı alt biyogruba ayrılır. Bu biyogruplar coğrafi bölgelere göre ve patojenik potansiyellerine göre farklılıklar gösterir. 1A biyogrubu patojen değilken, 1B, 2, 3, 4 ve 5 biyotipleri patojendir (Tablo 2).

Tablo 2. *Y. enterocolitica* biyotipleri (4).

Test	Reaksiyonlar ^{a b}					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipaz ('Tween esterase')	+	+	-	-	-	-
Eskulin	+	-	-	-	-	-
Salisin	+	-	-	-	-	-
Indol	+	+	(+)	-	-	-
Ksiloz	+	+	+	+	-	d
Trehaloz	+	+	+	+	+	-
NO ₃ → NO ₂	+	+	+	+	+	-
DNaz	-	-	-	-	+	+
Pirazinamidaz	+	-	-	-	-	-

^a +, ≥ %90 suş pozitif; d, %11-89 suş pozitif; -, ≥%90 suş negatif

^b Reaksiyonlar 25°C'de 48 saat inkübasyon sonrasında elde edilmiştir.

Serotiplendirme

- *Yersinia*'lar O somatik, H kirpik ve K yüzeyel antijenleri ile serovarlara ayrılırlar. *Yersinia*'ların *Brucella abortus* gibi birçok bakteri ile ortak özellik gösteren antijenleri bulunduğu bilinmektedir. Özellikle O:9 antijeni ile ortak olduğu için serolojik tanıda zorluklara ve çapraz reaksiyonlara neden olmaktadır.
- Biyokimyasal reaksiyonları *Yersinia* ile uygunluk gösteren örneklerin nutrient agarda saf kolonileri elde edilerek özellikle O:3 ve O:9 serotip antiserumları ile kontrol edilerek bakterinin *Y. enterocolitica* olduğu kesinleştirilir.
- *Y. enterocolitica*'nın 70'den fazla serotipi vardır, ancak tüm serotipleri belirleyecek çeşitlilikte antiserum yoktur. *Y. enterocolitica*'da en az 18 flajellar H antijeni bulunduğundan H ve O antijenlerine göre serotiplendirme nadiren yapılmakta, sadece O antijenine göre serotiplendirme yeterli olmaktadır. Flajellar (H) antijen tiplendirmesi az sayıda referans laboratuvar tarafından yapılmaktadır. Genellikle salgın araştırmalarında epidemiyolojik belirteç olarak yararlanılmaktadır.
- İnsan enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan *Y. enterocolitica* serogrupları O:3, O:5, 27, O:8 ve O:9'dur. O:3 serogrubu, gastroenterite en sık neden olan serotiptir.
- *Y. pseudotuberculosis* I'den VIII'e kadar adlandırılan serogruplara sahiptir. IV ve V serogrupları Avrupa ve Japonya'da nadirdir. VII ve VIII serogrupları Japonya'da hayvanlardan izole edilmiştir.

3.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

- *Y. enterocolitica*'ya bağlı gastroenterit olgularının çoğunda tedaviye gerek yoktur, ancak sistemik hastalık vakalarında özellikle immün düşkün hastalarda tedavi gereklidir. Tedavi seçenekleri trimetoprim-sülfametoksazol ve florokinolonlardır. *Y. enterocolitica* suşları aminoglikozitler, kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametoksazol ve geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlıdır.
- *Y. pseudotuberculosis*, ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, sefalosporinler ve aminoglikozitlere duyarlıdır. *Y. pseudotuberculosis*'e bağlı enfeksiyonlar genellikle tedavi edilmediği halde, septisemili hastalara ampisilin, streptomisin veya tetrasiklin verilmelidir.
- *Yersinia* türlerinin antimikrobiyal duyarlılık testi olarak European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (10) önerileri doğrultusunda *Enterobacteriaceae* türleri için kullanılan disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri önerilmektedir. Kalite kontrolü için *E.coli* ATCC 25922 suşu kullanılmaktadır (12).

3.5. Moleküler testler

- PFGE, *Yersinia* türlerinin tiplendirilmesinde uzun süredir "altın standart" yöntem olarak bilinmektedir. *Y. enterocolitica*'nın patojenik izolatlarının tiplendirilmesinde ribotiplendirmeye göre daha faydalı olduğu bulunmuştur. Özellikle aynı biyotipe ait suşların ayırımında başarılıdır.

3.6. Seroloji

- Hasta serumları ile yapılan serolojik testlerde bakterinin O ve H antijenleri kullanılır. Serolojik tüp aglütinasyon testlerinde 1/60 ve üzerindeki sonuçlar klinik olarak değerlidir. Ancak *Yersinia* ile *Brucella*, *Francisella*, *Vibrio* türleri, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae* ve bazı *E. coli* serogrupları arasındaki çapraz reaksiyonlardan dolayı, serolojik testlerin özgüllüğü %82-95 arasında değişmektedir.
- *Y. enterocolitica*'nın O antijenlerine karşı antikolar, patojenik olmayan serotiplere maruz kalma sıklığına bağlı olarak, birçok normal sağlıklı bireyde bulunabilmektedir.

3.7. Saklama, Referans merkeze gönderme

- İzole edilen *Yersinia* suşları doğrulama ve/veya ileri tanımlama, moleküler epidemiyolojik analiz ve antimikrobiyal duyarlılık testleri için Ulusal Referans Laboratuvarına gönderilir.
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler.

Saklama

- Saklama için *Yersinia* izolatlarının %16'lık gliserollü triptik soy buyyon içinde yoğun süspansiyonu yapılır ve -80°C'ye kaldırılır. Bu koşullarda bakteri 8-10 yıl saklanabilir. Yoğun süspansiyon hazırlayabilmek için izolatın nutrient agar plağına yapılmış yoğun pasajı kullanılmalıdır.
- İzolatların hem saklanması hem de yeniden canlandırılmasında gerekli besiyerleri ve teknikler için bkz B-TP-01 Suş Saklama Prosedürü.

Referans merkeze gönderme

- Ülkemizde yürürlükte olan bildirim sistemine göre *Yersinia* türleri **laboratuvardan** bildirim zorunlu etkenlerdir (Grup D etkenler) ve "kesin tanı" almış sonuçlar bildirim esastır (1,2).
 - (a) Akut gastroenterit tanısı için yapılan inceleme sonucunda dışkıdan *Yersinia* sp olarak tanımlanmış suşlar kesin tanı (biyotip ve serotip tayini) için THSK Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarına gönderilmelidir (bkz. ilgili Sağlık Bakanlığı Yönergesi) (2,13).
 - (b) Kan ve steril vücut sıvılarından elde edilen suşlar hastalık etkeni (kesin tanı) kabul edilir, doğrudan rapor edilir, bildirilirler. Bu suşlar ise epidemiyolojik incelemeler için Referans merkeze gönderilirler.
- Suşlar yatık nutrient agara pasajlandıktan sonra bir gece 37°C'de inkübe edilerek Referans laboratuvarına gönderilmek üzere hazırlanırlar.
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (14) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi). İzolatlara ait bilgileri içeren bilgi formu da *mutlaka* paketin içine yerleştirilmelidir. Paket gönderilmeden önce laboratuvar telefon veya e-posta ile bilgilendirilmelidir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Patojenik olmayan serotipler dışkı florasında bulunabildiğinden, dışkı kültürlerinden *Y. enterocolitica* ve *Y. pseudotuberculosis*'in izolasyonu hastalığın tanısı için yeterli değildir. Başka bir ön tanı olmadan semptomatik hastadan saf kültür olarak izolasyon durumunda etken olarak şüphelenilmelidir. Bu durumda **kesin tanı** için bakterilerin Referans merkezine gönderilmesi gerekmektedir.
- Kan ve steril vücut sıvılarından izolasyon önemli olup biyokimyasal test sonuçlarına göre izolatan *Y. enterocolitica* veya *Y. pseudotuberculosis* olarak tanımlanmış olması "kesin tanı" kabul edilir ve rapor edilmelidir.
- Raporlama, gelen sonuca göre, "*Y. enterocolitica* veya *Y. pseudotuberculosis* üremiştir" veya "ürememiştir" şeklinde olmalıdır.
- *Yersinia* spp ülkemizde bildirim zorunlu etkenler arasındadır. Bildirim listesinde Grup D etkenleri içinde yer alır ve bildirim doğrudan laboratuvarlar tarafından yapılır (2,13). Vakanın bir salgınla ilişkili olabileceği hatırlanmalı, kesin tanısı konmuş bütün vakalar en kısa sürede ilgili Rehberde verilen prosedür izlenerek bildirilmelidir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- *Yersinia* türlerinin tanımlanmasında serotiplendirme, biyotiplendirme ve AMD testleri Referans merkezinde yapılması gerektiğinden, bu bakterinin rutin laboratuvarlarda kesin tanısının konmasında kısıtlılıklar yaşanmaktadır. Tanımlama yapabilen otomatize sistemler olmasına rağmen, patojenik olmayan serotiplerin dışkı florasında bulunabilmesi ve kesin tanı için serotiplendirme yapılması gerektiğinden bu rutin laboratuvarlar için tanıda zorluk ve gecikmelere neden olmaktadır.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 565 5507

Görev çerçevesi

Klinik örneklerden *Yersinia* spp için tanı, biyotiplendirme, serotiplendirme ve moleküler tiplendirmelerin yapılması; dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması.

Ekler

Ek-1 Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar

- CIN agar dışkıdan *Yersinia* türlerinin ayırımında kullanılan seçici besiyeridir. Mannitol ve nötral kırmızısına bağlı olarak *Yersinia*'lar koyu pembeden kırmızıya kadar değişen renkte koloni oluşturlar.
- Sefsulodin ve bir salisilat bileşiği olan irgasan gram negatif bağırsak florasını, novobiyosin ise gram pozitif florayı baskılar. D-mannitol besiyerine seçicilik kazandırır. Kolat, dezoksikolat ve kristal viyole gram pozitif ve gram negatif bakterilerin çoğuna inhibitör etki gösterir.

Maddeler

CIN Agar Base

Maya özütü	2 g
Pepton	17 g
Proteoz pepton	3 g
Mannitol	20 g
Sodyum deoksikolat	0.5 g
Sodyum kolat	0.5 g
Sodyum piruvat	2 g
NaCl	1 g
Mg SO ₄ .7H ₂ O	10 mg
Agar	13.5 g
Nötral kırmızı	30 mg
Kristal viyole	1 mg
Irgasan	4 mg
Distile su	1000 mL

Yersinia antimikrobik suplement^{1,2}

Sefsulodin	4.0 mg
Novobiyosin	2.5 mg

¹ Bazı ticari ürünlerde irgasan besiyerinin içinde değil, suplementin içinde yer almaktadır.

² Antibiyotikler laboratuvarında uygun konsantrasyonlarda ayrı ayrı hazırlanıp derin dondurucuda saklanabilir ve besiyeri hazırlanırken eritilip besiyerine katılabilir (antibiyotik suplement hazırlama örnek prosedürü için bkz. "UMS, B-MT-01 Boğmaca, Ek-2")

Hazırlanması

- Agar baz maddeleri (ya da hazır toz karışımdan 59.5 g) 1000 mL distile suya eklenir; manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak ısıtılır ve tamamen erimesi için 1 dk kaynatılır. 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilir.
- 45-50°C'ye soğutulur. Aseptik koşullarda 10 mL steril distile suda eritilen *Yersinia* antimikrobik suplement besiyerine ilave edilir.
- Besiyeri iyice karıştırılıp, 90 mm çapındaki Petri plaklarına 20-25 mL miktarda dökülür. Oda ısısında dondurulur.
- Besiyerinin adı ve hazırlama /son kullanma tarihi yazılarak etiketlenir. Uygun saklama koşullarında (+4°C'de, naylon torbada nem kaybı önlenerek) raf ömrü 2 aydır.

Testin değerlendirilmesi

- Y. enterocolitica*, *Aeromonas* spp ve diğer *Yersinia* spp CIN agarda ortası koyu kırmızı, kenarları şeffaf "öküz gözü" görünümünde koloniler oluşturur. *E. coli* ürememelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Yersiniyozun Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, SY-01	Akut gastroenteritte sendromik yaklaşım
UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-04	Hareket testi
UMS, B-TP-06	IMVIC testleri
UMS, B-TP-09	Karbonhidrat fermentasyon ve oksidasyon testleri
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-11	KIA/TSI testleri
UMS, B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/dihidrolaz testleri
UMS, B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler'in) boyama
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, B-TP-17	ONPG testi
UMS, B-TP-19	PYR testi
UMS, B-TP-22	Üreaz testi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, B-MT-01	Boğmacanın mikrobiyolojik tanısı Ek-2 (antibiyotik supplement hazırlama için örnek prosedür)
UMS, B-MT-06	Lejyoner hastalığının mikrobiyolojik tanısı Ek-2 (besiyeri kalite kontrolü için örnek prosedür)
UMS, B-MT-08	<i>Salmonella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-09	<i>Shigella</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-10	<i>Campylobacter jejuni/coli</i> enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi (EUCAST)
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 CDC. Yersinia. <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/yersinia/> (son erişim tarihi: 18.12.2013)

- 4 Schriefer ME, Petersen JM. *Yersinia*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 627-638.
- 5 Dennis DT, Mead PS. *Yersinia* species, including Plague. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin RD (eds). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7 ed., Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia. 2010, p. 2943-2953
- 6 Genus *Yersinia*. In: Janda JM, Abbott SL (eds). *The Enterobacteriaceae*. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. 2006, p. 205-232.
- 7 UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Yersinia* species. Bacteriology – Identification, ID 19, Issue no: 2.1, Issue date: 21.10.11. <http://www.hpa.org.uk/SMI> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 8 Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü. 2008.
- 9 Wanger A. *Yersinia*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed., ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 688-697
- 10 York MK, Rodrigues- Wong P. Fecal culture for aerobic pathogens of gastroenteritis. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.8.1.1 - 23.
- 11 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 12 European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2013. <http://www.eucast.org> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 13 S.B. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 24.02.2004/1534 tarih-sayılı Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Yönergesi. 2004.
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Listeriyozun (*Listeria monocytogenes* enfeksiyonu) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-14
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikler.....	4
Mikrobiyolojik tanı	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları.....	6
3 Listeriyoz tanısında kullanılan teknikler	9
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	17
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	18
6 Referans Laboratuvar	18
EKLER.....	19
Ek-1 UVM buyyon.....	19
Ek-2 LPM Agar	20
Ek-3 Oxford besiyeri	21
Ek-4 PALCAM Agar.....	22
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	23
KAYNAKLAR.....	23

Kapsam ve Amaç

Listeriyoz *Listeria monocytogenes* türü bakterilerin neden olduğu klinik tabloların genel adıdır. Bu klinik tablolar gastroenteritten sepsis, menenjit, rombensefalit ve perinatal hastalıklar gibi ciddi invaziv enfeksiyonlara kadar değişiklik gösterir. Öncelikle yaşlılar, hamile kadınlar, yenidoğanlar ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler etkilenir. Gebelerde düşüklere yol açarken *in-utero* (transplasental) ya da enfekte doğum kanalından geçiş sırasında anneden bebeğe bulaşarak yenidoğanda yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara sebep olabilir. Nadir de olsa bu risk faktörleri olmayan kişilerde de enfeksiyon görülebilir (1,2).

L. monocytogenes ülkemizde laboratuvarından bildirimi zorunlu bir etkindir (3,4). Kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konur. Dışkıdan izolasyonu özellik arz ettiği için güç olmakla birlikte steril vücut bölgelerinden izolasyonu klinik laboratuvarlarda kolay gerçekleştirilebilir. Böyle vakaların da gıda kaynaklı bir salgınla ilişkili olma olasılıkları vardır ve bildirilmelidirler. Bu UMS belgesinde *L.monocytogenes* enfeksiyonlarının, geçerli teknikler ile doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasına yardımcı bir Rehber verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

AMD	Antimikrobiyal duyarlılık (testi)
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Peterson (testi)
KIA	Krigler Iron agar
LPM	Lityum klorid-feniletanol-mokzolakdam agar
MHA, MHB	Mueller-Hinton agar, Mueller-Hinton buyyon
PALCAM	Polimiksin B-akriflavin-lityum klorid-seftazidim-eskülin-mannitol agar
PBS	Phosphate buffered saline
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
SZB	Soğukta zenginleştirme besiyeri
TSB	Triptik soy buyyon
TSI	Triple Sugar Iron (agar)
UVM	"University of Vermont" sıvı besiyeri

Genel Bilgi

Listeria monocytogenes listeriyoz hastalığının etkenidir. Akut gastroenteritten sepsis, menenjit, rombensefalit, perinatal hastalıklar ve düşük gibi ciddi invaziv enfeksiyonlara kadar değişik klinik tablolara neden olabilmektedir (1,2).

L. monocytogenes doğada yaygın olarak bulunur. En önemli bulaş yolu kontamine yiyeceklerin tüketilmesidir.

Bulaşta rol oynayan gıdalar başlıca çiğ kırmızı et, balık, çiğ sebzeler ile pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleridir. *L. monocytogenes* işlenmiş gıdalarda da bulunabilir. Bakteri, asit ve tuz eklenmesi gibi gıda işlemlerinden sonra canlılığını koruyabilme yeteneği ile özellikle gıda kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bunun yanı sıra birçok patojen bakterinin tersine, *L. monocytogenes*'in düşük sıcaklıklarda çoğalabilme özelliği vardır ki bu özellik buzdolabında saklanan yiyeceklerde bile bakterinin üreyebilmesini sağlar (1,2,5,6)

Nadiren de olsa enfekte hayvanlardan direkt temas yoluyla insanlara bulaş olabilir. Vertikal geçişle anneden bebeğe bulaş da görülebilir. Anneden bebeğe *in-utero* (transplasental) ya da enfekte doğum kanalından geçiş sırasında *L. monocytogenes* bulaşı yenidoğan enfeksiyonlarına neden olabilir (5,6).

Mikroorganizmanın özellikleri

Listerialar sporsuz, fakültatif anaerob, katalaz pozitif, oksidaz negatif, gram pozitif çomak bakterilerdir. *Listeria* cinsinde *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* ve *L. marthii* olmak üzere 7 tür bulunmaktadır (1). İnsanda patojen tek tür *L. monocytogenes*'dir.

Listeria türleri çevrede yaygın olarak bulunur. Evcil ve vahşi hayvanların yanı sıra taşıyıcı insanların dışkılarından izole edilebilir. Hayvanlar hastalık belirtisi göstermeden bakteriyi taşıyabildiklerinden dışkı, süt ve uterus salgılarıyla mikroorganizmanın dışarı atılmasına yol açarlar. Bunun sonucunda et ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalar kontamine olabilir (1,2).

L. monocytogenes soğuk, kuruluk gibi olumsuz çevre koşullarına dayanıklıdır. Geniş bir ısı aralığında (1°C ile 45°C arasındaki sıcaklıklarda) üreyebilir ve buzdolabında kontamine olmuş yiyeceklerde çoğalabilir; 3.6'dan 9.5'e kadar değişen pH aralığında canlılığını koruyabilir. Bunun yanı sıra %20 oranında sodyum klorür varlığında canlılığını sürdürebilme özelliğine sahiptir (1,2).

Yiyeceklerde bulunan *L. monocytogenes* genellikle pişirme ve pastörizasyon ile yok edilebilir (1,2).

Klinik özellikler

L. monocytogenes genellikle hamilelerde, yenidoğanlarda, yaşlılarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ciddi, ölümcül enfeksiyonlara yol açar. Sağlıklı bireylerde nadiren enfeksiyon gelişir.

L. monocytogenes çok çeşitli klinik tablolara yol açabilir. Hamilelerde enfeksiyon asemptomatik olabileceği gibi, kas ağrısı, ateş, baş ağrısı ile grip benzeri hafif bir klinik tablo da izlenebilir. Geçici bakteriyemi sonucunda plasenta ya da amnion sıvısı enfekte olabilir. Gebelik sırasındaki enfeksiyonu takiben birkaç gün ya da hafta sonra düşük, ölü doğum, erken doğum veya yenidoğanda yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olabilir. Yenidoğanda listeriyoz *in-utero* ya da doğum sırasında enfekte doğum kanalından bulaş sonrası ortaya çıkar. İnkübasyon süresi birkaç gün ile birkaç hafta arasında değişiklik gösterir. İntrauterin geçişle bağlı, **erken tip** (granulomatosis septica) ve doğumdan 2-3 hafta sonra görülen **geç tip** enfeksiyon (menenjit, meningoensefalit, septisemi) şeklinde görülebilir. Bu enfeksiyonların çoğu ölümcül seyreder.

Yaşlılarda veya bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda menenjit, meningoensefalit, rombensefalit veya septisemiye yol açabilir. Merkezi sinir sistemi bulguları arasında konfüzyon, kraniyal sinir defektleri, ataksi, tremor ya da myoklonus yer alır. Beyin apsesi görülebilir. Endokardit, septik artrit, osteomyelit ve pnömoni gibi diğer klinik tablolar daha nadir görülmektedir.

Sağlıklı bireylerde semptomatik enfeksiyon nadirdir.

Ateşli gastroenterit görülebilir. Bu klinik tabloda ishal, ateş, bulantı-kusma, karın ağrısı, baş ağrısı ve miyalji görülür. Gastroenteritin inkübasyon süresi 1-2 gün olup birkaç gün içinde kendiliğinden düzelir. Duyarlı kişilerde mortalite %20-30 oranında saptanmıştır. Gebelerde nadiren ciddi enfeksiyonlar görülür ancak fetüste ya da yenidoğanda mortalite oranı yüksektir. Yeni doğanlarda mortalite %50'lere kadar çıkmaktadır (1,2,6,7).

Mikrobiyolojik tanı

L. monocytogenes'in kesin tanısı mikroorganizmanın kan, BOS, plasenta, düşük fetüs veya diğer steril vücut sıvılarından izole edilmesi ile konulur.

Dışkı kültürünün ise duyarlılığı ve özgüllüğü çok düşüktür. Normal toplumda bağırsakta %1-10 oranında asemptomatik taşıyıcılık söz konusudur. Dışkıdan *L. monocytogenes*'in izolasyonu için zenginleştirici işlemler ve seçici ajanlar gerekir. Böylece ortamda bulunan diğer mikroorganizmaların üremesi baskılanırken *L. monocytogenes*'in çoğalması sağlanarak bakteri sayısının saptanabilir bir düzeye ulaşması temin edilir (1,7).

Buzdolabında inkübasyon, diğer organizmalar üreyemezken bu bakterinin çoğalmasını sağladığı için önceki yıllarda *L. monocytogenes*'in izolasyonunda rutin olarak kullanılan bir yöntem *soğukta zenginleştirme* idi. Ancak bu yöntem bazen aylarca süren uzun inkübasyon süresi gerektirmesi nedeniyle günümüzde gıda kaynaklı salgınların kaynağının araştırılmasında artık tercih edilmemektedir. Bugün bu amaçla kullanılabilecek ve *L. monocytogenes*'in normal inkübasyon sıcaklıklarında kısa sürede üretilmesini sağlayan birçok seçici besiyeri bulunmaktadır (1,8).

Steril vücut bölgelerinden alınan klinik örnekler triptik soy agar bazlı %5 koyun kanlı agara (at ya da tavşan kanı da olabilir) doğrudan ekilir. Kan örnekleri kan kültürü şişelerine inoküle edilir.

Dışkı gibi flora içeren klinik örnekler ve gıdalar ise *Listeria* seçici (Oxford, PALCAM, LPM agar) besiyerlerinden birine ekilmelidir. Aynı zamanda bu örneklerden UVM gibi bir sıvı zenginleştirme besiyerlerine de ekim yapılmalıdır (1,7,8).

Seçici besiyerinde üreme gerçekleştikten sonra izolatin diğer gram pozitif bakterilerden ayırt edilmesi ve insanda patojen tek tür olan *L. monocytogenes*'in diğer türlerden ayırt edilmesi amacıyla konvansiyonel tanımlama metotları (Gram boyanma özelliği, katalaz, hareket, hemoliz özelliği, karbonhidratlardan asit oluşumu, CAMP testi vb) kullanılır (1,7,8).

L. monocytogenes dokulardan ELISA, immünfloresan ya da PCR gibi farklı yöntemlerle de saptanabilir (8).

Serolojinin tanıda değeri yoktur (1).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Listeria monocytogenes

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Listeria türleri risk grubu 2 mikroorganizmalardır ve bu organizmalarla ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Bütün kültürler ve klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli ve daima standart önlemler uygulanmalıdır. Aerosol oluşturmaları muhtemel bütün işlemler sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır (ayrıca bkz. Ulusal Laboratuvar Güvenlik Rehberi).

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen listeriyozdan şüpheleniyorsa örnekleri laboratuvara göndermeden önce -*özel besiyerleri ve üretim tekniğine ihtiyaç olduğu için*- laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) teknikleri uygulamadan önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Listeriyoz tanısı için örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- *L. monocytogenes*'in başarılı bir şekilde izolasyonu için öncelikle klinik örneklerin doğru bir şekilde alınması ve uygun şartlarda laboratuvara iletilmesi gereklidir. Bakteri dışı gibi steril olmayan klinik örnekler veya gıdalardan izole edilecekse *Listeria* için seçici besiyerlerine ihtiyaç olduğu için laboratuvar bu konuda önceden uyarılmalıdır.
- İncelenen tüm örnekler, mümkünse **antibiyotik başlamadan önce** alınmalıdır.
- Kan kültürü için kan örneği - Ateşin ilk yükselmeye başladığı dönemde alınır. Antibiyotik başlamadan önce ve ateşin yükselme evresinde alınmış 3 örnek yeterlidir; antibiyotik başlanmışsa 48 saat içinde 6 örnek alınır. Kan alınır alınmaz kan kültürü şişesine aktarılır.

- Steril vücut sıvıları (plevra, perikard, periton sıvısı) - en az 5 mL örnek alınır ve steril bir tüpe konur. Enjektör ile gönderilmemelidir.
- BOS - Her birine 1-2 mL olacak şekilde 3 ayrı tüpe örnek toplanır. Laboratuvara ≤ 1 saatte ulaşamayacaksa tüplerden birindeki BOS örneği (1-2 mL) tercihen bifazik T-I (trans-isolate) besiyeri içeren şişeye, aseptiye dikkat edilerek konur. T-I besiyeri yoksa BOS, bir pediatrik kan kültür şişesine inoküle edilir ve gönderilir. (T-I besiyeri yapılışı için bkz. "UMS, B-MT-03 *Neisseria meningitidis* enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı").

NOT: Kan kültürü şişeleri ve BOS asla buzdolabına konulmamalıdır!

- Amniyon sıvısı, fetal doku, plasenta vb. - Aseptik koşullarda sıvı en az 3 mL; doku en az 2-3 gr, mümkünse 2-3 parça halinde alınmalıdır. Örnek 1 saat içinde laboratuvara ulaşabilecekse oda sıcaklığında, değilse soğuk zincirde gönderilir.
- Dışkı - Akut enterokolit olgularında tercih edilen örnektir. Akut ishal başlangıcında, mümkünse antimikrobiyal tedaviye başlanmadan önce alınmalıdır. En az 4-5 g veya sulu ise 4-5 mL dışkı örneği alınmalıdır. Yataklak hastalarda steril sürgü kullanılır. Örneklerin laboratuvara ulaşması >2 saat ise, bir miktar dışkı eküvyon ile Modifiye Cary-Blair veya kömürlü Amies taşıma besiyerine aktarılır ve gönderilir.
- Rektal sürüntü - İşbirliği yapılamayan, dışkı veremeyen hastalarda ve bebeklerde tercih edilir. Aynı hastaya ait en az 2 sürüntü alınmalıdır. Eküvyon üzerinde gözle görülebilir miktarda fekal örnek olmalıdır (9).

NOT: Rektal sürüntü alındıktan sonra örneğin laboratuvara ulaşması 2 saatten fazla sürecekse eküvyonlar Modifiye Cary-Blair veya kömürlü Amies taşıma besiyerine konmalıdır.

- Bütün örneklerin en kısa sürede (<30 dk) laboratuvara ulaştırılması ve işleme alınmaları idealdir. Eğer gecikecekse mümkünse taşıma besiyeri içinde veya $+4^{\circ}\text{C}$ 'de tutmak kaydı ile örnekler 48 saate kadar gönderilebilir. 48 saati aşan taşıma süreleri için örneklerin -70°C 'de dondurulması ve kuru buz içinde laboratuvara gönderilmesi gerekir.
- Gıda örnekleri - Listeriyoz için kaynak araştırması amacıyla varsa kuşku gıda örnekleri Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından alınır ve gönderilir. Gıda örneklerinin alınması ve gönderilmesi ile ilgili bilgi için bkz. Ek-Saha rehberi.
- Gıda örnekleri - Listeriyoz için kaynak araştırması amacıyla kuşku gıdalardan örnekler Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından alınır ve gönderilir. Gıda örneklerinin alınması ve gönderilmesi ile ilgili detaylı bilgi için de "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nin "Ekler" bölümüne bakılmalıdır.

Besiyeri/Reaktif / Kit

- KKA (%5 Koyun kanlı agar) - Steril vücut bölgesi örneklerinden *Listeria* türlerinin izolasyonunda kullanılan **temel** bir besiyeridir.
- UVM (University of Vermont) besiyeri - *Listeria* türlerinin izolasyonunda kullanılan zenginleştirme besiyeridir. Ticari olarak piyasadan hazır temin edilebileceği gibi laboratuvar da hazırlanabilir (bkz. Ek-1).

- Oxford besiyeri, PALCAM besiyeri, LPM agar - *Listeria* spp izolasyonu için **seçici** besiyerleridir. Piyasadan hazır temin edilebilir veya laboratuvar da hazırlanabilirler (bkz. Ek-2, -3 ve -4).
- Soğukta zenginleştirme besiyeri (SZB) - 0.067M PBS'dir ve *Listeria* türlerinin soğukta zenginleştirilmesi için kullanılır. Dışkı 0.067M PBS içeren tüpe inoküle edilir; +4°C'de 21 gün inkübe edilir; 7, 14 ve 21. günlerde seçici besiyerine pasajları yapılır.
- TSB - Doku örneklerinin transportunda ve işlenmesinde kullanılır.
- %16'lık gliserollü TSB – suş saklamak için (bkz. UMS, B-TP-01)
- MHA, MHB ve antibiyotik diskleri - Antibiyotik duyarlılık testi için.
- Biyokimyasal testler için besiyeri ve reaktifler – TSI/KIA, Gram boyama ve Loeffler'in metilen mavisi reaktifleri, hareket besiyeri, amino asit (lizin/ornitin/arjinin) dekarboksilaz testleri, oksidaz, katalaz reaktifleri, nitrat/nitrit redüksiyonu testleri, hippurat hidrolizi karbonhidrat fermentasyon testleri (bkz. sayfa 23 "İlgili Diğer UMS Belgeleri")
- Nutrient agar – suş taşımak için, tüpte yatık agar olarak hazırlanmış
- Tanımlama kitleri – (opsiyonel) Piyasada gram pozitif çomak bakterilerin biyokimyasal tanımlamasında kullanılabilecek çeşitli kitler ya da tanımlama setleri ticari olarak mevcuttur.
- Antibiyotikler, toz madde halinde – AMD testleri için analitik saflıkta.

Diğer gereç, donanım

Besiyeri hazırlamak için

- pH metre,
- Manyetik karıştırıcı ve manyetik balıklar
- Su banyosu (55°C'ye ayarlı)
- Erlen (25 mL, 500 mL, 2 L)
- Burgu kapaklı steril tüpler, pipet, steril pipet, pipetleme ekipmanı
- Membran filtre (enjektör tipi, polikarbonat, 0.2µm) ve enjektör
- Steril Petri kabı, tek kullanımlık

Kültürlerden izolasyon-tanımlama için

- Koloni mikroskobu (stereomikroskop) – kültür plaklarını okumak için (opsiyonel)
- Işık mikroskobu - 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.

NOT: 5× oküler önerilmez! Daha az büyütme sağladığı için inceleme duyarlılığı düşüktür. 10× oküler kullanılmalıdır (10).

- İnkübatör, 35-37°C ve 25°C
- Santrifüj
- Vorteks
- Tek/çok kanallı otomatik pipet
- McFarland 0.5 bulanıklık standardı, McFarland bulanıklık ölçer / turbidometri

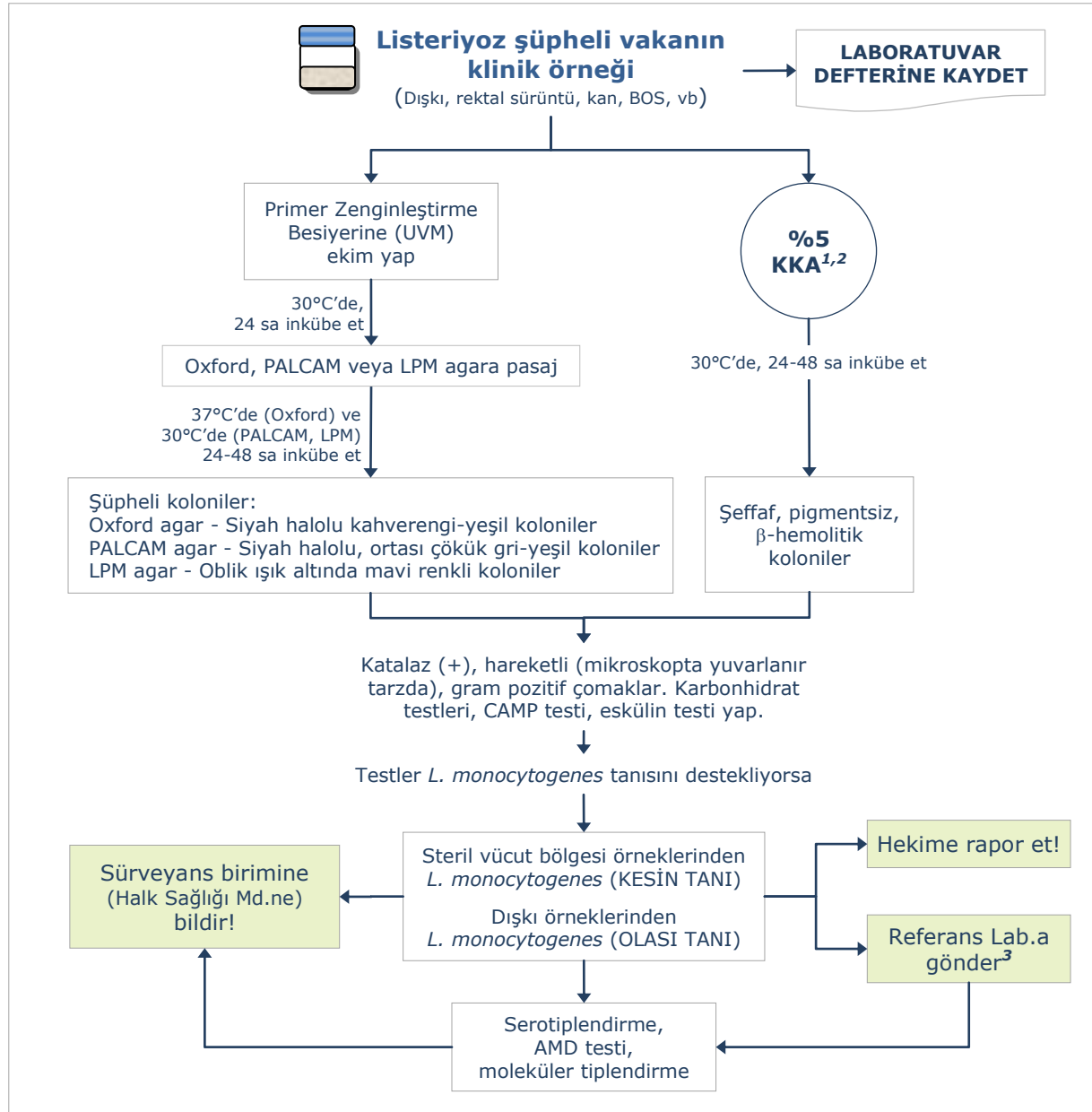
2.4. Kalite kontrol

- Besiyerlerini kullanmadan önce son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer besiyeri plaklarında kuruma, çatlak vb. gözlenirse, kullanılmamalıdır.
- Uzun süre depolanan besiyerlerinde nem kaybı sonucu içeriğindeki maddelerin yoğunluğu artabilir ve besiyeri üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir. Antimikrobiyaller zaman içinde yıkılabilir. Bu nedenle, antibiyotik içeren besiyerlerinin etkinliği de zamanla azalabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü için laboratuvarında standart suşlar bulunmalıdır ya da elde edilen bir izolat henüz pasajlanmamış veya çok az pasajlanmış iken kalite kontrol için saklamaya alınabilir.
- Besiyerlerinin kalite kontrolü başlıca *sterilite* ve *üreme* (ve besiyeri seçici ise *seçici özellik*) kontrolünü kapsar.
 - (a) Sterilite kontrolü için, yeni hazırlanmış her besiyeri lotundan 1 litre besiyeri başına 2-3 plak seçilir; 35°C'de 3 gün inkübe edilir.
 - (b) Üreme ve seçici özellik kontrolü için kontrol organizmaları ve beklenen reaksiyonlar Ek-2, -3 ve -4'de verilmektedir. (Besiyeri kalite kontrol uygulaması örnek prosedürü için ayrıca bkz. "UMS, B-MT-06 Lejyoner hastalığı, Ek-2").
- Mikroskop ve diğer bütün ekipman kalibrasyonları düzenli aralıklarla yapılıyor olmalıdır (mikroskop kalibrasyonu için bkz. UMS, P-TP-01).
- Bütün kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Listeriyoz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Tanı için akış diyagramı

- Listeriyozun laboratuvar incelemesi için başlıca iki durum vardır: *birincisi* -özellikle steril vücut bölgelerinden- klinik örneklerin (BOS vb.) rutin mikrobiyolojik incelemesi esnasında tesadüfen tanımlanması; *ikincisi* de klinisyenin listeriyozdan şüphelendiği ve araştırılmasını özellikle istediği durum.
- NOT: *L. monocytogenes* KKA'da kolay üreyebilen bir gram pozitif çomaktır ve KKA'ya pasajlanmış klinik örneklerden izole edilir.
- *L. monocytogenes* akut gastroenteritlere neden olabilir de, dışkıdan ancak seçici besiyerleri kullanılırsa izole edilebilir. Bunun için de klinisyenin laboratuvara listeriyozdan şüphelendiğini bildirmesi gerekir.
 - Burada listeriyozdan özellikle şüphelenildiği bir durumda tanı için yürütülecek izolasyon ve tanımlama basamakları verilecektir. Akış şeması Şekil 1'de yer almaktadır.
 - Bütün örnekler öncelikle çalışma formuna ve laboratuvar protokol defterine kaydedilmelidir.



Şekil 1. *L. monocytogenes*'in klinik örneklerden izolasyonu, tanımlanması, raporlanması ve bildirimi için akış şeması. sa, saat; KKA, koyun kanlı agar; Lab., laboratuvar; AMD, antimikrobiyal duyarlılık testleri

¹ At kanlı veya tavşan kanlı besiyeri de kullanılabilir.

² Kan kültürü doğrudan kn kültürü şişesine veya T-I besiyerine inoküle edilir.

³ İzolat (özellikle dışkı izolatları tiplendirilmek üzere) nutrient agarda Referans Laboratuvara gönderilir.

3.2. Mikroskopik inceleme

- BOS ve diğer steril vücut sıvılarının mikroskopik incelemelerinde Gram ve metilen mavisi boyama yöntemleri kullanılır.
- Laboratuvara gelen taze dışkı örneğinden metilen mavisi boyalı preparat yapıldıktan sonra örneğin lökosit içerip içermediği araştırılır. Lökosit varlığı invaziv enfeksiyona işaret etmesi bakımından değerlidir. Ancak lökosit bulunmaması enfeksiyon olasılığını dışlamaz.

3.3. Kültür

Hazırlık

- Kültür için en az iki tip besiyerine (KKA ve seçici *Listeria* besiyeri) ve zenginleştirme için UVM'ye ekim yapılacaktır. Bu amaçla uygun sayıda plak ve tüp buzdolabından çıkarılır.
- Benzer görünümlü besiyerleri birbiriyle karışabileceğinden karışıklık yaşanmaması için plakların üzerleri önceden besiyerinin adı yazılarak etiketlenmiş olmalıdır.
- Plakların ve SZB tüplerinin üzeri ayrıca hasta adı, örneğin cinsi, ekim tarihi ve defter protokol numarası yazılarak da etiketlenir.
- Kültür için klinik örnek türüne göre ekim yapılmalıdır. Steril bölgelerden alınan klinik örnekler %5 KKA'ya doğrudan ekilir. Kan kültürü örnekleri kan kültürü şişelerine inoküle edilir. Dışkı gibi flora içeren klinik örnekler ve gıdalar UVM gibi bir sıvı zenginleştirme besiyerine ve seçici *Listeria* (Oxford, PALCAM, LPM) besiyerlerinden birine ekilmelidir (bkz. Şekil 1).
- **Dışkı** steril bir eküvyon ile alındıktan sonra besiyerlerine inoküle edilir. Her bir besiyerine ekim için eküvyonla yeni örnek alınması önerilir.
 - (a) Plak besiyerlerinde **tam** plak yüzeyine (plağı bölmeden) tek koloni ekimi yapılması esastır. Örnek eküvyon ile plağın üst ¼'üne sürülür ve plağın geri kalan kısmına özeyle (azaltma yöntemi ile) yayılır.
 - (b) UVM buyyona ekim için 9 kısım buyyona 1 kısım örnek ilave edilir; 30°C'de inkübe edilir. 24 saat sonra bu kültürün 0.1 mL'si bir seçici besiyerine (Oxford, PALCAM, LPM) pasajlanır. Aynı anda 0.1 mL UVM kültür 10 ml UVM buyyona yeniden ekilerek 24 saat daha inkübe edilir. Bu ikinci UVM zenginleştirmesi, 24 saat sonra yeniden aynı agar besiyerlerine pasajlanır.
 - (c) Dışkıdan SZB'ye de ekim yapıp buzdolabına (+4°C) kaldırılabilir. SZB tüplerinden 7, 14 ve 21. günlerde seçici *Listeria* besiyerlerine pasaj yapıp 37°C'de inkübe edilir.
- **Steril vücut sıvıları** (plevra sıvısı vb.) 1500 x g'de 20 dk santrifüj edilir. Tüpün dibinde 0.3-0.5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant dökülür. Sediment vorteks ile karıştırılır. Steril Pastör pipeti ile her plağa 2 damla örnek konur ve L öze ile besiyeri yüzeyine yayılır.
- **Doku biyopsisinin** en fazla zeytin büyüklüğünde bir parçası 5 ml TSB içine konur. Mekanik bir doku öğütücü ile homojenize edilir. Steril bir Pastör pipeti kullanılarak homojenattan alınır ve her plağa 2 damla örnek konur; L öze ile tüm yüzeye yayılır.

Kültür plaklarının inkübasyonu

- Ekim yapılmış plaklar BGK içinde kapakları yarım kapatılmış şekilde, yüzeyleri kuruyuncaya kadar bekletilirler. Yüzeyleri kurumuş plaklar kapak alta gelecek şekilde ters çevrilerek inkübatöre kaldırılırlar.
- NOT: Yüzeyin kurduğundan emin olunmalıdır; yüzeyi kurumadan inkübe edilen plaklarda yayılarak üreme olur, tek koloni ayırt edilemez.

Özellikle L öze ile yapılan ekimlerde yüzeyin kuruması zaman alabilir.

- Plaklar *Listeria* üremesi için ideal inkübasyon şartlarında (35-37°C'de, normal atmosferde, %50-70 rölatif nemli ortamda) inkübe edilir. Bu nem oranı etüv tabanına geniş bir cam tepsi ile distile su konarak sağlanır. Tepsinin kuru kalmasına izin verilmemeli, düzenli aralıklarla kontrol edilerek su eklenmelidir.

Kültür plaklarının değerlendirilmesi (1,8)

- Listeria* türleri için ortalama üreme süresi 24-48 saattir. Plaklar asgari 48 saat inkübe edilmelidir. plaklarda aşağıda
- Kanlı agarda *Listeria* kolonileri 0.5-1.5 mm çapında, düzgün, şeffaf, dar bir β -hemoliz zonu ile karakterlidir.
- Oxford agarda, 1-3 mm çapında, çevresinde siyah halo bulunan siyah koloniler görülür. Renk oluşumu *Listeria*'nın eskülini hidroliz etmesine ve besiyerinde siyah demir-fenol bileşiklerinin oluşumuna bağlıdır.
- PALCAM agarda, gri-yeşil renkte, yaklaşık 2 mm çapında ve siyah çökük merkezli koloniler görülür. Renk özelliklerinden besiyerinde bulunan eskülin, ferrik demir, D-mannitol ve fenol kırmızısı sorumludur.
- LPM agarda *Listeria* kolonileri oblik ışık altında mavi renkli görünür.

Mikroskopik görünüm ve Gram boyama

- Listeria* spp 0.4-2 μ m boyunda, 0.5 μ m eninde oldukça küçük, genç kültürlerinde düz veya hafif kıvrık, uçları yuvarlak, bazen bir ya da iki uçlarında şişlikler gösteren, yan yana veya uç uca ikişerli, bazen kısa zincirler oluşturan gram pozitif basillerdir.
- Klinik örneklerden (özellikle BOS) hazırlanan direkt yaymalarda kokkoidal şekillerine sıkça rastlanır (1,2).

Tanımlama testleri

- Tüm *Listeria* türleri gıdaları kontamine edebilir ama *Listeria* türleri içinde sadece *L. monocytogenes* halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Dolayısıyla tür düzeyinde tanımlama çok önemlidir. Cins ve tür düzeyinde tanımlama sınırlı sayıda biyokimyasal testlerle yapılır.
- En basit tanımlama yöntemi Gram boyama, hareket (asılı damla preperatta yuvarlanan veya takla atan tarzda), pozitif katalaz ve eskülin testlerine dayanır. D-glukozdan asit oluşumu, pozitif Voges-Prokauer ve metil kırmızısı testleri ile sonuçlar doğrulanır (1,8).
- Listeria* türleri benzer morfolojik veya biyokimyasal özelliklerden dolayı diğer gram pozitif bakterilerden ayırt edilmelidir. *Streptococcus* ve *Enterococcus* türleri Gram boyanma özellikleri, hareket ve katalaz testleri ile ayırt edilebilir. *Erysipelothrix* spp ise *Listeria* türlerinden hareket, katalaz reaksiyonu ve +4°C'de üreme yeteneği ile ayrılır (*Erysipelothrix* spp +4°C'de üremez). *Lactobacillus* türleri genellikle hareketsizdir ve katalaz negatiftir. *Brochothrix* türleri 37°C'de üremez; *Kurthia* türleri zorunlu aerob ve eskülin negatiftir (bkz. Tablo 1).
- Listeria* spp'nin tanımlanmasında kullanılan morfolojik ve biyokimyasal özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* ve *Brochothrix*'in ayırıcı özellikleri (1).

Cins	O ₂ ilişkisi	35°C'de üreme	Katalaz	KIA/TSI'de H ₂ S üretimi	Hareket	Glukozdan asit üretimi	Peptidoglikan di-aminoasit	%Mol G+C
<i>Listeria</i>	Fakültatif	+	+	-	+ ^a	+	meso-DAP	36-38
<i>Erysipelothrix</i>	Fakültatif	+	-	+	-	+	L-lysine	36-40
<i>Lactobacillus</i>	Fakültatif	+	-	-	- ^b	+	L-lysine veya meso-DAP veya L-ornithine	34-53
<i>Brochothrix</i>	Fakültatif	-	+	-	-	+	meso-DAP	35.6-36.1

^a Tüm suşlar 20-25°C'de hareketli, 35-37°C'de zayıf hareketli veya hareketsizdir.

^b Türlerin çoğu hareketsiz ancak az sayıda hareketli tür tanımlanmıştır.

+, pozitif reaksiyon; -, negatif reaksiyon

Hareket testi

- Hareket özelliği 25°C'de 37°C'den daha iyi gözlenir (1,2,8).
- Sıvı besiyerlerinin 25°C'de bir gecelik inkübasyonundan sonra yapılan asılı damla preparatlarda, 'yuvarlanır tarzda hareket' izlenir. Hareket besiyerine yapılan batırma kültürleri 25°C'de inkübe edildiğinde, çizgi ekimi boyunca yana doğru düzgün yayılmanın yanı sıra besiyerinin yüzeye yakın kısmında şemsiyeyi andırır bir yayılma gösterir.

CAMP testi

- Test için, β-lizin üreten *Staphylococcus aureus* veya *Rhodococcus equi* suşları KKA plağı boyunca ekilmeli, *Listeria* suşu *S. aureus* ve *R. equi* suşlarına dik açı ile ve değdirmeden ekilmelidir. *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* hemolizi, *S. aureus* çizgisi bölgesinde; *L. ivanovii* hemolizi ise *R. equi* bölgesinde kürek şeklinde artış gösterir (Şekil 2, Tablo 2)

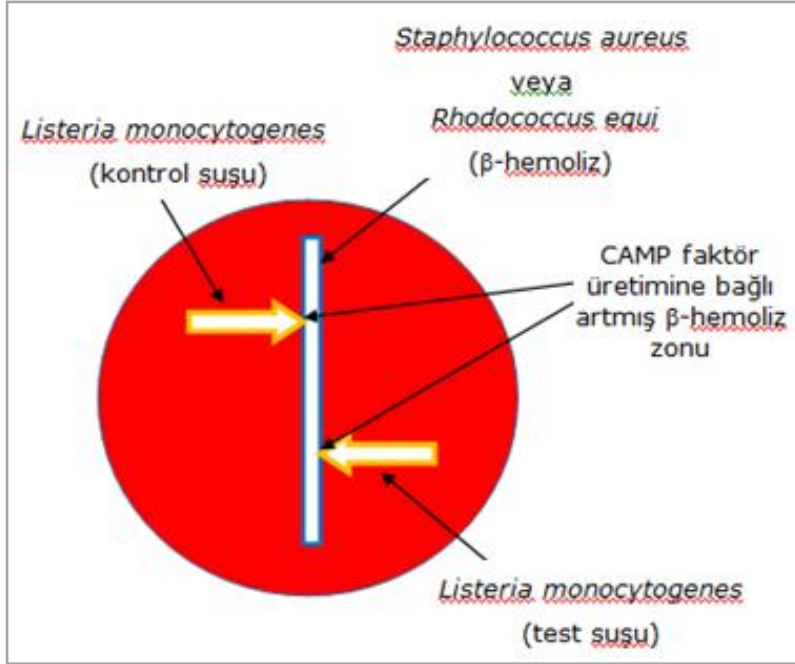
Hemoliz

- L. monocytogenes* ile en sık izole edilen patojen-olmayan *L. innocua* ayırımında hemoliz özelliği kullanılır. *L. monocytogenes* KKA'da beta hemoliz oluştururken *L. innocua* oluşturmaz (1).
- L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* olmak üzere sadece üç tür, KKA'da beta hemoliz oluşturur. Koyun kanlı agarda *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* dar beta hemoliz zonu oluştururken, *L. ivanovii* geniş hemoliz zonu oluşturur (bkz. Tablo 3).

Tablo 2. *Listeria* türlerinin CAMP testi sonuçları (1,8).

<i>Listeria</i> türleri	Hemoliz artışı	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	<i>Rhodococcus equi</i> (R)
<i>L. monocytogenes</i>	+	~*
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-

* Nadir suşlar S+ ve R+. R+ reaksiyonu, *L. ivanovii*'ninkinden daha az belirgindir.



Şekil 2. CAMP testinin şematik görünümü

Tablo 3. *Listeria* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler (1).

Özellikler	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	<i>L.ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.marthii</i>	<i>L.welshimeri</i>
Beta hemoliz	+	-	-	++ ¹	++	+	-	-
CAMP testi								
<i>S.aureus</i>	+	-	-	-	-	+	B	-
<i>R.equi</i>	D	-	-	+	+	-	B	-
Asit üretimi								
Mannitol	-	+	-	-	-	-	-	-
α-metil-D-mannozit	+	+	+	-	-	-	B	+
L-Ramnoz	+	D	D	-	-	-	-	D
Erimiş nişasta	-	+	-	-	-	B	B	B
D-Ksiloz	-	-	-	+	+	+	-	+
Riboz	-	D	-	+	-	-	B	-
N-asetil-β-D-mannozamin	B	B	B	D	+	B	B	B
Hippurat hidrolizi	+	-	+	+	+	B	B	B
Nitrati indirgeme	-	D	-	-	-	B	-B	B
Serovarlar	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7	S	4ab, BS, 6a, 6b	5	5	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4a, BS, 4b, 4d, 6b		1/2b, 4c, 6a, 6b, BS

+, suşların ≥%90'ı pozitif; -, suşların ≥%90'ı negatif; B, belirlenmedi; V, değişken; US, belirlenmemiş serotip; S, spesifik
¹++, genellikle geniş zonlu ya da çoklu zonlu

- Ayrıca yarı otomatize ya da otomatize tanımlama sistemleri ile de *Listeria* türlerinin tanımlaması yapılabilir.

ÖNEMLİ NOT:

Buraya kadarki test basamakları ile izolatın *L. monocytogenes* olduğu tanımlanabilir; eğer steril vücut bölgelerinden izole edildilerse “kesin tanı” olarak rapor edilir ve bildirilir. Ancak, bu izolatların bir salgınla ilişkili olup olmadığının belirlenmesi için ileri tiplendirme yapılması gereklidir. Akut gastroenteritlerde ise izolatın florada bulunan bir köken olma olasılığı vardır; bu nedenle hem etken olup olmadığı hem de bir salgınla ilişkili olup olmadığı ancak doğrulama ve ileri tiplendirme çalışmaları sonucuna göre söylenmelidir. Doğrulama, ileri tiplendirme ve AMD testleri için bütün izolatlar **Referans Laboratuvara** gönderilir. (İzolatların Referans laboratuvara gönderilmesi için bkz. sayfa 17).

Tiplendirme (serotiplendirme, moleküler tiplendirme)

- *L. monocytogenes* izolatlarının gıda kaynaklı bir salgınla ilişkili olup olmadığının gösterilmesinde tiplendirme kritik öneme sahip bir işlemdir.
- *Listeria* suşları, somatik (O) ve flajellar (H) antijenlerine göre serotiplendirilir.
- *L. monocytogenes* serotiplendirmesinde kullanılan O antiserumları I, II..., XV; H antijenleri de a, b, c, d, e harfleri ile gösterilir. *L. monocytogenes*’in 13 serotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ve 7) bulunmaktadır (1,5,8).
- İnsanlardaki hastalıkların büyük bir bölümünde 1/2a, 1/2b ve 4b serotipleri saptanmıştır. Serotip antijenleri *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* ve *L. welshimeri* arasında paylaşılır. Bu nedenle tek başına serotiplendirme alt tiplendirme amaçları için ayrımda yeterli değildir, ancak ilk düzey ayırım için faydalıdır. Serotipin belirlenmesi moleküler alt tiplendirme yöntemlerinin seçilmesini de kolaylaştırır. Lam aglütinasyon yöntemine dayalı ticari bir serotiplendirme kiti (Denka Seiken, Tokyo, Japan) mevcut olup, bu kit ELISA formatına da adapte edilmiştir. Son zamanlarda, farklı gruplardaki dört ana *L.monocytogenes* serovarının (1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b,) ayırımı için bir multipleks PCR testi hazırlanmıştır (1,5,8).
- Günümüzde PFGE *L. monocytogenes* için standart tiplendirme metodu olarak kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü’nün yürüttüğü çok merkezli bir çalışmada ayırt edici gücü ve sonuçların tekrarlanabilirliği teyit edilmiştir. Bunu destekleyen başka çalışmalar da yapılmıştır (1). Yine de laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılabilirliğinde daha yüksek etkinlik için çalışmalar devam etmektedir.

NOT: CDC tarafından 1990’ların ortalarında kurulan PulseNet de gıda kaynaklı salgınların hızla saptanması ve salgın izolatlarına dair moleküler epidemiyolojik paternlerin (özellikle PFGE) laboratuvarlar arası karşılaştırılabilmesi amacıyla standart prosedürler geliştirmektedir. CDC’nin standart protokolüne göre PFGE ile listeriyoz tiplendirmesinde ApaI ve AscI restriksiyon endonükleazlar kullanılmaktadır. İşlevini internet üzerinden diğer ülkelerden laboratuvarların katılımını da sağlayacak şekilde genişletmiş olan PulseNet bu sayede yakınlarda Kanada’daki bir listeriyoz salgınını (22’si ölümle sonuçlanmış 57 vaka) teyit etmiştir (1).

3.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

- Listeriyoz tedavisinde aminopenisilinler (ampisilin, amoksisilin) ve gentamisin kombinasyonu önerilmektedir. Günümüzde ampisiline karşı *in-vitro* direnç tanımlanmamıştır. Penisiline alerjik olan hastalarda ise trimetoprim-sülfametoksazol seçilir. Tedavide başarısızlık, ciddi hastalık ve penisiline alerji durumlarında AMD testleri yapılmalıdır. EUCAST disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon test koşulları, kullanılan antibiyotikler ve direnç sınır değerleri Tablo 4’de verilmiştir (11).
- L. monocytogenes* sefalosporinlere, fosfomisine ve fusidik asite doğal dirençlidir. Menenjit standart tedavisinde kullanılan sefotaksim veya seftriakson *L. monocytogenes*’e etkili değildir. Tedavide sefalosporinler **kesinlikle** kullanılmamalıdır!
- Kloramfenikol, makrolidler ve tetrasikline karşı da çoklu direnç bildirilmiştir. Bakteri vankomisin ve eritromisine genellikle *in-vitro* duyarlıdır. Gram pozitiflere karşı etkili daptomisin, linezolid gibi yeni antibiyotiklere de *in-vitro* yüksek duyarlılık gösterir.

Tablo 4. *Listeria monocytogenes* için EUCAST Klinik Sınır Değer Tablosu¹ (11).

Antimikrobiyal	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (µg)	Zon çapı sınır değeri (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Penisilinler					
Benzilpenisilin	1	1	1 ünite	13	13
Ampisilin	1	1	2	16	16
Karbapenemler					
Meropenem	0.25	0.25	10	26	26
Makrolidler					
Eritromisin	1	1	15	25	25
Çeşitli antimikrobikler					
Trimetoprim-sülfametoksazol ¹	0.06	0.06	1.25-23.75	29	29

¹ Disk difüzyon (EUCAST standart disk difüzyon yöntemi)
Besiyeri, Mueller-Hinton agar + %5 defibrine at kanı ve 20 mg/L β-NAD (MH-F); İnokulum, McFarland 0.5;
İnkübasyon, %5 CO₂, 35±1°C, 18±2 saat; Değerlendirme, İnhibisyon zonu sınırı, yansıyan ışıkla aydınlatılmış ve kapağı açık plağa ön yüzünden bakıldığında, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edilir; Kalite kontrol: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

² Trimetoprim:sülfametoksazol oranı 1:19. Sınır değerler trimetoprim konsantrasyonu olarak ifade edilir.

3.5. Diğer yöntemler

- Serolojik testler listeriyoz tanısında anlamlı değildir ve önerilmez.
- Moleküler yöntemlerle *Listeria* DNA’sının gösterilmesi mümkündür. Özellikle antimikrobiyal tedavi başladıktan sonra alınmış BOS ve kan kültürlerinin sonuçları negatif bulunduğu anda moleküler tanıya başvurulabilir.

3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Hangi klinik örnekten olursa olsun, izole edilen *L. monocytogenes* suşları bir salgınla ilişkili olup olmadıklarının değerlendirilmesi (serotiplendirmeler ve moleküler tiplendirmeler) için Ulusal Referans Laboratuvara gönderilir.
- Laboratuvarlar kendi araştırma, eğitim ve kalite kontrol amaçları için de izolatlarını saklayabilmelidirler.

Saklama

- Saklama için *Listeria* izolatlarının %16'lık gliserollü triptik soy buyyon içinde yoğun süspansiyonu yapılır ve -80°C'ye kaldırılır. Bu koşullarda bakteri 8-10 yıl saklanabilir. Yoğun süspansiyon hazırlayabilmek için izolatın nutrient agar plağına yapılmış yoğun pasajı kullanılmalıdır.
- İzolatların hem saklanması hem de yeniden canlandırılmasında gerekli besiyerleri ve teknikler için bkz B-TP-01 Suş Saklama Prosedürü.

Referans merkeze gönderme

- Ülkemizde yürürlükte olan bildirim sistemine göre *L. monocytogenes* **laboratuvardan** bildirimi zorunlu etkindir (Grup D etkenler) ve "kesin tanı" almış sonuçlar bildirimine esastır (3,4).
- Akut gastroenterit tanısı için yapılan inceleme sonucunda dışkıdan *L.monocytogenes* olarak tanımlanmış suşlar hastalıktan sorumlu olup olmadıklarının belirlenmesi için (serotip tayini, moleküler tiplendirme) THSK Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarına gönderilmelidir (bkz. ilgili Sağlık Bakanlığı Yönergesi) (4,12).
- Kan ve steril vücut sıvılarından elde edilen suşlar hastalık etkeni kabul edilir, doğrudan rapor edilir, bildirilirler. Ancak bu suşların da salgınla ilişkili olup olmadıklarının mutlaka belirlenmesi gerekir ve bu nedenle epidemiyolojik incelemeler için Referans merkeze gönderilirler.
- Suşlar yatık nutrient agara pasajlandıktan sonra bir gece 37°C'de inkübe edilerek Referans laboratuvara gönderilmek üzere hazırlanırlar.
- Örneklerin veya izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (13) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi). İzolatlara ait bilgileri içeren bilgi formu da *mutlaka* paketin içine yerleştirilmelidir. Paket gönderilmeden önce laboratuvar telefon veya e-posta ile bilgilendirilmelidir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Özellikle immün yetmezlikli hastalarda, 60 yaş üzeri hastalarda ve bir aydan küçük bebeklerde steril vücut bölgelerinden alınmış örneklerin direk mikroskopik incelemesinde gram pozitif kısa bacillerin görülmesi durumunda listeriyozdan şüphe edilmelidir ve klinisyene haber (ön rapor) verilmelidir (1).

- Listeriyoz kesin tanısı *L. monocytogenes*'in kan, BOS veya diğer steril vücut sıvılarından izole edilmesiyle konulur. Tür düzeyinde tanımlama, patojen olmayan diğer *Listeria* türlerinden ayırt edilmesi için gereklidir.
- Steril vücut sıvılarından *L. monocytogenes* izole edilmesi her zaman enfeksiyona işaret eder ve "kesin vaka" olarak rapor edilir.
- Ancak dışkıdan *L. monocytogenes* izolasyonu durumunda kolonizasyon olabileceği unutulmamalıdır; salgın kökenleri ile epidemiyolojik ilişkisinin ortaya konması halinde etken olarak bildirilmelidir.
- *L. monocytogenes* ülkemizde bildirimi zorunlu etkenler arasındadır. Bildirim listesinde Grup D etkenleri içinde yer alır ve bildirimi doğrudan laboratuvarlar tarafından yapılır (4,12). Vakanın bir salgınla ilişkili olabileceği hatırlanmalı, kesin tanısı konmuş bütün vakalar en kısa sürede ilgili Rehberde verilen prosedür izlenerek bildirimlerin toplanmasından sorumlu birime bildirilmelidir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Klinik örneklerden hazırlanan direkt yaymalarda Gram boyanma özelliği değişkenlik gösterebilir. Bunun yanı sıra difteroid, kok ya da diplokok şeklinde gözükebilir. Bu nedenle difteroid, streptokok ya da enterokok şeklinde yanlış ön tanı alabilir; hatta kontaminant zannedilerek sonraki adımlara geçilmeyebilir (1).
- Mikroorganizma genellikle katalaz enzimi oluşturmaya rağmen bazı klinik izolatlarda katalaz saptanmayabilir (1).
- Erişkin bağırsak florasında patojen olmayan *Listeria* türleri bulunabildiği gibi, *L. monocytogenes* de %1-10 oranında kommensal olarak görülebilmektedir. Dolayısıyla dışkıdan *L. monocytogenes* izole edilmesi durumlarında kolonizasyon olabileceği unutulmamalıdır.

6 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 565 5507

Görev çerçevesi

Klinik örneklerden *Listeria monocytogenes* için tanı, doğrulama, serotiplendirme ve moleküler tiplendirmelerin yapılması; dış kalite örneklerinin hazırlanması ve uygulanması.

Ekler

Ek-1 UVM buyyon

Materyal

UVM Modifiye *Listeria* Zenginleştirme Buyyonu
(Difco 222330, BBL 212348 veya Remel 455254-2/4/6)

'Pancreatic Digest of Casein'	5.0 g
Proteoz pepton No. 3	5.0 g
Et ekstraktı	5.0 g
Maya ekstraktı	5.0 g
Sodyum Klorid	20.0 g
Disodyum fosfat	9.6 g
Monopotasyum fosfat	1.35 g
Eskülin	1.0 g
Nalidiksik asit*	0.02 g
Akriflavin HCl	12.0 mg
Distile su**	1000 mL

* 0.1M NaOH içinde hazırlanan %2'lik nalidiksik asit solüsyonundan litreye 1 mL ilave edilebilir.

** Besiyerinin kullanılacak miktar kadar hazırlanması tavsiye edilir.

Hazırlanması

- 52 g besiyeri 1000 mL distile suya eklenir; manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak ısıtılır ve tamamen erimesi için 1 dk kaynatılır. pH 7.2±0.2'ye ayarlanır. 121°C'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilir (14).

Testin yapılışı, değerlendirmesi

- 1 kısım örnek 9 kısım UVM buyyona inoküle edilir. Aerobik ortamda 35°C'de 18-48 saat inkübasyondan sonra değerlendirilir.
- L. monocytogenes*, besiyerinde iyi üreme gösterir.

Kalite kontrol

- Pozitif kontrol: *Listeria monocytogenes* ATCC 19114
- Negatif kontrol: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Sınırlamalar

- L. monocytogenes* izolasyonu için UVM buyyon kültürlerinden, katı bir agar besiyerine inokülasyon yapılmalıdır.
- UVM buyyondaki nalidiksik asit gram negatif, akriflavin hidroklorid ise gram pozitiflerin üremesini inhibe eder.
- Enterococcus faecalis* 18-24 saatte baskılanır, ancak 40-48 saatte iyi üreyebilir.

Ek-2 LPM Agar (Lityum Klorid-Feniletanol-Moksolaktam)

Materyal

LPM agar baz

'Pancreatic Digest of Casein'	5.0 g
Proteoz pepton No. 3	5.0 g
Et ekstraktı	3.0 g
Sodyum klorid	5.0 g
Lityum klorid	5.0 g
Glisin anhidrid	10.0 g
Feniletanol	2.5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Antibiyotik suplement

Moksalaktam	0.01 g/mL

Hazırlanması

- 50.5 g besiyeri 1000 mL distile suya eklenir; manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak ısıtılır ve tamamen erimesi için 1 dk kaynatılır. pH 7.3±0.2'ye ayarlanır. 121°C'de 15 dk otoklavlanır.
- 55°C su banyosuna konarak soğutulur. Daha sonra besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılırken, içine aseptik şartlarda 1 mL moksalaktam suplement ilave edilir. Besiyerine tam olarak karışması sağlanır.
- 90 mm çaplı Petri plaklarına 20-25 mL miktarda dökülür. Oda ısısında dondurulur.
- Besiyerinin adı ve hazırlama /son kullanma tarihi yazılarak etiketlenir. Uygun saklama koşullarında (+4°C'de, naylon torbada nem kaybı önlenerek) raf ömrü 2 aydır.

Testin yapılışı, değerlendirilmesi

- LPM agar, *L. monocytogenes*'in izolasyonunda kullanılan zenginleştirici ve seçici bir agar besiyeridir. Feniletanol, glisin anhidrid ve lityum klorid gram pozitif ve gram negatif organizmaların üremesini baskılar. Moksalaktam, *Pseudomonas* gibi gram negatifler ve gram pozitif organizmaları inhibe ederek agarı daha seçici hale getirir.
- Kontamine örnekler (dışkı, gıda örnekleri vb), 24 saat bir *Listeria* zenginleştirme buyyonunda inkübe edildikten sonra LPM'ye ekilir. 30°C'de 24-48 saat inkübe edilir.
- Ayırıcı bir besiyeri değildir, ancak oblik ışık altında (koloni mikroskopunda) diğer bakterilerin kolonileri sarı veya turuncu renkli iken, *Listeria* kolonileri mavi renkte görünür (14).

Kalite kontrol

- Pozitif kontrol: *Listeria monocytogenes* ATCC 19114
- Negatif kontrol: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Ek-3 Oxford besiyeri

Materyal

Oxford Medium Baz

'Pancreatic Digest of Casein'	8.9 g
Proteoz pepton No. 3	4.4 g
Maya ekstraktı	4.4 g
'Tryptic Digest of Beef Heart'	2.7 g
Nişasta	0.9 g
Sodyum klorid	4.4 g
Eskülin	1.0 g
Ferrik amonyum sitrat	0.5 g
Lityum klorid	15.0 g
Agar	15.3 g
Distile su	1000 mL

Suplement

Akriflavin	5 mg/mL
Sefotetan	2 mg/mL
Kolistin sülfat	20 mg/mL
Sikloheksimid	400 mg/mL
Fosfomisin	10 mg/mL

Hazırlanması

- 57.5 g besiyeri 1000 mL distile suya eklenir; manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak ısıtılır ve 1 dk kaynatılır. pH 7.2±0.2'ye ayarlanır. 121°C'de 10 dk otoklavlanır.
- 55°C su banyosuna konarak soğutulur. Daha sonra besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcıda karıştırılırken, içine aseptik şartlarda her bir suplement maddesi 1'er mL (veya hazır vial ise üreticinin tarifine göre) ilave edilir; tam olarak karışması sağlanır.
- 90 mm çaplı Petri plaklarına 20-25 mL miktarda dökülür. Oda ısısında dondurulur.
- Besiyerinin adı ve hazırlama /son kullanma tarihi yazılarak etiketlenir. Uygun saklama koşullarında (+4°C'de, naylon torbada nem kaybı önlenerek) raf ömrü 2 aydır.

Testin yapılışı, değerlendirmesi

- Listeria* izolasyonu için zenginleştirme buyyonundan Oxford besiyerine pasaj yapılır. 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrasında, *L. monocytogenes* eskülini hidrolize ettiği için etrafında siyah halo bulunan kahverengi-yeşil renkli koloniler oluşturur (14).

Kalite kontrol

- Pozitif kontrol: *Listeria monocytogenes* ATCC 19114
- Negatif kontrol: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Sınırlamalar

- L. monocytogenes* dışındaki *Listeria* türleri de bu besiyerinde üreyebilir. Bu nedenle *L. monocytogenes* tanımlanması halinde izolat biyokimyasal ve serolojik testlerle doğrulanmalıdır.
- Bazı enterokoklar 40 saat inkübasyon sonrasında zayıf üreme veya zayıf eskülin reaksiyonu gösterebilir (14).

Ek-4 PALCAM Agar (Polimiksin B-akriflavin-lityum klorid-seftazidim- eskülin-mannitol agar)

Materyal

PALCAM agar baz

'Columbia Blood Agar Base'	39.0 g
Maya ekstraktı	3.0 g
Glukoz	0.5 g
Eskülin	0.8 g
Ferrik amonyum sitrat	0.5 g
Mannitol	10.0 g
Fenol kırmızısı	0.08 g
Lityum klorid	15.0 g
Distile su	1000 mL

Suplement

Polimiksin B	10 mg/mL
Akriflavin hidroklorit	5 mg/mL
Seftazidim	20 mg/mL

Hazırlanması

- 34.5 g besiyeri 1000 mL distile suya eklenir; manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak ısıtılır ve 1 dk kaynatılır. pH 7.2±0.2'ye ayarlanır. 121°C'de 15 dk otoklavlanır.
- 55°C su banyosuna konarak soğutulur. Daha sonra besiyeri hafif ısıtılmış manyetik karıştırıcıda karıştırılırken, içine aseptik şartlarda her bir suplement maddesi 1'er mL (veya hazır vial ise üreticinin tarifine göre) ilave edilir; tam olarak karışması sağlanır.
- 90 mm çaplı Petri plaklarına 20-25 mL miktarda dökülür. Oda ısısında dondurulur. Besiyerinin adı ve hazırlama /son kullanma tarihi yazılarak etiketlenir. Uygun saklama koşullarında (+4°C'de, naylon torbada nem kaybı önlenerek) raf ömrü 1 aydır.
- Kalite kontrol organizmaları, Oxford besiyeri ile aynı (14).

Testin yapılışı, değerlendirilmesi

- PALCAM agar *L. monocytogenes*'in izolasyonunda zenginleştirici, ayırıcı ve seçici bir besiyeridir. Listeriyaların eskülin hidrolizi için eskülin ve ferrik amonyum sitrat içerir. Mannitol fermentasyonu fenol kırmızısı indikatör boyası ile gösterilir (14).
- Listeria* kolonileri 2 mm çapında, ortası çökük, siyah halolu, gri-yeşil koloniler şeklinde görülür. Siyah halo *L. monocytogenes*'in eskülini hidrolize etmesine bağlıdır. *L.monocytogenes* mannitolü fermente etmediğinden, mannitolü fermente eden enterokok ve stafilokoklardan kolayca ayrılır. Bazen enterokok ve stafilokoklar kahve-yeşil halolu, gri koloniler ya da sarı halolu sarı koloniler şeklinde görülebilir.

Sınırlamalar

- Diğer *Listeria* türleri de bu besiyerinde üreyebilir. Bu nedenle *L. monocytogenes*'in tanımlanması halinde izolat biyokimyasal ve serolojik testlerle doğrulanmalıdır.
- Akriflavin hidroklorit ışıqla aktive olursa *Listeria* üremesini inhibe eder.
- Mikroaerofil koşullarda inkübasyon, bu besiyerinde üreyebilen ve zorunlu aerob olan *Bacillus* ve *Pseudomonas* türlerini baskılar (14).

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Listeriyozun Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, SY-01	Akut gastroenteritte sendromik yaklaşım
UMS, B-TP-01	Suş saklama prosedürü
UMS, B-TP-03	Gram boyama
UMS, B-TP-04	Hareket testi
UMS, B-TP-05	Hippurat hidrolizi
UMS, B-TP-06	IMVIC testleri (metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testi için)
UMS, B-TP-09	Karbonhidrat fermentasyon ve oksidasyon testleri
UMS, B-TP-10	Katalaz testi
UMS, B-TP-11	KIA/TSI testleri
UMS, B-TP-13	Lizin - Ornitin - Arjinin dekarboksilaz/dihidrolaz testleri
UMS, B-TP-14	Metilen mavisi (Loeffler's) boyama
UMS, B-TP-15	Nitrat / Nitrit redüksiyonu testleri
UMS, B-TP-16	Oksidaz testi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu
UMS, B-MT-01	Boğmacanın mikrobiyolojik tanısı, Ek-2 (antibiyotik supplement hazırlama için örnek prosedür)
UMS, B-MT-03	<i>Neisseria meningitidis</i> enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısı, Ek-1 (T-I besiyerinin hazırlanması prosedürü)
UMS, B-MT-06	Lejyoner hastalığının mikrobiyolojik tanısı, Ek-2 (besiyeri kalite kontrolü için örnek prosedür)
UMS, AMD-TP-01	AMD testleri için besiyerlerinin hazırlanması
UMS, AMD-TP-03	Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi (EUCAST)
UMS, GEN-ÖY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Wellingshausen N. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Versalovic J (editor in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 403-412.
- 2 Farber JM(1), Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 1991;55(3):476-511.
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı, Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 Mateus T, Silva J, Maia RL, Teixeira P. Listeriosis during Pregnancy: A Public Health Concern. *ISRN Obstet Gynecol* 2013;2013:851712.
- 6 Lorber B. *Listeria monocytogenes*. In: Mandell GL, Bennett JE & Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Elsevier, Philadelphia. 2010, p.2707-2714
- 7 Allerberger F & Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:16-23

- 8 Jadhav S, Bhavé M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 2012;88:327-341.
- 9 York MK, Rodrigues- Wong P. Fecal Culture for Aerobic Pathogens of Gastroenteritis. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 3.8.1.1 - 23.
- 10 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 11 European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). <http://www.eucast.org> (son erişim tarihi: 24.12.2013)
- 12 S.B. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünün 24.02.2004/1534 tarih-sayılı Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Yönergesi. 2004.
- 13 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 14 Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri. Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü. 2008

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Botulismusun Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-15
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik özellikler.....	4
Mikrobiyolojik tanı	4
TEKNİK BİLGİLER	7
1 Hedef mikroorganizma	7
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	7
3 Botulismus tanısı için örneklerin alınması.....	8
4 Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi	9
5 Raporlama.....	10
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
7 Referans Laboratuvar	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	11
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Clostridium botulinum tarafından salgılanan nörotoksinlerin (BoTN) neden olduğu botulismus ağır seyirli bir hastalıktır. Çoğunlukla hastanın öyküsü ve klinik bulgularına göre ön tanısı konabilir. Hastadan alınan serum, dışkı, kusmuk veya mide içeriğinden ya da hastanın yemiş olduğu şüpheli gıdadan BoTN'in gösterilmesi veya dışkıdan *C. botulinum*'un izole edilmesi tanıyı doğrular.

Botulinum nörotoksini çok kuvvetli toksik etkiye sahiptir. Biyolojik silah olarak kullanılma potansiyeli nedeniyle BoNT biyoterör ajanları arasında yer alır. Botulismus vakaları ise, biyolojik terör olasılığının dışlanması gerektirdiğinden, aynı zamanda halk sağlığı acili olarak kabul edilirler (1,2).

Botulismus ülkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır (3,4). Tanıda kullanılabilecek teknikler rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının tanı kapsamına girmediği için örneklerin mikrobiyolojik incelemesi sadece referans merkezlerinde yapılmaktadır. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol oynayacaktır. Bu nedenle bu UMS belgesinde de, botulismus şüphesi bulunan olgularda tanı amacıyla uygun örneklerin seçilmesi, yeterli miktarda alınması ve doğru biçimde paketlenmesi için gerekli bilgilerin verilmesi amaçlanmıştır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

BoNT Botulinum nörotoksin

Genel Bilgi

Botulismus, *Clostridium botulinum*, nadiren *Clostridium baratii* ve *Clostridium butyricum* türlerinin salgıladığı nörotoksinlerin neden olduğu, seyrek görülen, ancak ciddi seyirli nöroparalitik bir hastalıktır (2).

C. botulinum spor oluşturan zorunlu anaerob bir bakteridir. Sporlar doğada yaygın olarak bulunur. Uygun anaerob koşulların oluşması durumunda sporlar germinasyona uğrayıp çoğalır, bu esnada BoNT salgılanır. Son derece yüksek toksik etkiye sahip olan BoNT, ağır zehirlenmelere hatta ölüme neden olabilir (1,2,5).

Botulismusun beş tipi tanımlanmıştır. En fazla görülen formu **gıda-kaynaklı botulismustur**; içinde daha önce toksin oluşmuş besinlerin, çoğunlukla ev yapımı sebze veya et konservelerinin yenilmesiyle gerçekleşir. Daha az sıklıkla **infant botulismusu** görülür, besinlerle ağızdan alınmış sporların bağırsakta kolonizasyonu sonrası gelişir. Lezyonların *C. botulinum* ile kolonize olmasının ardından **yara botulismusu** oluşabilir. Bu klinik tabloların dışında, çocuk veya erişkinlerde intestinal kolonizasyon sonucu meydana gelen botulismus olguları bilinmektedir. Tedavi amaçlı uygulamalara veya laboratuvar kazası ile toksin enjeksiyonlarına bağlı gelişen botulismus olguları bildirilmiştir (6). Biyolojik terör amaçları için BoNT'nin kullanılma olasılığı önemli bir kaygı nedenidir (2,5).

Mikroorganizmanın özellikleri

C. botulinum, gram pozitif, hareketli, subterminal oval spor yapabilen zorunlu anaerob, iri bir basıldır. Şeffaf, düzgün olmayan koloniler oluşturur. At kanlı agarda hemoliz yapar, belirgin koloniler yerine, besiyerinin yüzeyine bir film tabakası şeklinde yayılım gösterir (2,7).

Fenotipik ve genotipik özelliklerine göre *C. botulinum*, grup I, II, III ve IV olmak üzere dört farklı grupta incelenir. Bu gruplarda yer alan *C. botulinum* suşları, serolojik yönden farklılık gösteren yedi (Toksin A-G) nörotoksin salgılar. Farklı tipler bazı konaklara özgüllük gösterir, Tip A, B, E ve F toksinleri insanda, C ve D tipleri ise hayvan ve kuşlarda hastalık oluşturur. Arjantin'de topraktan izole edilen G tipinin insan veya hayvanlarda hastalık yaptığına dair bir bildirim (salgın veya olgu) yoktur (1,2,8).

Botulismusun tüm klinik formlarında toksinler aynı şekilde etki gösterir. Toksinler periferik bölgeden (bağırsak, yara, akciğer) kan dolaşımına geçer; motor nöronlarda kas-sinir bağlantılarına ulaşır ve presinaptik membrana bağlanarak asetilkolinin salgılanmasını engeller, kas kasılması gerçekleşemez. Bunun sonucunda gevşek (flask) paralizi gelişir (1).

Nörotoksin 19 aminoasitten oluşan, 1.5×10^4 dalton ağırlığında bir proteindir. Son derece toksik olan maddenin 0.1 ila $1 \mu\text{g}$ 'ı bir insanın ölmesi için yeterlidir. Toksinler ısıya duyarlıdır, kaynatılmakla yapısı ve aktivitesi bozulur. Polivalan antitoksinlerinin koruyucu etkisi bulunmaktadır (1,5).

Botulismus bulaşıcı değildir.

Klinik özellikler

Klasik besin zehirlenmesine bağlı botulismusta semptomlar toksini içeren gıdaların tüketilmesinden yaklaşık 12-36 saat sonra başlar. Toksin tipi veya miktarına bağlı olarak bu süre 2 saat ile 10 gün arasında değişebilir. Başlangıç bulguları görme bulanıklığı, çift görme, göz kapağında düşme, ağızda kuruma, konuşma ve yutma güçlüğüdür. Ateş yoktur, hastanın bilinci açıktır, duyu kaybı görülmez. Yüzden başlayarak alt ekstremitelere doğru inen kaslarda paralizi gelişir. Paralizi daha sonra simetrik bir şekilde vücudun aşağı bölgelerine ilerleyerek göğüs kafesi, kol ve bacaklara yayılır. Ölüm dil veya farinks kaslarının paralizisine bağlı olarak solunum yolunun tıkanması ya da diyafram ve interkostal kasların paralizisine bağlı olarak solunum yetmezliği nedeniyle gelişir (2,5).

İnfant, yara ve diğer tip botulismus durumlarında inkübasyon süresini tahmin etmek zordur. Ancak ortaya çıkan klinik bulgular aynıdır.

Mikrobiyolojik tanı

Botulismus büyük ölçüde tanısı hastanın öyküsü, klinik ve epidemiyolojik özelliklere ve diğer olası durumların ayırıcı tanı ile dışlanmasına dayanmaktadır. Hastalığın akla getirilmesinde belli başlı (anahtar) klinik bulgular görme bulanıklığı, çift görme, güçsüzlük ve simetrik paralizidir. Rutin laboratuvar testlerinin tanıdaki yeri sınırlıdır.

Tanı için laboratuvar kriterleri; (i) serum, dışkı, kusmuk, mide içeriğinde ya da hastanın yediği yemekte botulinum toksininin tespiti, veya (ii) dışkı veya yara kültürlerinden *C. botulinum*'un izole edilmesidir (3,4).

Fare deneyi

Hasta örneklerinde BoNT varlığının tespiti için referans metot farede toksik etkinin gösterilmesi ve bu etkinin nötralizasyonu deneyleridir (2,5,8).

Fare deneyi ile nörotoksinin biyolojik etkisinin saptanmasının yanı sıra, bakterinin salgıladığı toksin tipi de belirlenebilir. Botulismus şüpheli vakanın örneklerinin farelere enjekte edilmesi ve örnekte *varsa* toksin etkisinin farelerde gözlenmesi prensibine dayanır. Öte yandan fare deneyi pahalı ve emek yoğun bir işlemdir ve dünya genelinde sınırlı sayıda laboratuvar da yapılabilmektedir. Ayrıca deneyde hayvanların kullanılması nedeniyle etik bir sorundur ve alternatif metot arayışı giderek daha fazla önem kazanmaktadır (2,5).

Deneyde, hastanın serumu veya diğer klinik örnek/gıda ekstraktları; (i) doğrudan veya ısıtılarak (10 dk kaynar su banyosunda), (ii) tek başına veya antitoksinler ile ayrı ayrı karıştırılarak, farelere periton içine enjekte edilir. Fareler yaklaşık 4-6 saat aralıklarla (4, 8, 12, 18 ve 24 saat) hastalık bulguları ve ölüm olup olmadığı bakımından gözlemlenir. Farelerde botulismus entoksikasyonu genellikle 6-24 saatte farenin ölümü ile sonuçlanır; ancak ölümün daha geç geliştiği durumlar da görülebilir (2). Farede botulismus belirtileri tüylerinin karışması ile başlar ve bunu sırasıyla karından zorlu nefes alma, bacaklarda güçsüzlük, genel felç izler. Solunum yetmezliği ile ölüm meydana gelir. Belirtilerin şiddeti ve ölüm süresi fareye verilen örneğin içerdiği toksinin miktarına göre değişir. Belirti olmaksızın ölüm meydana gelmesi botulinum toksin varlığı açısından yeterli bir gösterge değildir ve nedenleri irdelenmelidir. Beklenen sonuçlara göre, eğer örnekte yeterli miktarda toksin varsa; (i) özgül antitoksin ile karıştırılmış örneğin enjekte edildiği fareler, ve (ii) (BoNT ısıya duyarlı olduğu için) ısıtılmış ekstraktların enjekte edildiği fareler *hariç*, örneğin enjekte edildiği bütün fareler ölecektir.

Fare deneylerinin diğer önemli dezavantajı da yaklaşık 4 günde sonuçlanmasıdır. Biyoterör olasılığı gibi ciddi halk sağlığı ve güvenlik tehditlerinde çok sayıda örneğin incelenmesine ve daha hızlı tanı konmasına ihtiyaç duyulabileceğinden dolayı alternatif metotların geliştirilmesi önemini korumaktadır (1).

Toksinin saptanmasında diğer teknikler

Fare deneylerine alternatif olarak botulinum toksininin tespit edilebilmesi için *in-vitro* immünolojik testlerin geliştirilmesine yönelik büyük bir çaba vardır. Fare deneyi ile karşılaştırıldığında bu testler teknik olarak basit, uygulaması ve yorumlaması çabuktur. Botulinum nörotoksinlerinin tespitinde en sık kullanılan test formatı ELISA'dır. Genellikle, önceden bir ya da daha fazla toksin tipine karşı poliklonal ya da monoklonal antikörler ile kaplanmış mikropalaklar kullanılır. Test, hastanın örneğindeki nörotoksinin bu antikörlere bağlanması prensibine dayanır. Toksine bağlanması için de ikinci bir özgül antikör eklenir (sandviç ELISA) ve son olarak enzimle işaretli bir antiglobülin kullanılır (5).

Botulinum nörotoksininin tespitinde geleneksel ELISA testlerinin duyarlılığı fare deneyinden yaklaşık 10-100 kat düşük bulunmuştur.

Dışkı gibi flora ile karışık örneklerin ekstraktlarından test yapıldığında duyarlılığın daha da düştüğü rapor edilmiştir. Duyarlılığı daha yüksek alternatif testler üzerine çalışmalar devam etmektedir (5).

Kültür

Gıda kaynaklı botulismus şüphesinde hastanın dışkı örneğinin, yara botulismusu şüphesinde de yara örneğinin kültürlerinden *C. botulinum* izole edilebilir. *C. botulinum* basit katı besi yeri veya zenginleştirilmiş besiyerinde anaerob ortamda üretilir. Yumurta sarısı bulunan besiyerinde lipaz aktivitesi göstermesi tanımlanmada yol göstericidir. Ancak izole edilen ve tanımlanan organizmanın botulismus etkeni olduğunu söyleyebilmek için toksin üretiminin gösterilmesi gereklidir. Bu amaç için de referans yöntem farede toksik etki ve nötralizasyon deneyidir (5,7,8).

Kültürden izole edilmiş *C. botulinum* suşu zenginleştirilmiş sıvı besiyerine ekilir, anaerob ortamda 35°C'de 5 gün inkübasyona kaldırılır. Daha sonra oluşan kültür filtre edilir. Antitoksin (monovalan tip A, B, E veya F) ile korunmuş ve korunmamış farelere kültür filtratı intraperitoneal yolla verilir. Monovalan antitoksin verilenlerden hangisinde fareler sağ kalmış ise *C. botulinum* toksin tipinin o olduğuna karar verilir (2,5,8,9).

Kültür filtratlarında toksin varlığı ayrıca ELISA ile araştırılabilir. ELISA'da kültür filtratının elde edildiği gün sonuç alınabilir. Ancak, bu test biyolojik aktiviteye sahip olan antijen ile olmayanı ayıramadığı için tanı değeri düşüktür (1,2,5).

Moleküler teknikler

Klinik örneklerden bakterinin toksin geninin varlığı PCR ile gösterilebilir. Bir günde sonuç alınır. Ancak genin saptanması bakterinin toksin üretiminin olduğu anlamına gelmediğinden (sessiz toksin genleri varlığı) böyle durumların da fare deneyi ile doğrulanması gerekmektedir (2,5,8,9,10,11).

Moleküler teknikler kültür izolatlarının epidemiyolojik tiplendirilmesi amaçları için de kullanılabilir.

Öte yandan biyoterör tehdidinde olası yollardan biri gıda ve suyun toksin ile kontaminasyonu diğeri de inhalasyonel toksin salınımı olduğundan muhtemelen vakalarda bakterinin (dolayısı ile genlerinin) gösterilmesine yönelik tekniklerden yararlanılamayacaktır.

Özetle; botulismus tanısı esasen öyküye ve klinik bulgulara dayanmaktadır; ancak tanının laboratuvarca doğrulanmasına gereksinim vardır.

Gıda kaynaklı botulismus şüphesinde serum, dışkı, kusmuk, mide içeriği ya da hastanın yediği yemekte botulinum toksininin tespiti ile tanı konur. Tüketilen gıda maddesi kalıntılarının kültüründen organizmanın izole edilmesi tek başına (diğer destekleyici laboratuvar verilerinin yokluğunda) botulismus için doğrulayıcı kanıt sağlamaz. Vakanın dışkısı, serumu veya şüpheli gıdada botulismus **toksini varlığının** gösterilmesi ise klinik tanıyı destekler (12).

Gıda kaynaklı botulismus şüphesinde dışkıdan, yara botulismusunda da yara kültürlerinden *C. botulinum*'un izole edilmesi kesin tanı koydurucudur. Zorunlu olmamakla birlikte bu izolatların da toksin üretimi gösterilebilir. ELISA ve moleküler yöntemler gibi testlerde alınan pozitif sonuçların ise fare deneyi ile doğrulanması gerekir.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Clostridium botulinum (klinik örneklerde toksinin gösterilmesi, kültürlerden bakterinin izole edilmesi)

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Güvenlik önlemleri

Örneklerin alınması sırasında

Botulismus şüpheli vakalardan örnek alma sırasında olası etkenden kaynaklanan özel bir güvenlik riski söz konusu değildir. Başlıca risk kan alma işlemi esnasında kan-kaynaklı patojenlerin (HIV, hepatit etkenleri) bulaşma riskidir. Kan alma, serum ayırma gibi işlemler yapılırken daima **eldiven** giyilmelidir. Ayrıca her türlü klinik örnek enfeksiyöz kabul edilmeli ve örnekleri alırken, taşıırken standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Potansiyel dökülme-saçılma için 1:10 sulandırılmış çamaşır suyu (taze hazırlanmış) el altında bulundurulmalıdır.

Örneklerin laboratuvara girişinden itibaren

Botulismus şüpheli vakalardan alınmış örneklerin incelenmesi asgari BGD2 laboratuvar şartlarında, sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde gerçekleştirilir. Laboratuvara gelen örneklerin paketinden çıkarılması bu amaç için ayrılmış bir alanda sınıf-IIA BGK içinde yapılmalıdır. Bu işlem tercihen 2 personel tarafından yapılmalıdır: biri kayıt tutarken diğeri eldiven giymiş olarak paketi açmalı ve örnek kaplarında kırılma, sızdırma, kontaminasyon bulgusu olup olmadığını kontrol etmelidir (2). Örneklerle birlikte gelen bilgi formlarına eğer herhangi bir bulaşma söz konusu ise, formlar BGK içine konur ve bu sırada hastaya ait bilgiler yeni, temiz bir form kağıdına aktarılır.

Potansiyel dökülme-saçılma için 1/10 sulandırılmış çamaşır suyu (taze hazırlanmış) el altında bulundurulmalıdır. Dökülme-saçılma olması halinde, dökülmenin üzeri *bakteriyi inaktive etmek* için 1/10'luk çamaşır suyu ile kaplanmalı ve 20 dk beklenmeli; takiben *toksini nötralize etmek* için 0.1M sodyum hidroksit kullanılmalı ve 20 dk beklenmeli, temizlenmelidir. Ancak akılda tutulmalıdır ki; 1/10'luk çamaşır suyu vejetatif bakterileri inaktive eder, spor formuna etkili değildir. Bütün enfeksiyöz atıklar laboratuvar içinde otoklavlanarak dekontamine edilmelidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen botulismustan şüpheleniyorsa, örnekleri laboratuvara göndermeden önce, laboratuvarın gerekli hazırlığı yapabilmesi için laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle hakim olmalı ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

2.3. Örnekleme için gerekli malzeme, donanım

- Serum örnekleri için - antikoagülansız, jelli, vakumlu serum tüpleri
- Toksin araştırılacak diğer klinik örnekler için (dışkı, kusmuk, eksuda, debride edilmiş doku vb.) - steril, geniş ağızlı, vida kapaklı kaplar olmalıdır. Steril, vida kapaklı plastik idrar kapları örnek toplamak için kullanılabilir.
- Kültür yapılmak üzere alınacak örnekler için - anaerob transport besiyeri
- Biyolojik materyal taşıma kabı - üçlü paketlenme yapmak üzere

3 Botulismus tanısı için örneklerin alınması

- Örnekler klinik bulguların başlangıcında, olabildiğince erken alınmalıdır.
- Örnekler mümkün olduğunca antiserum tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır.

3.1. Dışkı, kusmuk

- Dışkı en önemli tanı örneğidir.
- Hastalığın erken döneminde hasta ile işbirliği yapılabilirken dışkı alınmalıdır.
- Hastanın dışkı veremediği durumlarda ise lavman sıvısı veya gastrik içerik örnekleri alınır. Toksini çok fazla sulandırmamak adına, mümkün olduğunca az miktarda steril su ile lavman yapılmalıdır.
- Hastanın hastanede iken kusması halinde bu kusmuk örneği de alınıp gönderilmelidir.
- Mümkün olduğunca 25-50 g örnek alınmalıdır. Örnekler;
 - (a) Toksin varlığını araştırmak için bir steril örnek kabına konur.
 - (b) *C. botulinum* kültürü için anaerob taşıma besiyerine konulmalıdır (13).

3.2. Serum

- Kan dolaşımında toksin varlığını araştırmak için serum incelenir.
- Hastadan, antikoagülansız jelli, vakumlu tüpe yaklaşık 20-30 mL kan (10-15 mL seruma denk gelir) alınmalıdır.
NOT: Antikoagülan içeren tüplerde alınmış kandan toksin testlerinin çalışması tercih edilmez; sonuçlar hatalı çıkabilir (2).
- 3 mL'den az serum ile sonuç alınamayabilir, ancak küçük çocuklarda bu miktar yeterli olabilir.
- Alınan kandaki eritrositlerin hemoliz olmaması için özen gösterilmelidir.

3.3. Gıda örnekleri

- Hastanın en son yediği gıdalardan toksin araştırılır.
- Bu gıdaların mümkünse orijinal paketiyle; değilse yeterli miktarda (en az 10 g) steril sızdırmaz kaplara konarak laboratuvara gönderilmelidir.
- *C. botulinum* için kültür yapılması isteniyorsa örnek anaerob taşıma besiyerine konulmalıdır.

3.4. Yara botulismusu

- Eksuda, debride edilmiş dokular veya eküvyon ile sürüntü örnekleri alınır anaerob taşıma besiyerine konur.
- Yara botulismusunda hastanın serumu da toksin varlığını araştırmak üzere laboratuvara gönderilir.

3.5. İnfant botulismusu

- Tanı için dışkı ve serum örnekleri alınmalıdır.

3.6. Post-mortem örnekler

- Yaklaşık 10 mL kalp kanı alınmalı, eğer hemolize uğramamış ise serumu ayrıldıktan sonra serum referans laboratuvarına gönderilmeli.
- Ayrıca, mide ve barsak içeriği, varsa enfekte yara materyali de alınıp gönderilmelidir.

4 Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi

- Botulismus şüpheli olguların örnekleri ve varsa şüpheli gıda örnekleri dahil, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu ilgili laboratuvarlarına gönderilir!
NOT: Adresler için bkz. sayfa 10 "Referans Laboratuvar"
- Örnek göndermeden önce, ilgili laboratuvar bilgilendirilmeli, laboratuvarın hangi örnekleri kabul ettiği ve nasıl gönderilmesi gerektiği sorulmalıdır.
- **Toksin araştırılması için** alınmış tüm örnekler kapakları sıkıca kapatılmış, sızdırmaz tüpler/kaplar içinde olmalı; kuru buz içinde gönderilmelidir.
- ***C. botulinum* kültürü** için alınmış örnekler anaerob taşıma besiyerine konmuş, kapakları sıkıca kapatılmış sızdırmaz kaplar içinde olmalı ve oda ısısında gönderilmelidir.
ÖNEMLİ NOT: Anaerob kültürü yapılacak örnekler kesinlikle buz içinde taşınmamalıdır. Klinik örneklerin soğukta tutulması veya dondurulması, toksin saptanmasını etkilemez; ancak *C. botulinum* izolasyonunda başarısızlığa yol açar.

- Örneklerin gönderilmesinde *paketleme ve taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (14) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 "Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi").

5 Raporlama

- Örneklerden biyolojik yönden aktif nörotoksinin gösterilmiş olması botulismus tanısını doğrular.
- Referans laboratuvarından pozitif sonuç alınır alınmaz, klinisyene telefonla sonuç bildirilmelidir. Ardından yazılı bir rapor da gönderilmelidir.

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Hastaya, dışkıda toksin veya kültürü etkileyecek bir tedavi uygulanmış ise laboratuvarın bilgilendirilmesi gerekir. Örneğin myastenia gravis varlığında tedavi amacıyla ağızdan verilen antikolinesteraz, fare deneyinde dışkıda antijeni araştırırken deney sonuçlarını etkileyebilir.
- Toksik C. *botulinum* varlığını saptamak için bazı immünolojik temele dayalı teknikler veya moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Pozitif sonuç tanıyı destekler, ancak fare deneyi ile doğrulanmaları gerekir.

7 Referans Laboratuvar

Adres

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

www.thsk.gov.tr
Tel: 0312 565 5507

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı
Tüketici Güvenliği Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Merkez Tüketici Ürünleri Mikrobiyolojik Araştırma Laboratuvarları
(Su ve Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarları)
Refik Saydam Yerleşkesi,
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5154

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Botulismusun Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Capek P, Dickerson TJ. Sensing the deadliest toxin: technologies for botulinum neurotoxin detection. *Toxins (Basel)* 2010;2 (1):24-53.
- 2 Botulism in United States, 1899-1996: Handbook for Epidemiologists, Clinicians & Laboratory Workers. CDC. 1998. www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/botulism_manual.htm (son erişim tarihi: 16.12.2013)
- 3 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 Lindstrom M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2): 298-314.
- 6 Botulism. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/botulism.pdf> (son erişim tarihi: 31.03.2014)
- 7 Specimen collection and anaerobic culture techniques. In: Jausimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM, Wadsworth KTL, eds. *Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed. Star Publishing. Belmont, CA. 2002.
- 8 Solomon H, Lilly T. FDA Bacteriological Analytical Manual. Chapter 17, *Clostridium botulinum*. 2001. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm> (son erişim tarihi: 16.12.2013)
- 9 Cai S, Singh BR, Sharma S. Botulism diagnostics: from clinical symptoms to in vitro assays. *Crit Rev Microbiol* 2007;33(2):109-25.
- 10 Akbulut D, Grant KA, McLauchlin J. Development and application of real-time PCR assays to detect fragments of the *Clostridium botulinum* type A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborn and infant botulism. *Foodborn Pathog Dis* 2004;1(4):247-257.
- 11 Satterfield BA, Stewart AF, Lew CS, et al. A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the *Clostridium botulinum* toxin genes A, B, E and F. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 1):55-64.
- 12 Shiflett SL, Robinson-Dunn B, Luper D. Bioterrorism: Botulinum Toxin - *Clostridium botulinum*. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 16.5.1-16.5.3
- 13 Stevens DL, Bryant AE, Berger A, von Eichel-Streiber C. *Clostridium*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 834-857
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Sifilizin (*Treponema pallidum* enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-18
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Hastalığın önemi.....	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Klinik evreler	4
Mikrobiyolojik tanı	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma(lar)	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Sifilizin tanısında kullanılan teknikler.....	9
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	14
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	15
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	16
KAYNAKLAR.....	16

Kapsam ve Amaç

Sifiliz, sadece insanda patojen olan *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*'un etken olduğu sistemik bir hastalıktır. Başlıca cinsel yolla bulaşır. Ayrıca anneden bebeğe ya da kan transfüzyonu ile de bulaşabilir. Tedavi edilmediği durumlarda ileri evreleri söz konusudur (1).

Sifiliz, cinsel yolla bulaşması nedeniyle halk sağlığını yakından ilgilendirmektedir. Enfeksiyöz evrelerde olguların erken tanısı ve tedavisi ile hastalığın yayılması azaltılabildiği için kontrol programlarında laboratuvar tanısı önem kazanmaktadır.

Hastalığın mikrobiyolojik tanısında etkenin mikroskopik olarak gösterilmesi mümkün olmakla birlikte, tanıda sıklıkla serolojik testler kullanılır. Serolojik testler tarama, klinik tanı ve doğrulama veya tedaviye yanıtı değerlendirmek amacıyla kullanılabilirler. Serolojik tanıda esas olan nontreponemal testlerle yapılan tarama ve ardından sonucun treponemal testlerle doğrulanmasıdır (1,2).

Sifiliz tanısında serolojik yöntemler, özellikle nontreponemal testler, klinik laboratuvarlarda en yaygın çalışılan testler arasındadır. Nitekim ülkemiz genelinde rutin mikrobiyoloji laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun incelendiği bir çalışmanın sonuçları da laboratuvarların (n=510) %62.1'inde nontreponemal testlerin çalışıldığını, buna karşın treponemal testlerin laboratuvarların %15.1'inde yapıldığını göstermiştir. Karanlık alan incelemesinin ise, ankete katılanlar arasında sadece bir laboratuvarda yapıldığı dikkati çekmektedir (3).

Sifiliz ülkemizde bildirimi zorunlu bir hastalıktır (4,5).

Bu UMS belgesinde, sifiliz tanısında asgari laboratuvar gerekleri ve sorumluluklar ile doğru ve güvenilir tanının prensip ve tekniklerine dair bir rehber verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

FTA-ABS	Flourescent treponemal antibody absorbed
FTA-ABS DS	Flourescent treponemal antibody absorbed double staining
FITC	Fluorescein isothiocyanate
LAP	Lenfadenopati
RPR	Rapid plasma reagin
VDRL	Venereal disease research laboratory
TPPA	<i>Treponema pallidum</i> particle agglutination test
TPHA	<i>Treponema pallidum</i> hemagglutination test
USR	Unheated serum reagin
TRUST	Toluidine red unheated serum test

Genel Bilgi

Hastalığın önemi

Sifiliz hastalığının son 30 yılda tüm dünyada insidansında artış olmuş ve 2000'li yıllarda halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmiştir (1).

Gelişmekte olan ülkelerde hemen her zaman yüksek insidansa sahip olmuştur. Gelişmiş ülkelerde sorun daha çok düşük sosyoekonomik çevrelerde, cinsel aktif gençler ve genç yetişkinler arasında belirginleşmektedir. Gelişmiş ülkelerde ayrıca homoseksüel (özellikle HIV+ olan) erkeklerde insidansın arttığı belirtilmektedir (1,2).

Cinsel yolla bulaşan diğer enfeksiyonlar için de geçerli olduğu gibi; sifilizin toplumda yayılma eğilimi HIV'in yayılma eğiliminin bir göstergesi olarak kabul edilebilir (2).

Konjenital vakalara yol açması ve latent seyri, hastalığın sürveyansı için diğer önemli gerekçelerdir. Enfeksiyöz evredeki kişilerin erken tanısı ve tedavisi ile hastalığın yayılması, konjenital sifiliz ve geç dönem komplikasyonların morbiditesi azaltılabilir (1,2). Bu nedenle kontrol programlarında laboratuvar tanısı önem kazanmaktadır.

Mikroorganizmanın özellikleri

Treponema cinsi içinde insan patojeni olan 4 tür *T. pallidum* subsp. *pallidum* (sifiliz etkeni), *T. pallidum* subsp. *pertenue* (yaws etkeni), *T. pallidum* subsp. *endemicum* (endemik sifiliz etkeni) ve *T. carateum* (pinta etkeni) mevcuttur. Bu türler morfolojik ve antijenik olarak benzer oldukları için bulaşma yolları dahil epidemiyolojik ve klinik özellikler esas alınarak ayırt edilirler.

T. pallidum subsp. *pallidum* 0.1-0.5 × 5-20 µm boyutlarında bir spirokettir. Işık mikroskopu ile görülemez, Gram boyası ile boyanmaz. Kültürde üretilemez (6).

Klinik evreler

Etken mikroorganizma enfekte mukoz membranlar ya da hasarlı deriden direkt temas ile bulaşır.

Sifiliz enfeksiyonunda şüpheli temastan ortalama 3 ay (genellikle 2-6 hafta) sonra temas bölgesinde çoğunlukla tek ve ağrısız bir ülser gelişir.

Primer evre olarak adlandırılan bu evrede ülsere çoğunlukla bölgesel lenfadenopati eşlik eder. Ülser 2-5 haftada kendiliğinden iyileşir. Bunu 6 hafta-6 ay arası süren asemptomatik dönem takip eder. Ardından yaygın döküntüler, saç dökülmesi, kondiloma lata, generalize lenfadenopati gibi belirti ve bulguların geliştiği **sekonder evre** gelir. Sekonder evrenin lezyonları 2-6 haftada kendiliğinden iyileşir. Bunu yıllar ya da hayat boyu sürebilecek asemptomatik **latent dönem** takip eder. Hastaların %65'i bu evrede kalır.

Geç dönem sifiliz ise tedavi edilmemiş hastaların %10-30'unda gelişmekte ve *benign sifiliz*, *kardiovasküler sifiliz* ve en sık olarak da *nörosifiliz* olarak karşımıza çıkmaktadır. Nörosifilizde menenjit, periferik nöropati, meningovasküler beyin lezyonları ve psikiyatrik hastalıklar gelişmektedir (2,7).

Mikrobiyolojik tanı

Sifilizde immün yanıt dış membran lipoproteinleri tarafından uyarılır. *T. pallidum* konakta bağlandığı lipit hücreleri *in-vivo* immünojen haline dönüştürür. İmmün yanıt özgül olan ve olmayan antikorların oluşumuyla gelişir. Özgül antitreponemal IgM yanıtı 2. hafta, IgG yanıtı ise 4. haftanın sonunda oluşur (6).

İmmün yanıt HIV enfeksiyonundan ve tedaviden etkilenir (gecikebilir, azalabilir, artabilir). Özgül olmayan antikor yanıtı ve IgM düzeyi etkin tedavi sonrası düşer. Özgül IgG yanıtı hayat boyu sürer (2,6).

Semptomların geliştiği dönemde antikor yanıtı mevcuttur. Primer evrede şankr oluşumundan 1-4 hafta sonra serum antikorlarının gelişmesi beklenir. Sekonder evre ve enfeksiyöz kabul edilen erken latent evrede (ilk 1 yıl) tüm serolojik testler reaktiftir. Geç latent dönemde ise nontreponemal testlerin düzeyi düşmeye başlar. Geç dönem sifilizi olan hastaların %30 kadarında nontreponemal testler negatif, treponemal testler pozitifdir (2).

Genital ülser veya sekonder sifiliz evresi döküntülü lezyonlarından **karanlık alan mikroskopisinde** veya **DFA** ile mikroorganizmanın görülmesi mümkündür. Ancak tanıda sıklıkla serolojik testler kullanılır. Serolojik testler tarama, klinik tanı ve doğrulama veya tedaviye yanıtı değerlendirmek amacıyla kullanılabilirler.

Serolojik tanıda esas olan nontreponemal testlerle yapılan tarama ve ardından sonucun treponemal testlerle doğrulanmasıdır (8,9,10).

Sifiliz serolojik testlerinin kullanım endikasyonları şöyle sıralanabilir (1,2,11):

- Asemptomatik bireylerde (ör., gebeler)
- Cinsel yolla bulaşan enfeksiyon riski olan bireylerde
- Kan, organ/doku donörlerinde
- HIV ile enfekte kişilerde
- Genital ülser varlığında
- Kronik nörolojik hastalık varlığında
- Nontreponemal tarama testlerinde reaktif sonuç alındığında
- Enfeksiyonun aşamasını ve tedaviye yanıtı takip amacıyla.

Nörosifilizde BOS bulguları; total proteinde artış (50 mg/dL), mononükleer hücre artışı (>5 hücre/mL), VDRL pozitifliği olarak beklenir. VDRL pozitifliği oldukça özgüldür, negatifliği ise nörosifilizden uzaklaştırmamaktadır. Serum VDRL pozitifliği ile birliktelik beklenir. BOS FTA-ABS pozitifliği oldukça duyarlı ancak özgüllüğü düşüktür (8).

Konjenital sifiliz için, seropozitif anneden doğan bebek, anne son 4 haftada tedavi almamışsa değerlendirilmelidir. Bebeğin serumunda nontreponemal antikor titresi annenin 4 katı kadardır. Özgül IgM varlığı tanıda yardımcıdır. Bebeğin serumunda IgG varlığı 12. aya dek sürmektedir (8,12).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma(lar)

Etken mikroorganizma *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*'dur.

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Bu UMS'de bahsi geçen organizmalar ile ilgili işlemler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmelidir. Klinik örnekler enfeksiyöz kabul edilmeli, örnekleri alırken ve preparat hazırlarken daima standart önlemler uygulanmalıdır. (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Güvenlik uyarısı! *T. pallidum* ciltteki herhangi bir açıklıktan girebilir ve enfeksiyona neden olabilir. Şankırdan örnek alınırken **daima** eldiven giyilmelidir.

Eğer örneği alırken enjektör kullanılıyorsa, enjektör iğnelerinin kapakları asla yeniden kapatılmaz! İğneler ve kullanılmış lamlar **kesici-delici atık** kabul edilir ve kesinlikle kesici-delici atık kutusuna atılırlar! Diğer biyolojik kirlilerin bulunduğu torbalara atılmaları halinde torbayı deler ve ciddi enfeksiyöz risk doğururlar!

Kan alma işlemi ve serolojik testler yapılırken personele kan-kaynaklı patojenlerin (özellikle HIV ve hepatit etkenleri) bulaşma riski yüksektir. Kan alma, serum ayırma gibi işlemler sırasında mutlaka eldiven giyilmelidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntemleri uygulamadan önce amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Sifiliz kuşkulu vaka şankır veya makulopapüler döküntü varsa hastanenin laboratuvarına yönlendirilmelidir. Sifiliz şüpheli lezyondan eksuda örneğinin alınması işlemi **kesinlikle** deneyimli bir Mikrobiyoloji Uzmanı veya klinisyen tarafından gerçekleştirilmelidir.

Testlerin prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Sifiliz tanısı için örneklerin seçimi, özellikleri, alınması, gönderilmesi ve laboratuvara kabul kriterleri ile ilgili ayrıntılı bilgi için "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"ne ve "KLIMUD Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Genital Sistem Örnekleri Rehberi"ne başvurulmalıdır.

Ayrıca bazı önemli noktalara aşağıda tekrar dikkat çekilmiştir:

- **Mikroskopik inceleme örnekleri** - Sifiliz şüpheli lezyondan (primer şankr) eksuda örneği veya makulopapüler lezyonlardan epidermal ve mukozal örnekler, lenf nodundan aspirasyon sıvısı ve diğer mikroskopik inceleme örnekleri bu grup örneklerdir. Karanlık alan mikroskopisi veya DFA testi için kullanılabilirler (8).
 - (a) Eğer **karanlık alan mikroskopisi** yapılması isteniyorsa -amaç hareketli treponemaları görmek olduğu için- örnek alınır alınmaz preparat hazırlanması ve en fazla 20 dk içinde incelenmesi gerekir. Spiroketin hareketi tanıda önem taşıdığı için örneğin transportu uygun **değildir!** Bu nedenle örneğin mutlaka **laboratuvar**da alınması gerekir. Örnek alma yöntemi ve incelenmesi "Karanlık Alan Mikroskopisi (UMS-B-TP-08)" belgesinde verilmiştir.
 - (b) Eğer klinik laboratuvara çok yakın ise ve 10 dk içinde laboratuvara ulaşım incelenebilecekse, örnek klinikte alınabilir.
 - (c) İdeal örnek kırmızı küre içermeyen seröz nitelikte sıvılardır.
 - (d) Hastaya antibiyotik başlanmadan önce örnek alınması önem taşır.
 - (e) Aktif lezyonlar primer, sekonder ve erken konjenital sifilizde yüksek miktarda treponema içerdiğinden uygun örneklerdir.
 - (f) Ağız içi ve anorektal bölge lezyonlarından örnek alınmamalıdır. Florada bulunabilen apatojen treponemalar hatalı yoruma neden olabilir.
 - (g) Eğer **DFA-TP** yapılacaksa örnek klinisyen tarafından alınabilir. Bunun için önceden laboratuvardan DFA lamı istenmiş olmalıdır. Seröz sıvı (eritrosit, diğer mikroorganizma ve doku artıklarını içermeyen) lam üzerine alınır, havada kurutulur ve üzerine saf metanol konarak fikse edilir, uygun bir lam kutusu içinde laboratuvara gönderilir. Ağız içi ve anorektal örnekler DFA-TP için uygun örneklerdir. DFA yöntemi karanlık saha mikroskopisine göre daha duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Patojen olan ve olmayan treponemaları ayırt edebilir (8,12).
- **Serum** – Serolojik testler için hastalığın herhangi bir evresinde alınabilir (13).
 - (a) Hastadan steril sarı ya da kırmızı kapaklı tüpe en az 5 mL kan alınmalıdır. Tüp hafifçe 5-6 kez alt üst edilir.
 - (b) Oda sıcaklığında 20 dk-1 saat beklenir.
 - (c) Takiben 1000 ×g'de 10 dk santrifüj edilerek serum ayrılır. Serum steril pipet ucu kullanılarak steril vida kapaklı bir tüpe ayrılmalıdır.
 - (d) Tüpün üzerine hastaya ait bilgiler, örnek alma saati vb. yazılarak etiketlenir ve taşımaya hazırlanır. Taşınmaya kadar buzdolabına kaldırılmalı; +4°C'de, 48 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
 - (e) Örneğin alındığı noktada serumu ayırma imkanı yoksa +4°C'de olmak kaydıyla tam kan gönderilebilir; ancak bu kan en fazla 24 saat içinde laboratuvara ulaşmış olmalıdır. Kan dondurulmaz!
 - (f) Serumun laboratuvara ulaşması >48 saat ise örnek -20°C'ye veya -70°C'ye kaldırılmalı; çözülmeden kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır.

- **BOS** - Nörosifiliz kuşkusunda serolojik incelemeler veya PCR için kullanılır. BOS'un kan ile kontamine olmadığından emin olunmalıdır. Gözle görülemeyecek kadar az kontaminasyon olsa bile, eğer hasta kanında antikör varsa, BOS nörosifiliz için yalancı pozitif çıkabilir (11).
PCR isteniyorsa BOS alınır alınmaz dondurulmalı ve kuru buzda taşınmalıdır.
- **Plasenta ve göbek kordonu** – yenidoğanda konjenital sifiliz tanısında DFA-TP veya histokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak treponemalar gösterilebilir (2).
- Örneklerle birlikte laboratuvara ön tanının, hastaya ait bilgilerin, ayrıca şüpheli temas veya semptomatik eşle ilişki öyküsünün yer aldığı bir "bilgi formu" mutlaka gönderilmelidir. Hastaya ait uygun bir bilgi formu düzenlenmiş örnekler ile hemolizli ya da lipemik serum örnekleri (hatalı sonuç verebilir) veya kan ile kontamine BOS örnekleri incelemeye kabul edilmez. Biyolojik materyal taşıma şartlarına uygun gönderilmemiş örnekler de laboratuvara kabul edilmezler.

Kit / Reaktif

- Non-treponemal testler için – RPR, VDRL kitleri
- Treponemal testler için – TPHA, TPPA, FTA-ABS kitleri
- DFA-TP testi için – Piyasada kiti mevcut değildir (Radolf, 2011). Ancak, FITC-işaretli konjugatlarını ticari olarak temin etmek mümkündür. Adsorbe poliklonal konjugatlar veya monoklonal konjugatlar tercih edilmelidir. Ayrıca, pozitif ve negatif kontrol lamları gerekir. Pozitif kontrol lamları FTA-ABS antijeni veya enfekte tavşan testis dokusundan yayma hazırlanarak elde edilebilir. Negatif lamalar yıkanmış nonpatojen Reiter kültürlerinden yayma hazırlanarak elde edilebilir.
- İmmersiyon yağı,
- SF, steril, izotonik
- Saf metanol

Diğer gereç, donanım

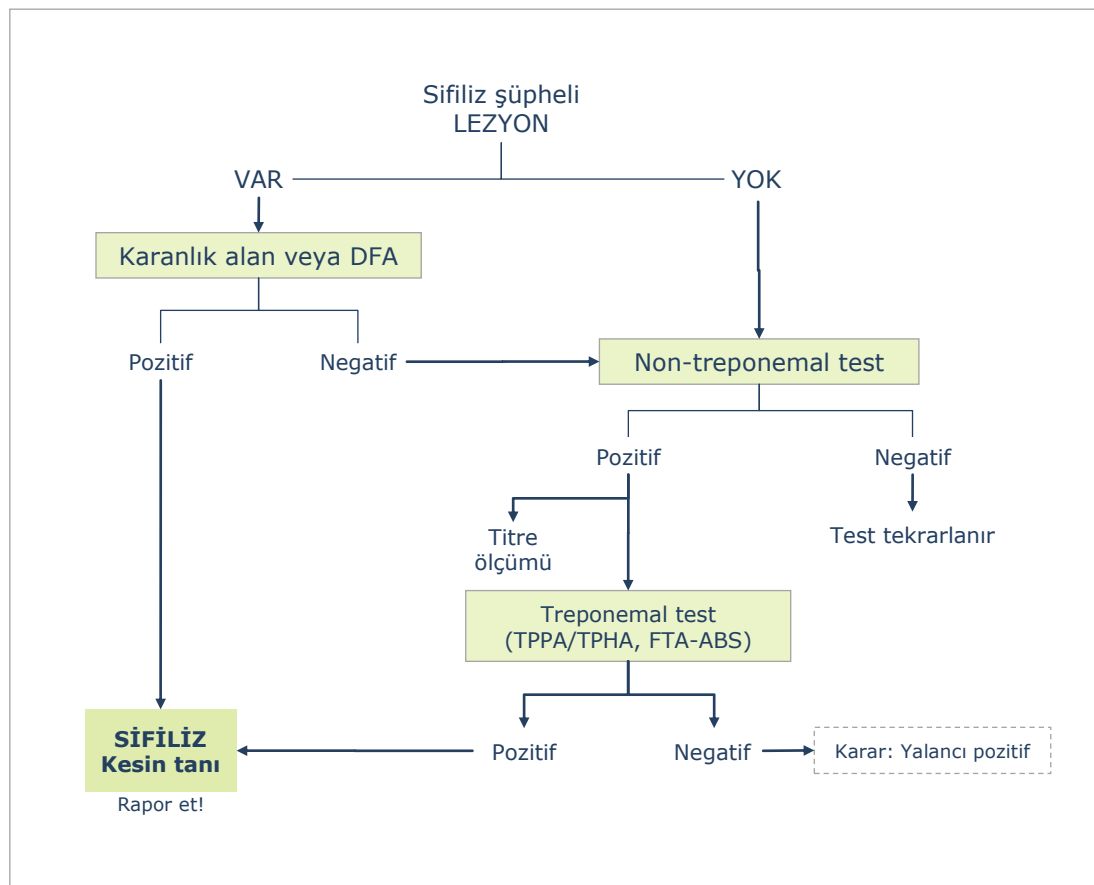
- Karanlık alan mikroskobu - 10× düşük kuru, 40× yüksek kuru ve 100× immersiyon objektifleri ve 10× oküleri olan; karanlık-alan kondansatörü (tek veya çift yansıtıcı) bulunan.
- Floresan mikroskop - 10× düşük kuru, 40× yüksek kuru ve 100× immersiyon objektifleri ve 10× oküleri olan; FITC konjugat için uygun filtreler (365 nm eksitasyon ve 450 nm emisyon filtreleri ve 490 nm eksitasyon ve 510 nm emisyon filtreleri) ile iyi çalışır durumda
NOT: 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (14).
- Lamlar (önceden temizlenmiş; 25×75 mm) ve lameller (22×22mm)
- DFA lamları, lam taşıma kabı
- Pastör pipeti, steril (opsiyonel olarak enjektör ve iğne)
- Eldiven, kesici-delici atık kabı

2.4. Kalite kontrol

- Her zaman kitin kontrol serumları (veya örnekleri) kitle beraber verilen prosedüre göre teste dahil edilmelidir.
- Laboratuvar aynı zamanda kendi kalite kontrol serumlarına veya örneklerine sahip olmalı ve testlere dahil etmelidir.
- Bütün kalite kontrol sonuçları, kitin lot numarası, tarih ve diğer bilgilerle birlikte kalite kontrol kayıt defterine kaydedilmelidir.
- Mikroskoplar belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Kalibrasyon için kullanılmış optikler mikroskobun üzerinde olmalıdır. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (14).

3 Sifilizin tanısında kullanılan teknikler

3.1. Erken sifilizde rutin tanı akış şeması



Şekil 1. Erken sifiliz için önerilen rutin inceleme akış şeması (6)

3.2. Mikroskopi

- Etken mikroorganizma çok ince olduğu için standart boyalarla boyanmaz. Genital ülser veya sekonder sifiliz evresi döküntülü lezyonlarından karanlık alan mikroskopisinde veya DFA ile mikroorganizmanın görülmesi mümkündür (8,10).

Karanlık alan mikroskopisi

- Karanlık alan mikroskopisi şüpheli lezyonlardan yapılan taze preparatlara uygulanabilir. Bu preparatlarda hareketli treponemaların görülmesi "kesin tanı" bulgusudur.
- Ağız içi ve anorektal bölge lezyonlarından örnek alınmamalıdır. Bu bölge florasında bulunan apatojen treponemalar yanlış pozitifliklere neden olabilmektedir (testin yapılışı için bkz. UMS, B-TP-08).

DFA-TP testi

- DFA-TP testi patojen olan ve olmayan treponemaların ayırımını sağlayabildiği için tüm örneklerle (ağız içi ve rektal bölge örnekleri dahil) uygulanabilir. Ayrıca konjenital sifiliz tanısında göbek kordonu doku örneği DFA-TP ile incelenebilecek uygun bir örnektir (8,10).
- DFA-TP testi karanlık alan mikroskopisi ile birlikte veya onun yerine kullanılabilir. Testin önemli bir avantajı preparatların -karanlık alan testinin aksine- hemen incelenmek zorunda olmaması; hastadan alınan örneklerin lam üzerinde kurutulup sabitlendikten sonra uzak mesafelere incelenmek üzere gönderilebilmesidir.
- Piyasada DFA-TP için bir kit mevcut değildir; ancak poliklonal veya monoklonal antikorlarla konjuge edilmiş FITC konjugatlar bulunur.
 - (a) Monoklonal konjugat patojen treponemalara özgüdür ve ağız içinde veya rektal bölgede bulunan lezyon eksudalarının incelenmesinde kullanılabilir.
 - (b) Poliklonal konjugat ise çapraz reaksiyonları elimine etmek için non-patojen treponemalarla absorpsiyon sonrası kullanılabilir. Absorbe edilmemiş poliklonal konjugat ağız içi ve rektal bölge örneklerinde kullanılmamalıdır! Absorbe edilmemiş poliklonal konjugat *sadece* genital ülser incelemesinde kullanılabilir.
- Lezyon eksudaları veya dokulardan hazırlanan preparatlarda floresan boyalı treponemaların görülmesi "kesin tanı" bulgusudur.

3.3. Seroloji

- Sifiliz enfeksiyonunun tanısında temel olarak serolojik testler kullanılır. Bir diğer ifade ile sifilizde tanı yaygın bir şekilde serolojiye dayanır.
- Testlerin yorumlanması hastalığın evresine, tedavi verilip verilmemesine bağlı olarak oldukça kompleks profiller sergileyebilir. Testler yorumlanırken hastalığın tahmini evresi, tarama yapılan grubun özellikleri (seks çalışanları, evlilik öncesi ve gebelikte uygulanan taramalar, kan bankacılığı) önem taşır.

- Serolojik testler 2 gruba ayrılır (11,15):
 - (a) özgül olmayan nontreponemal testler ve
 - (b) özgül treponemal testler.
- Nontreponemal testler (VDRL, RPR, USR ve TRUST); kardiolipin, lesitin ve kolesterolü antijen olarak kullanan flokülasyon testleridir.
- Treponemal testler ise antijen olarak *T. pallidum*'u kullanırlar. Bu testler TPHA, Serodia TPPA, FTA-ABS, FTA-ABS DS, EIA ve immunoblot teknikleri olarak sıralanabilir.
- Sifiliz tanısında biri nontreponemal diğeri treponemal olmak üzere en az **2 testin birlikte kullanımı** önerilmektedir. Nontreponemal testlerin sonucunun treponemal testlerle doğrulanması gereklidir (2).

Nontreponemal testler (2,15,16)

- Primer sifiliz döneminde şankr oluşumundan sonra 1-4 hafta içinde pozitif hale gelirler. Sekonder dönemde en yüksek titreye ulaşırlar.
- Duyarlılığı yüksek tarama testleridir.
 - (a) Pozitif sonuçlar **titre edilerek** verilmelidir.
 - (b) Pozitif sonuçlar **doğrulanmalıdır**.
 - (c) Titre takibinin aynı laboratuvarında, aynı yöntemle yapılması uygundur.
- Bu testler hastalığın aktivitesi ve tedaviye yanıtın takibinde kullanılırlar. Titrede en az 2 dilüsyonluk azalma tedavi başarısı yönünden anlam taşır.
- BOS incelemesinde nontreponemal testlerden sadece VDRL kullanılabilir. Nörosifilizde BOS'da **VDRL pozitifliği** oldukça özgüdür. Ancak VDRL negatifliği nörosifilizden uzaklaştırmaz. Eş zamanlı serum VDRL/RPR sonucunun da pozitif olması beklenir.
- BOS'un incelenmesinde RPR kesinlikle kullanılmaz. Test serum ve BOS için eş zamanlı çalışılmalıdır.
- Bütün test reaktifleri ve örnekler 23°C-29°C arası oda sıcaklığında çalışılmalıdır. Bu sıcaklıkların altında yanlış negatif veya zayıf pozitif sonuçlar alınabileceği gibi, üstündeki sıcaklıklarda da hatalı pozitif sonuçlar alınabilir (16).

Treponemal testler (1,2,11,15)

- Özgüllüğü yüksek doğrulama testleridir. Treponemal testler sifiliz geçirmiş kişilerde erken dönemde tedavi edilmiş olguların dışında hayat boyu reaktif kalırlar. Tedaviye yanıtı takipte kullanılmazlar.
- **TPHA** testinde *T. pallidum* (Nikol suşu) ile kaplanmış duyarlı koyun eritrositleri kullanılır. Antikor varlığında aglütinasyon oluşur.
- **TPPA** (Serodia TPPA) testinde *T. pallidum* antijenleri ile sensitize edilmiş jel partikülleri kullanılır. Antijen-antikor reaksiyonu aglütinasyon şeklinde gözlenir. Antikor yoksa aglütinasyon görülmez.

- **FTA-ABS** bir indirekt floresan antikor testidir. Absorbsiyon basamağı özgüllüğü artırır. Antijen-antikor reaksiyonu konjugat (FITC ile işaretli anti-human globulin) ile görünür hale getirilir. Subjektif bir testtir; floresan mikroskobu ve uygulayıcının deneyimli olmasını gerektirir. Standardize etmekte zorluklar olabilmektedir. Ancak uyumsuz sonuçları tekrar değerlendirmek için elde tutulmasında fayda vardır. Erken dönem sifilizde en duyarlı testtir.
- **EIA** treponemal IgM ve IgG düzeylerini saptar. TPHA ve FTA-ABS kadar duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Değerlendirme sonuçları objektiftir. Otomatize sistemler oldukları için iş yükü fazla olan laboratuvarlar için uygundur. 'Immune-capture' EIA formatı rekombinan antijenleri kullanan daha duyarlı ve yeni sistemlerdir. Sadece IgM saptayan kitlerde mevcuttur. Konjenital sifiliz ve primer dönemde yüksek duyarlılığa sahiptir.
- **Western-blot** (immunoblotting) doğrulama testi olarak önerilmiştir. FTA-ABS ile benzer duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. IgM varlığını saptayarak konjenital sifiliz tanısında kullanılabilir. Değerlendirme için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Tablo 1: Sifiliz tanısında kullanılan serolojik testlerin klinik evrelere göre duyarlılık durumu

Serolojik testler	Duyarlılık (%)	
	Erken dönem (primer, sekonder)	Geç (geç latent ve tersiyer)
Nontreponemal testler	70-100	60-98
Treponemal testler	50-85	97-100

Kutu 1. Sifiliz tanı testlerine örnekler

RPR testi

- Ampcor Technologies, Inc., Denville, NJ
- Arlington Scientific Inc., Springville, UT
- Baxter Healthcare Corp., Miami, FL
- Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD
- Fisher, Pittsburg, PA
- Immunosticks, Inc., Ocean, NJ
- Remel Microbiology Products, Lenexa, KS

FITC-işaretli tavşan ya da insan anti-*T.pallidum* globulini

- Baxter Healthcare Corp., Miami, FL
- Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD
- Biologic products section, CDC, Atlanta, Georgia

FTA-ABS kiti

- Hemagen Diagnostics, Inc., Columbia, MD
- Zeus Scientific, Inc., Raritan, NJ

VDRL test kiti

- Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL
- Cenogenics Corp., Morganville, NJ

TPHA kiti

- Biokit, S.A., Barcelona, İspanya

TP-PA kiti

- Fujirebio America, Fairfield, NJ

Syphilis-G EIA kiti

- Bio-Rad laboratories, Hercules, CA
- Wampole Laboratories, Cranbury, NJ

- FTA-ABS IgG ve Western-blot erken dönem sifilizde en duyarlı yöntemlerdir.
- FTA-ABS IgM ve Western-blot konjenital sifiliz tanısında kullanılırlar
- Nörosifilizde BOS FTA-ABS pozitifliği oldukça duyarlı ancak özgüllüğü düşüktür.
- Klinik ile uyumsuz durumlarda 2-3 hafta sonra yeni bir serum örneği alınarak testler tekrar edilmelidir.
- **Hızlı testlerin** kullanımı hastalık prevalansının yüksek olduğu kaynakları sınırlı ülkelerde avantajlı bulunmaktadır. Prevalansın düşük olduğu ülkelerde ise pozitif-prediktif değerleri düşük kalmaktadır. Farklı ticari markalarda 20 civarında test mevcuttur. Hiçbiri FDA onayı almamıştır. Duyarlılıkları %85-98, özgüllükleri %93-98'dir (9).
- Kutu 1'de piyasada bulunan çeşitli sifiliz tanı testleri listelenmektedir.

3.4. Moleküler

- Tanıda PCR kullanılabilir. Nörosifilizde az sayıda olan treponemal ürünlerin saptanmasında önemli olduğu bildirilmektedir (1,12).
- Konjenital sifilizde serolojik testlerin yorumlanmasının zor olduğu koşullarda da yardımcıdır.
- PCR, 47 kDa geninden hazırlanan primer ve proplarla yapılır.
- Bu amaçla kullanıma hazır ticari kitler mevcut değildir.

3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Sifiliz şüphesinde tanı veya doğrulama amaçları için örneklerin testleri yapabilen bir laboratuvara veya Referans laboratuvara gönderilmesi gerekir.
- Şankr veya makulopapüler döküntü varsa ve hastanenin laboratuvarı karanlık alan mikroskopisi veya DFA-TP yapamıyorsa vaka bu koşulları sağlayan en yakın laboratuvara (genellikle bir Üniversite Hastanesi ya da Eğitim Araştırma Hastanesi laboratuvarı) yönlendirilmelidir. DFA-TP için vakanın gönderilmesi yerine, hastadan örneğinin alınması, DFA lamına sabitlenmesi ve testi yapabilecek uzaktaki bir laboratuvara gönderilmesi mümkündür. Sabitlenmiş lamalar güvenli bir şekilde paketlenmelidir; 24 saate kadar oda sıcaklığında gönderilebilirler.
- Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları nontreponemal testler ile pozitif buldukları vakalara ait örnekleri, treponemal testler ile doğrulanmak üzere (eğer kendi laboratuvarlarında yapamıyorlarsa) bu testleri yapabilen en yakın laboratuvara veya Referans laboratuvara göndermelidirler. Hastanın özel durumu özellik isteyen incelemelerin yapılmasını gerektiriyorsa (FTA-ABS IgM, Western blotting vb.) Halk Sağlığı Müdürlüğü ile bağlantı kurulmalı ve örnekler Müdürlük kanalıyla Referans laboratuvara gönderilmelidir.
- Teste alınmadan önce serum en fazla 5 gün buzdolabında saklanabilir; daha uzun süreler için örnek -20°C'ye veya <-70°C'ye kaldırılmalıdır.

- Serum örnekleri 48 saate kadar +4°C'de uzak bir laboratuvara gönderilebilir. Laboratuvara ulaşması >48 saat ise örnek -20°C'ye veya -70°C'ye kaldırılmalı; kuru buzda laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Test için beklediği süre içinde serum örneklerinin tekrarlayan dondurma-çözme işlemlerinden kaçınılmalı; gerekiyorsa dondurulmadan önce örnekler yeterli sayıda alikota ayrılmalıdır.
- PCR için BOS hemen dondurulmalı, kuru buzda (-70°C) laboratuvara gönderilmelidir.
- Sifiliz şüphesinde bütün klinik örnekler biyolojik materyal taşıma şartlarını karşılayacak şekilde *paketlenmeli ve taşınmalıdır* (17). Kuru buzda taşıma şartları dahil, ayrıntılı bilgi için "UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi"ne başvurulması önerilir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Karanlık alan mikroskopisi test sonucu:
"Tipik *Treponema* morfolojisinde hareketli bakteriler görüldü" şeklinde rapor edilir.
Karanlık alan mikroskopisi sadece genital bölge lezyonları için rapor edilmelidir. Ağız içi ve anorektal bölge lezyonlarına karanlık alan mikroskopisi yapılmamalı, sonuç rapor edilmemelidir. Genital bölge lezyonlarının taze preparatlarda hareketli treponemaların görülmesi "**kesin tanı**" bulgusudur! (bkz. Şekil 1)
- DFA-TP test sonucu:
"Tipik patojen *Treponema* morfolojisinde, floresan veren bakteriler saptandı" şeklinde rapor edilir.
Monoklonal veya absorbe edilmiş poliklonal konjugat kullanılmış olması koşuluyla Lezyon eksudatları veya dokulardan hazırlanan preparatlarda floresan boyalı treponemaların görülmesi "**kesin tanı**" bulgusudur!
- RPR test sonucu pozitifliği *mutlaka* titrasyon yapıldıktan sonra rapor edilmelidir. Herhangi bir reaktivitenin (en zayıf reaktivitenin varlığı dahil) görüldüğü en yüksek dilüsyon rapor edilmelidir. RPR sonuçlarının kantitatif raporlanması için örnek yaklaşım Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 2. RPR test sonuçlarının kantitatif raporlanması (16).

Dilüsyonsuz (1:1) serum sonucu	Dilüsyon yapılmış serumda sonuç				Rapor
	1:2	1:4	1:8	1:16	
Rm veya R	N	N	N	N	Reaktif, dilüsyonsuz (1:1)
R	R	N	N	N	Reaktif, 2 dilüsyon veya 1:2 veya R2
R	R	R	Rm	N	Reaktif, 8 dilüsyon veya 1:8 veya R8

N, nonreaktif; R, reaktif; Rm, minimal reaktif.

NOT 1: Antilipoidal antikorlar aynı zamanda, otoimmün bir hastalık veya damar içi ilaç kullanımı gibi başka nedenlerden kaynaklanan doku hasarına yanıt olarak da üretilebilirler. Sifiliz tedavisini takiben titrenin 4 kat (2 kat dilüsyon) düşmesi tedavinin başarılı olduğunu gösterirken, dört kat artış tedavi başarısızlığı veya yeniden enfeksiyonu gösterir. Tedaviyi takiben titrede azalma gözlenmemesi (artış da olmaması) her zaman tedavi başarısızlığını göstermez ve hastanın klinik durumu ile birlikte düşünülmelidir.

NOT 2: Dilüsyon yapılmamış serum ile prozon meydana gelebilir. Prozon antikor fazlalığına bağlı olarak görülen bir durumdur ve flokülasyon gözlenmemesine neden olur. Böyle örnekler kaba negatif veya çok zayıf pozitif görünürler ve mutlaka serum dilüsyonları (kantitasyon) yapılarak test edilmelidirler. Ayrıca klinisyen sifiliden şüphelendiği halde nontreponemal test negatif bulunuyorsa prozon reaksiyonunu dışlamak için mutlaka kantitasyon yapılmalıdır (16).

- Treponemal testlerde test sonucu kit talimatında belirtilen şekilde yorumlanmalıdır (8,13). Sonuçlar "reaktif (pozitif)" veya "nonreaktif (negatif)" şeklinde raporlanır. Bir treponemal test ile elde edilen sonuç yorumlanmasında belirsizlik arz ediyorsa örnek yeniden test edilmeli veya hastadan alınacak yeni bir örnek ile test tekrarlanmalıdır. Belirsizlik devam ediyorsa başka bir treponemal test kullanılarak (ör., FTA-ABS) örnek incelenmelidir.
- Sifiliz bildirimi zorunlu bir hastalıktır (4,5). Sonuçlar "kesin tanı"ya işaret ediyorsa vakaların ilgili birimlere bildirilmesi zorunludur. Bildirim klinisyenin sorumluluğudur. Laboratuvarın sonuçları en kısa sürede klinisyene rapor etmesi bildirimlerin en kısa sürede yapılabilmesi bakımından önem arz etmektedir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Testlerin seçiminde hastalığın insidansı, hastalığın tahmini evresi, tarama yapılan grubun özellikleri, laboratuvarın iş yükü, testlerin yapılma süresi, maliyeti, pozitif hasta başına düşen maliyet gibi faktörler göz önünde bulundurulması gereken unsurlardır (1,2,7,11,15).
- Karanlık alan mikroskobu için gerekli olan karanlık alan kondensatörü rutin laboratuvarlarda sıklıkla bulunmamaktadır.
- DFA-TP testi ülkemizde yaygın kullanım alanı bulmamıştır.
- Serolojik testlerden (treponemal ve nontreponemal) sadece tek bir grubun kullanılması tanıda yetersiz kalmaktadır. Hastalığın tanısı için karar mutlaka her iki grup testin de kullanılmasına dayanmalıdır.
- Nontreponemal testlerin yalancı pozitif olduğu durumlar söz konusudur: sistemik lupus eritematozis, sıtma, enfeksiyöz hepatitler, enfeksiyöz mononükleoz, lepra, brusella, milliye tüberküloz, gebelik, diğer treponemal enfeksiyonlar (yaws, pinta).
- Nontreponemal testlerin aynı laboratuvarda yapılıp, sonuçların kantitatif olarak verilmesi önem taşır.

- RPR titresi VDRL titresinden biraz daha yüksek çıktığından takipte aynı yöntemin kullanılması uygundur.
- Nontreponemal testler sekonder dönemde en yüksek titreye ulaşırlar. Bu dönemde nonreaktif saptanırlarsa prozon fenomeni akla gelmeli serum dilüe edilerek çalışılmalıdır.
- Nontreponemal testlerin latent dönemde veya tedavi sonrasında negatifleşmesi beklenir, ancak bazı hastalarda uzun süre bazen hayat boyu düşük titrede pozitiflik sürebilir. Bunun dışında nontreponemal testlerin yalancı pozitifliği toplumda %1-3 arasındadır. Bu durumda antikor titresi genellikle $<1/4$ 'dür. Ancak düşük titreler sifilizi dışlamaz ve sıklıkla latent ve geç dönem sifilizde de düşük titreler saptanabilir.
- Klinik ile uyumsuz durumlarda 2-3 hafta sonra yeni bir serum örneği alınarak testler tekrar edilmelidir.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Sifilizin Mikrobiyolojik Tanısı) ayrıca aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve ilave bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-08	Karanlık alan mikroskopisi
UMS, P-TP-01	Mikroskop kalibrasyonu (oküler mikrometre ile)
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Tramont EC. *Treponema pallidum* (Syphilis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th ed., Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia. 2010.
- 2 Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR* 2010;59 (RR-12):26-40.
- 3 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye'de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 4 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 6 Radolf JD, Pillay A, Cox DL. *Treponema* and *Brachyspira*, human host-associated spirochetes. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 941-963.
- 7 Zanto SN. Changing algorithms in syphilis laboratory diagnosis. *Clinical Microbiology Newsletter* 2010;32(8):59-64.

- 8 Pope V. Laboratory diagnosis of syphilis, introduction. In: Garcia LS, Isenberg D (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 11.5.1.1 - 4
- 9 Tucker JD, Bu Jin, Brown LB et al. Accelerating worldwide syphilis screening through rapid testing: a systematic review. *The Lancet Infect Dis* 2010;10:381-386
- 10 Pope V. Laboratory diagnosis of syphilis, direct fluorescent-antibody test for *Treponema pallidum*. In: Garcia LS, Isenberg D (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 11.5.2.1 - 2
- 11 Hicks CB. Diagnostic testing for syphilis. UpToDate, Nisan 2012.
www.uptodate.com/contents/diagnostic-testing-for-syphilis (son erişim tarihi: 20.12.2013)
- 12 Herremans T, Kortbeek L, Notermans DW. A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:495-501
- 13 Pope V. Laboratory diagnosis of syphilis, Serodia *Treponema pallidum* particle agglutination test. In: Garcia LS, Isenberg D (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 11.5.4.1 - 3
- 14 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 15 Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. *CID* 2010;51:700-708.
- 16 Pope V. Laboratory diagnosis of syphilis, rapid plasma reagin test. In: Garcia LS, Isenberg D (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3rd ed., ASM Press, Washington D.C. 2010, 11.5.3.1 -4
- 17 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Brusellozun Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-19
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	4
Mikroorganizmanın özellikleri.....	4
Hastalığın dağılımı ve önemi.....	4
Klinik özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma(lar)	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Bruselloz tanısında kullanılan teknikler	9
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	14
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	15
EKLER.....	16
Ek-1 Brusellozun serolojik tanısında temel prensipler	16
Ek-2 Rose Bengal aglütinasyon testi	19
Ek-3 Serum aglütinasyon testi (SAT)	20
Ek-4 2-Merkaptoetanol (2-ME) testi	23
Ek-5 Coombs testi	24
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	26
KAYNAKLAR	26

Kapsam ve Amaç

Bruselloz, enfekte hayvanların dokularına temas veya ürünlerinin tüketilmesi ile bulaşan ve dünya üzerinde bilinen en yaygın zoonozdur (1). Hastalık bir insan ve hayvan sağlığı sorunu olmasının yanı sıra sosyoekonomik kayıplara da yol açan ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Gelişmiş ülkelerde hayvan brusellozunun kontrol altına alınmasının da bir sonucu olarak görülme sıklığı önemli ölçüde azalmıştır. Ülkemiz ise bruselloz için halen endemik bir bölgedir.

Etken *Brucella* spp, kontamine aerosoller ile kolay yayılabilmesi ve enfeksiyöz dozun çok küçük olması nedeniyle biyoterör ajanları arasında da sınıflanmaktadır. Aynı özellikleri yüzünden laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar ile en yüksek sıklıkta ilişkili organizmalardan biridir. Bu nedenle bruselloz tanısında kültüre dayalı işlemler dünyada giderek BGD3 laboratuvarlarla sınırlanmıştır (2,3).

Bruselloz ülkemizde bildirimi zorunlu bir hastalıktır (4,5). Ancak bildirimlerin önemli ölçüde beklenen vaka sayılarının altında olduğu tahmin edilmektedir. Hastalığın kesin tanısı mikrobiyolojik incelemeye dayandığı için etkili bir süreyans laboratuvar tanısının doğruluğu, güvenilirliği kadar yeterince yaygın olması ile de yakından ilişkili görünmektedir (1,6,7).

Nitekim ülkemiz genelinde klinik mikrobiyoloji laboratuvar kapasitesinin mevcut durumunun değerlendirildiği bir çalışmanın sonuçlarına göre bruselloz en yaygın incelenen hastalıklardan biridir (8). İncelenen 510 laboratuvarın %71.7'si bruselloz tanısı için en az bir yöntem kullanmakta ve yılda toplam 1 milyon üzerinde örneği test etmektedirler. Laboratuvarların yarısından fazlasında STA testi, yaklaşık dörtte birinde de *Brucella* kültürü yapılabilmektedir. Ancak STA veya kültür yapabilen laboratuvarların %15-20'sinde tanının *geçerli* prosedürlere dayanmadığı dikkati çekmektedir (8). Vakaların bir kısmına bu nedenle hatalı tanı konduğu varsayılırsa hem hasta yönetiminin hem de enfeksiyon kontrolüne yönelik çabaların olumsuz yönde etkileneceği tahmin edilebilir. Dolayısı ile uygun bir prosedürün el altında olması doğru tanının yaygınlaşmasını teşvik edeceği için önemli görünmektedir. Bu UMS belgesinde de, bruselloz tanısında asgari laboratuvar gerekleri ve sorumluluklar ile doğru ve güvenilir tanının prensip ve tekniklerine dair bir rehber verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

CT	Coombs testi (anti-insan immünglobülin test)
ÇA	Çikolata agar
KKA	%5 Koyun kanlı agar
ME	Merkaptoetanol (2-Merkaptoetanol; 2-ME)
Merkaptan bazlı test	2-ME ve rivanol
Rivanol	Diamino 6,9 etoksi akridin
PDA	Fenilalanin deaminaz
SAT	Standart aglütinasyon testi

Genel Bilgi

Mikroorganizmanın özellikleri

Brucella türleri küçük ($0.5-0.7 \times 0.6-1.5 \mu m$), hareketsiz, kapsülsüz, kültürlerde yavaş üreyen, zorunlu aerob, karbonhidratları fermente etmeyen, oksidaz ve üreaz pozitif, kokobasil formunda gram negatif bakterilerdir. *Brucella* spp retiküloendotelyal sistemin fakültatif hücre içi parazitidir. Çeşitli besiyerlerinde üreyebilirler ve 24-48 saat içinde çoğunlukla düz, küçük koloniler meydana getirirler. Bazı pürüklü koloni oluşturan varyantlar da mevcuttur (1,2,6,7).

Hastalığın dağılımı ve önemi

Bruselloz, Latin Amerika, Afrika, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'da endemik düzeyde olmak üzere dünyada yaygın görülen bir enfeksiyondur.

Aslen bir zoonozdur ve insan enfeksiyonlarına çoğunlukla 4 tür sebep olmaktadır; bu dört türden *B. abortus* sığır ve bizonlarda, *B. melitensis* koyun ve keçilerde, *B. suis* domuz, karibu ve ren geyiklerinde, *B. canis* ise köpek, tilki ve çakallarda hastalık etkenidir (2). *B. abortus* geniş bir coğrafik yayılım göstermesine rağmen, *B. melitensis* insanda en çok hastalığa neden olan türdür. İnsanda *B. canis* enfeksiyonu oldukça nadirdir (1,2,6,7,9).

İnsanlar başlıca pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi ya da mesleki nedenlerle -kan, plasenta, atılmış fetus, uterin sekresyonlar gibi- enfekte hayvan dokularına direk temas (veteriner, çiftçi, kasap vb.) veya kontamine aerosollerin inhalasyonu sonucu enfekte olurlar (1). Nitekim vakaların en büyük kısmı iki hasta popülasyonuna toplanmıştır: birincisini *Brucella* spp ile kontamine pastörize edilmemiş veya pişirilmemiş süt ve süt ürünlerini tüketen bireyler, diğer grubu da mesleği gereği hayvanlarla uğraşan ve enfekte hayvanlara temas eden kişiler oluşturmaktadır.

Aerosol haldeki *Brucellaların* biyolojik suç veya terör amaçlarıyla salınımına en uygun ve en büyük olasılıkla kullanılabilecek form olduğu tahmin edilmektedir. Silah haline getirilmiş ilk biyolojik ajan, 1954 yılında ABD tarafından biyolojik-savaş programı kapsamında, *B. suis* olmuştur (2). *Brucella* türlerini potansiyel biyoterör ajanı yapan diğer önemli neden enfektif dozunun çok düşük olmasıdır ki aynı nedenle organizma klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için de ciddi bir tehlike kaynağıdır. Nitekim, *Brucella* türleri Risk grubu 3 organizma olarak sınıflanmıştır. Şüpheli klinik örneklerden *Brucella* kültürlerinin asgari BGD2 standartlarını karşılayan mikrobiyoloji laboratuvarlarında ve mutlaka bir sınıf-IIA biyogüvenlik kabini içinde yapılmasının zorunlu olduğu anlamında yorumlanmalıdır (6,7,9).

Klinik özellikleri

İnkübasyon periyodu oldukça değişkendir; 5 gün ila 2 ay arasında olabilir. Klinik olarak akut bir seyir gösterebileceği gibi kronik bir hastalık tablosu da görülebilir. Akut hastalıkta başlıca belirtiler dalgali karakterde bir ateş, baş ağrısı, yoğun terleme, halsizlik, kas ağrıları ve kilo kaybı olabilir.

Vakaların %50 kadarında abdominal ağrı, kabızlık, ishal ve kusma gibi gastrointestinal semptomlar vardır.

Kronik form karaciğer, kemik ve dalakta gelişen lezyonlarla daha ziyade miliyer tüberküloza benzer. Çeşitli organların kronik lokalize enfeksiyonları da meydana gelebilir. En sık rastlanana (%20-60) sakroileit olmak üzere, kemik ve eklem komplikasyonlarıdır. Orşit, epididimit gibi ürogenital tutulum (%20) ve nörolojik tutulum (%5) görülebilir.

Tedavi ile olguların çoğu iyileşir; ancak bazen hastalık nüks edebilir. Vaka ölüm oranı %5'den azdır ve başlıca tedavisiz endokardit sonucu gelişir.

Laboratuvar tanısı

Brusellozun tanısı başlıca mikroorganizmanın klinik örneklerden izolasyonuna veya serolojik yöntemlerle antikor yanıtının gösterilmesine dayanmaktadır.

Bakteri başta kan ve kemik iliği kültürleri olmak üzere çeşitli klinik örneklerin kültürlerinden izole edilebilir. Kültür altın standarttır ve izolasyon gerçekleştiğinde kesin tanı koydurur. Ancak kültürlerin duyarlılığı, örneğin alındığı evre (akut ya da kronik hastalık), kullanılan besiyeri sistemi (otomatik ya da konvansiyonel kan kültürü sistemi vb.), örnek almadan önce antibiyotik başlanmış olup olmadığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (7). Kültür sonucu üreme olmaması tanıyı dışlamaz. Özellikle kan kültürlerinde izolasyon 6 haftaya kadar gecikebilmektedir. Akut dönemde kültürlerden izolasyon oranı %40 ila %90 arasında iken kronik ya da fokal enfeksiyonda, komplike vakalarda bu oran %5-20 kadar düşüktür. Kemik iliğinden izolasyon oranı kan kültürlerine nazaran %15-20 daha yüksek olabilir. Yine otomatize kan kültürü sistemlerinden izolasyon oranları konvansiyonel bifazik Ruiz-Castaneda şişelerinden daha yüksektir. Lizis-santrifügasyonun da konvansiyonel şişelerden yüksek oranda izolasyona imkan sağladığı gösterilmiştir ve otomatize sisteme sahip olmayan laboratuvarlara önerilmektedir (7,9,10).

Kültürün bu dezavantajları nedeniyle serolojik tanı önem kazanmaktadır ve brusellozun tanısı yaygın bir şekilde serolojiye dayanmaktadır. Seroloji sonuçları ideal olarak *Brucella* spp enfeksiyonunu takiben gelişen antikor yanıtının evrimi bağlamında yorumlanır. Önce IgM ortaya çıkar ve bunu 10-14. günlerde IgG'nin yükselişi takip eder. Tedavinin etkinliğini de antikor düzeyleri üzerinden izlemek mümkündür: iyileşme ile titrelerin giderek azaldığı görülür. Eğer titrelerde ısrarlı bir kalıcılık varsa bu klinisyen için fokal komplikasyon, kronik enfeksiyon veya relaps bakımından uyarıcı bir durumdur. Ancak %20'ye varan oranlarda başarı ile tedavi edilmiş veya asemptomatik bireylerde de antibiyotik titreleri yüksek kalabilmektedir (7).

Mevcut serolojik testler ile vakaların %95'ten fazlasına kesin bir tanı konulması mümkündür, ancak testlerin uygun kombinasyonlar halinde kullanılması gerekir. Bu kombinasyonlar basitçe, aglütinan antikorları (total IgM, IgG ve IgA) saptayan bir test (Rose Bengal ve STA; *Brucella* tam hücre antijeni) ile genellikle geç evrede gelişen non-aglütinan antikorları saptayan bir testin (Coombs-IgG veya ELISA; *Brucella* sonik ekstraktları, lipopolisakkarit veya protein antijenleri) kullanılması şeklinde özetlenebilir (7,10,11). *B. canis* ve *B. ovis* pürütlü koloni formunda bulundukları ve diğer *Brucella* spp ile çapraz reaksiyona giren antijenleri paylaşmadıkları için neden oldukları enfeksiyonların tanısı majör dış membran proteinlerine karşı antikorların saptanmasını gerektirir (7).

Yakın zamanlarda 18-24 saate sonuç veren, hızlı ve kolay uygulanabilir bir 'immunocapture' aglütinasyon testi uygulamaya girmiş olup, Coombs testi ile karşılaştırılabilir duyarlılıktadır. Endemik bölgelerde veya salgınlarda sahada yaygın (tarama amaçlı) kullanım için bir immünokromatografik 'dipstick test' de geliştirilmiştir. Bu test, basit, hızlı, kullanımı ve yorumlanması kolay ve yüksek bir duyarlılığa (>%90) sahiptir (7). Brusellozun tanısında moleküler yöntemler de başarıyla kullanılmaktadır (12).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma(lar)

Brucella abortus, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis* ve nadiren yeni tanımlanmış türler.

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Bruselloz rapor edilen en yaygın laboratuvar kaynaklı enfeksiyondur. Laboratuvar personeli büyük olasılıkla kültürlerle doğrudan temas, kültürlerin koklanması ya da aerosol üreten işlemler dolayısı ile enfekte olmaktadır. Bakterinin enfektif dozu çok düşüktür. *Brucella* spp içerdiği düşünülen klinik örnekler asgari BGD2 laboratuvar şartlarında ve **mutlaka** sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde işlenmeli; daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır. Kültürlerde *Brucella* üretilirse, işleme BGD3 laboratuvarlarda devam edilmelidir. Kullanılmadığı sırada bütün plaklar sızdırmazlık sağlanacak şekilde (ör., Parafilm ile) sarılmalıdır (2).

Yüzey dekontaminasyonu için çamaşır suyu (1/10 sulandırılmış, taze hazırlanmış) kullanılmalıdır. Laboratuvarın içinde otoklav bulunmalı, tüm kültürler işi bittikten sonra hemen otoklavlanmalıdır.

Serolojik tanı BGD2 laboratuvarında gerçekleştirilebilir. Serum/plazma örnekleri ile çalışılırken en ciddi risk personele kan-kaynaklı patojenlerin (hepatit virüsleri, HIV) bulaşma riskidir. Serum/plazma ayırma işlemi ve test yapılırken **daima** eldiven giyilmelidir (ayrıca bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen brusellozdan şüpheleniyorsa **kültür için** örnekleri laboratuvara göndermeden önce, *yüksek laboratuvar-kaynaklı enfeksiyon riski nedeniyle*, laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Bu kurallar -kültür için- bütün tanımlama aşamalarında **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir.

Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Bruselloz tanısında örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serum - Serolojik tanı için kullanılır; "kesin" tanısı için çift serumda titre artışının gösterilmesi önemli olduğundan akut faz örneği alındıktan 10-14 gün sonra ikinci serum örneği de gönderilmelidir.
- Kan kültürü için kan örneği - Bruselloz tanısında kültür için kan öncelikli örneklerden biridir. Mümkünse ateşin ilk yükselmeye başladığı evrede alınmalıdır. Antibiyotik başlamadan önce ve ateşin yükselme evresinde alınmış 3 örnek (1 set) yeterlidir; on dakika içinde en az 2 farklı venden toplam 24-30 mL kan alınır ve üç şişeye her birine 8-10 mL olacak şekilde dağıtılır; böylece 1 kan kültür seti hazırlanmış olur. Antibiyotik başlanmışsa 48 saat içinde 2 set örnek alınmalıdır. <10 yaş çocuklardan 2-10 mL (iki şişeye); bebeklerden 1-1.5 mL (tek şişeye) kan yeterli olabilir. Kan alınır alınmaz tıpası dezenfekte edilmiş uygun kan kültürü şişelerine aktarılır ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılır.

NOT: Kan kültürü şişeleri asla buzdolabına konmamalıdır!

- PCR için kan – EDTA'lı veya sodyum sitratlı steril bir tüpe >1 mL alınır.
- Kemik iliği - EDTA veya sodyum sitrat içeren steril tüpe konur.
NOT: Kan ya da kemik iliği antikoagülanlı tüpe alındığında pıhtı oluşmaması için tüp hemen 5- 6 kez yavaşça alt üst edilerek karıştırılır.
- Doku biyopsi örnekleri (karaciğer, dalak, lenf nodu) – En az 2-3 g doku örneği (2-3 parça) SF içeren steril, vida kapaklı bir kapta gönderilir.
- Diğer vücut sıvıları (eklem sıvısı, apse aspiratı, BOS) – mümkünse >1 mL aspirat alınmalıdır. Aspirat steril bir tüpe aktarılır; enjektör içinde gönderilmez. Enjektörle nakli kaçınılmaz ise iğne atılır ve bir 'Luer-Lok' (enjektör ucu için sızdırmaz kapak) takılır. Enjektör **asla** üzerinde iğne ile laboratuvara gönderilmemelidir!

ÖNEMLİ: İnvaziv girişim gerektiren bütün örnekler aseptik şartlarda hekim tarafından alınmalıdır.

Besiyeri / Reaktif / Kit

- Serolojik testler için:
 - (a) Rose Bengal test kiti (*bkz.* Ek-2)
 - (b) SAT reaktifleri (*bkz.* Ek-3) - *Brucella* antijeni
 - (c) 2-Merkaptoetanol (ME) testi reaktifleri (*bkz.* Ek-4)

- (d) Rivanol – daha çok veteriner hekimlikte tercih edilir ve %0.04-1 rivanol solüsyonu ile serum sulandırılarak kullanılır.
- (e) Anti-insan immünglobülin - Coombs Testi için (bkz. Ek-5)
- (f) ELISA kiti – IgM, IgG ve IgA için piyasada kitler mevcuttur.
- Kan kültürü şişeleri/sistemi – Kan, kemik iliği ve vücut sıvıları için ticari hazır otomatik kan kültürü sistemi kullanılmalıdır. Agar ve sıvı fazlı bifazik Castaneda şişeleri ya da bir lizis-santrifügasyon sistemi de kullanılabilir.
- Primer ekimler ya da pasajlar için besiyerleri:
 - (a) Genel besiyerleri – %5 Koyun kanlı agar (beyin kalp infüzyon bazlı), Çikolata agar, MacConkey agar
 - (b) *Brucella* Agar
- Tanımlamada kullanılacak test reaktifleri
 - (a) Gram boyama reaktifleri (bkz. İlgili diğer UMS belgeleri)
 - (b) Katalaz, oksidaz, üreaz testleri için reaktifler, hızlı üre-fenilalanin deaminaz (PDA) diski vb. (bkz. İlgili diğer UMS belgeleri)
 - (c) *Brucella* antiserumu (polivalan) – izolatın tanımlanması için
- Uygun dezenfektan (%10'luk çamaşır suyu, taze hazırlanmış)

Diğer gereç, donanım

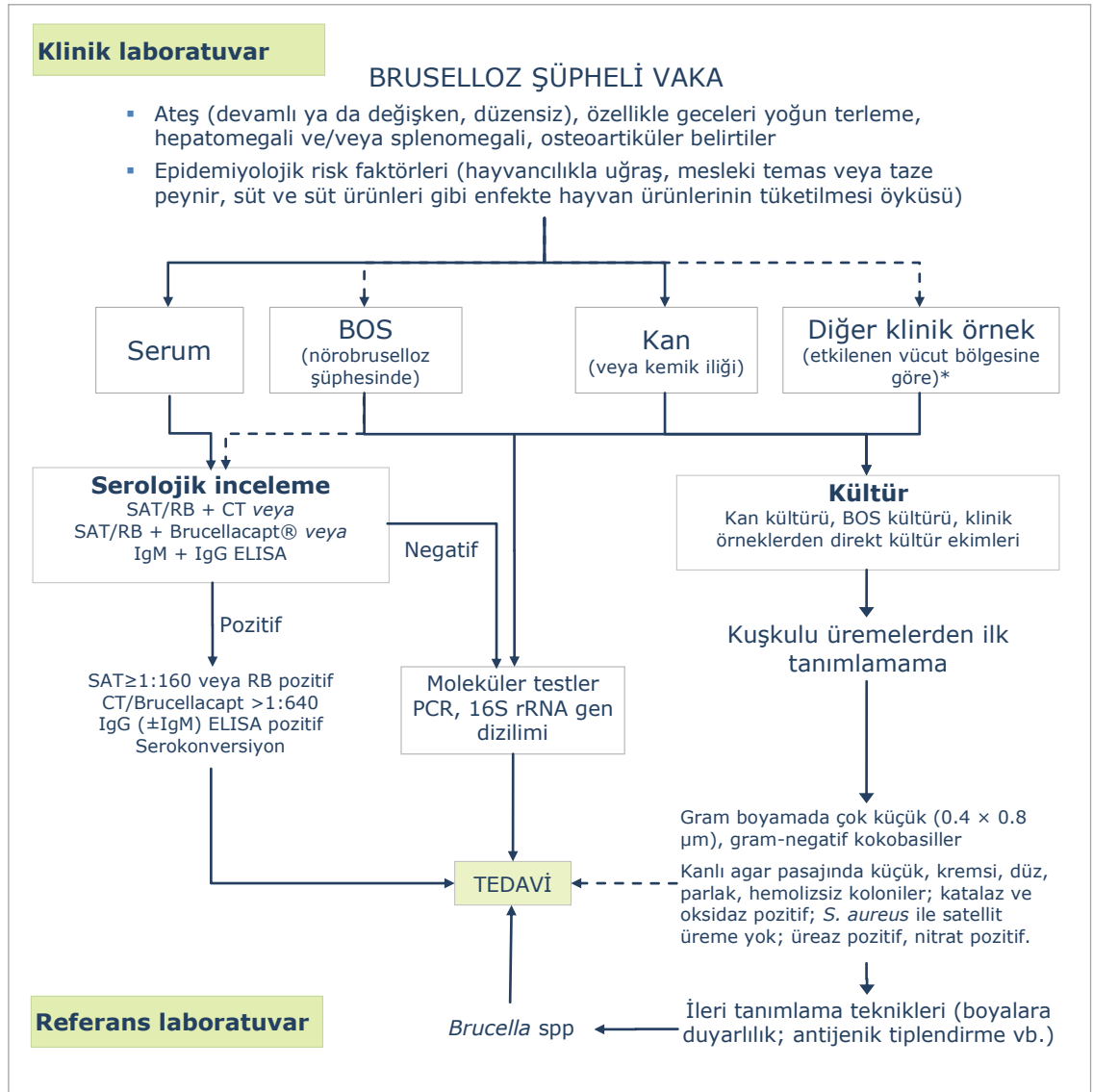
- Biyogüvenlik kabini, sınıf-IIA – eğer *Brucella* kültürü yapılıyorsa
- Bakteriyolojik tek kullanımlık öze – koloni pasajları vb. için
- Kan kültürü cihazı (opsiyonel)
- Pipetler (1-10 mL'lik) ve mekanik pipetleme ekipmanı
- ELISA okuyucu, yıkayıcı – ELISA çalışması yapılıyorsa
- Mikropipetler (10-200 µL) ve pipet uçları
- Santrifüj
- Su banyosu, 56°C
- İnkübatör, 36°C

2.4. Kalite kontrol

- Serolojik testler için; kullanılan kitlerin/reaktiflerin son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Her testte pozitif, düşük pozitif ve negatif kontroller kullanılmalıdır.
- Kültür yapılan laboratuvarlarda besiyerleri ve kültür reaktifleri pozitif ve negatif kalite kontrol suşları kontrol edilmelidir. Kontrol suşları;
 - (a) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
 - (b) *Brucella melitensis* 16M
 - (c) *Brucella abortus* 544
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalı, tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Bruselloz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Akış diyagramı



Şekil 1. Bruselloz şüpheli olgularda laboratuvar tanı algoritması (6,12).

SAT, serum aglütinasyon testi; RB, Rose-Bengal (test); CT, Coombs test

* karaciğer, lenf nodu gibi dokulardan biyopsi materyali, apse aspiratı, daha az sıklıkla periton sıvısı, plevral sıvı, sinoviyal sıvı ve diğer normalde steril vücut sıvıları

3.2. Seroloji

- Brusellozun tanısı yaygın olarak serolojiye dayanır. Kültürlerden etkenin izolasyonuna öncelikli bir alternatiftir. Çünkü seroloji klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın kullanıma uygun, görece kısa sürede sonuç alınabilen ve hastalığı doğrulayabilen bir araçtır. (Serolojik testlerle ilgili genel bilgi için bkz. Ek-1).

- Bruselloz için çok sayıda serolojik tanı testi mevcuttur. Bu testler başlıca bakterinin;
 - (a) tam hücre antijenlerinin kullanıldığı ve aglütinasyon prensibine dayalı testlerdir, *ya da*
 - (b) hücre duvarı lipopolisakkaritleri veya dış membran proteinleri gibi parçalanmış hücre ekstraktlarının antijen olarak kullanıldığı solid-faz immünoassaylerdir (ELISA, 'dipstick' test vb.).
- Tanı bu farklı sınıf testlerin bir kombinasyonu ile elde edilen sonuçların yorumuna dayanır ve kesin tanı koymak mümkündür (Şekil 1).
- Tanıda kullanılan testler aşağıda listelenmektedir:
 - (a) Rose Bengal (RB) testi – Bir tarama testidir. Boyalı antijen lam veya kart üzerinde serum ile karşılaştırıldığında 4 dakika içinde aglütinasyon gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilir. Kural olarak 4 dakikadan sonra meydana gelen pozitiflik değerlendirmeye alınmaz. Testin yapılışı Ek-2'de verilmiştir. Sonuç pozitif ise hasta serumu *Brucella* serum/standart aglütinasyon testine alınır.
 - (b) Serum aglütinasyon testi (SAT) – Standart aglütinasyon testi, tüp aglütinasyon testi veya Wright testi gibi adlarla da anılır. *Brucella* bakterileri hızlı antijen yapısı değiştirdiklerinden testte antijen olarak standart, iyi aglütinasyon veren kökenlerin S kolonilerinden üretilmiş (ısı ile öldürülmüş, fenollü) bakteri süspansiyonları kullanılmalıdır (13). Testin prensibi ve yapılışı Ek-3'de verilmiştir. Bu test ile brusellalara karşı total antikorların titresi belirlenir. IgG ve IgM ayrımı yapılamadığından, test sonucu pozitif bulunduğunda akut enfeksiyon tanısı için 2-ME tüp aglütinasyon testi veya ELISA yöntemine başvurulmalıdır. Yine ön tanısı kuvvetle olası bruselloz olan olgularda SAT'ın negatif bulunması halinde Coombs testi istenmelidir (10,11,12).
 - (c) 2-ME tüp aglütinasyon testi - IgG ve IgM ayrımının yapılması amacıyla kullanılır. Deney tüp aglütinasyon testinde serum dilüsyonu için SF yerine 2-ME kullanılması ile uygulanır. Stok 2-ME çözeltisinden 0.05M 2-ME (fosfat tamponlu tuzlu su içinde, taze) hazırlandıktan sonra test bu çözelti ile yapılır. Testin prensibi ve yapılışı Ek-4'de verilmiştir. 2-ME, IgM antikor yapılarındaki disülfid bağlarını parçaladığı için sadece IgG antikorlarının varlığının ortaya konulmasını sağlar (2,7,11). Rivanol de 2-ME gibi aynı amaçla kullanılabilir. Deneyde taze hazırlanmış %0.04'lük rivanol (distile suda) çözeltisi kullanılır (7,13,14).
 - (d) Coombs testi (CT) – Klinik olarak güçlü bir şekilde bruselloz olduğu düşünüldüğü halde yapılan aglütinasyon testlerinden negatif sonuç alınması brusellozda sık rastlanan bir durumdur. Olay antikor-antijen bağları oluşmasına rağmen aglütinasyonu engelleyen bir mekanizmanın varlığından kaynaklanmaktadır. Bunun ortaya konması bruselloz tanısı için kritik önemdedir. Böyle aglütinasyon vermeyen blokan (inkomplet) IgG'lerin gösterilmesinde kullanılan en iyi serolojik test Coombs testidir. Testin prensibi ve yapılışı Ek-5'de verilmiştir. Blokan antikorların varlığında Rose Bengal ve SAT negatif ya da düşük titreli pozitif sonuç verebilir (10,11,14,15).

- (e) ELISA - İmmünglobülin izotiplerini (IgM, IgG ve IgA) saptayabilen bir test olarak hem hastalığın tanısında ve evrenlenmesinde, hem de takibinde oldukça yararlıdır. ELISA, yüksek duyarlık ve özgüllükle immünglobülin izotiplerini hızlı bir şekilde (4-6 saat içinde) ve kantitatif olarak saptayabilmektedir. ELISA özellikle nörobruselloz kuşkusunda BOS incelemesinde tanıya yardımcıdır. ELISA yeterli sayıda vaka biriktiğinde çalışılan bir test olduğu için en çok bruselloz serosürveysinde tercih edilmektedir (10,17,14).
- Bruselloz şüphesinde SAT sonucunun negatif veya düşük titrede pozitif bulunduğu durumlar genellikle **kronik** bruselloz vakalarında gözlenmektedir. IgG ve IgA'nın brusellozda yüksek düzeylerde uzun süre kalabilmesi ve blokan antikorların aglütininelere göre hastalığın daha ileri dönemlerinde açığa çıkması nedeniyle bu nedenle özellikle kronik bruselloz şüphesinde SAT'a ek olarak CT veya ELISA testi de yapılmalıdır. Blokan antikorların akut brusellozda nadir olması nedeniyle CT'nin yapılması her zaman gerekli değildir (1,3,11,12,15).
 - CT testi yerine ticari 'immunocapture' aglütinasyon testleri de kullanılabilir (3,17).

3.3. Kültür

Güvenlik uyarısı! Kültürler **sadece** sınıf-IIA biyogüvenlik kabini mevcut olan laboratuvarlarda yapılabilir! Ekipman uluslararası geçerli güvenlik sertifikalarına sahip olmalı; ayrıca, düzenli aralıklarla (en az yılda bir veya kabin çalışma saatine göre önerilen aralıklarla) kabinin hava akımı uygunluk (hız, patern) testleri ile HEPA filtre kontrolleri sertifikalı mühendislik firmalarınca yapılmış olmalıdır.

BGK'ya sahip **olmayan** laboratuvarların *Brucella* kültürü yapmaları kabul edilemez!

- Kan, kemik iliği, BOS, eklem sıvısı veya apse aspiratı, karaciğer, dalak, ve lenf nodu biyopsileri gibi klinik örneklerin kültürleri yapılabilir ve bakterinin izolasyonu hedeflenebilir (bkz. Şekil 1).
- Apse veya doku örnekleri doğrudan KKA, ÇA, *Brucella* agar veya beyin-kalp infüzyon agara ekilebilirler. Bu plaklar 35–37°C'de, %5–10 CO₂'li ortamda en az 10 gün süre ile inkübe edilmelidirler (3,7,10).
- Kan, kemik iliği, BOS ve diğer vücut sıvıları otomatize kan kültürü şişeleri ile inkübe edilebilirler ve inkübasyon süresi bir haftadır. Ancak klinik olarak bruselloz şüphesi devam ettiği sürece inkübasyonun uzatılması önerilir. Konvansiyonel kan kültürü şişeleri için bu süre gerektiğinde 6 hafta kadar uzun olabilir. Bakterinin kan ve kemik iliğinden izolasyon oranını artırmak için lizis-santrifügasyon da kullanılabilir (2,3,7,9).
- Kan kültürü sistemi kullanılırken, negatif olarak sonuç verilmeden önce 2-3 gün aralıklarla -KKA, ÇA, *Brucella* agar veya beyin-kalp infüzyon agar gibi besiyerlerine- kör pasajlar yapılmalı ve her seferinde ayrıca Gram boyalı preparat hazırlanarak üreme değerlendirilmelidir (bkz. Şekil 1 ve 2).

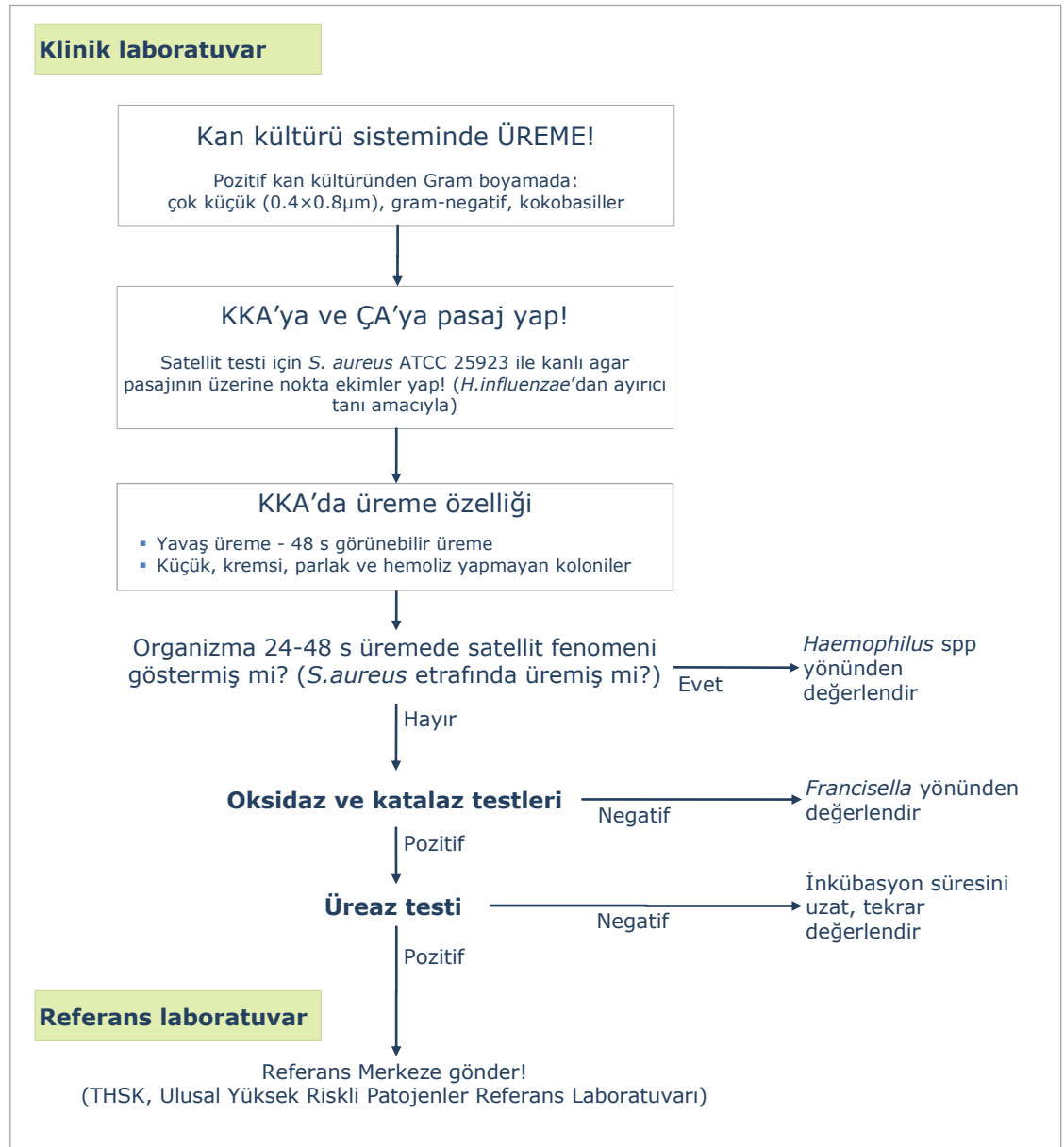
- Eğer Gram boyamada, çok küçük ($0.4 \times 0.8 \mu\text{m}$), gram-negatif kokobasiller gözleniyorsa *Haemophilus* türlerinden ayırıcı tanı amacıyla, KKA pasajı aynı zamanda satellit testi için kullanılmalı ve standart *S. aureus* suşu ile pasaj alanına nokta ekimler yapılmalıdır (bkz. Şekil 2).
- KKA'da *Brucella* spp üremesi 24 saatte tipik "toz benzeri" koloniler, 48 saatte noktasal, S-tipi, hemoliz yapmamış, pigmentsiz koloniler şeklinde görülür. Triptik soya agar ve serum dekstroza agar gibi kan içermeyen besiyerlerinde, 48 saatlik inkübasyondan sonra 0.5-1 mm çapında, yüzeyden kabarık, konveks, yuvarlak, şeffaf (translüsente), parlak yüzeyli S-tipi koloniler oluştururlar. *B.canis* R tipi koloniler oluşturur (10,16).
- *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis* oksidaz pozitifdir ancak *B.canis* ve *B.abortus*'un bazı kökenleri oksidaz değişkendir. Tüm *Brucella* türleri katalaz ve üreaz pozitifdir (3,6,9,16) (bkz. Şekil 2).
- Gram negatif bakteri tanımlamasında kullanılan ticari hazır kitler ile *Brucella* türlerinin hatalı tanımlanabileceği unutulmamalıdır. Ancak Vitek-2 otomatize sistemlerinde gram negatif tanımlama kartına ek olarak oksidaz testi sonucuna da bakarak *B. melitensis*'in tanımlandığı bildirilmiştir (12,16,17).
- Klinik olarak bruselloz şüpheli bir olgunun kültürlerinde izole edilen bakterinin tanımlanmasında uygulanacak olan protokol laboratuvarın biyogüvenlik düzeyine ve kapasitesine bağlıdır (16,17). İzolatın *Brucella* cinsi düzeyindeki hızlı tanısı hastalığın erken döneminde tedaviye başlanması ve böylece kronik seyir ve fokal komplikasyonların önlenmesi açısından çok önemlidir (bkz. Şekil 1) (6,9,16).
- Tür düzeyinde tanımlama ve/veya biyotiplendirme ve antijenik tiplendirme işlemleri sadece epidemiyolojik açıdan yararlıdır ve BGD3 (Referans) laboratuvarlarda yapılmalıdır (Şekil 2) (12,16,17).

3.4. Moleküler

- PCR, klinik ön tanının doğrulanması amacıyla kan, serum, kemik iliği vb. örneklerde uygulanabilir.
- PCR, etkenin direkt olarak gösterilmesi dışında tedaviye yanıt ve prognoz takibinde, hastalığın aktif ve inaktif ayırımında, relapsların erken tanımlanmasında, aşıya bağlı gelişen enfeksiyonların tanımlanmasında, moleküler tiplendirme (tür, biyovar tayini ve genotiplerin saptanması), antibiyotik (rifampin) direnç geni araştırılması gibi oldukça farklı amaçlarla kullanılmaktadır.
- Klinik örnekler dışında gıda (süt, peynir vb.) ve çevresel örneklerde de moleküler yöntemler kullanılabilir (6,7,12,17).

3.5. Mikroskopi

- Kandan yapılacak mikroskopik incelemelerde yöntemin duyarlılığı çok düşük olduğu için tanısal değeri yoktur. Ancak BOS, sinovial sıvı ve benzeri örneklerin Gram boyama preparatlarında; çok küçük, Gram negatif, silik boyanan kokobasiller, ince kum taneleri gibi görülebilir.



Şekil 2. Kan kültürlerindeki şüpheli üremelerden izolasyon, tanımlama ve Referans merkeze gönderme kriterleri için akış şeması (2,3).

3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Referans laboratuvar moleküler tiplendirme yöntemleri ile hastadan ve olası kaynaktan elde edilen *Brucella* izolatlarının epidemiyolojik ilişkisi olup olmadığını analiz edebilir, bir salgınla ilişkileri olup olmadığını ortaya koyabilir. Bu incelemeler halk sağlığı önlemleri için ilgili otoritelere yol gösterici sonuçlar üretir (9,3,12). Bu nedenle izolatlar tür düzeyinde tanımlama ve tiplendirme işlemleri için Referans laboratuvarına gönderilmelidir (bkz. Şekil 2).
- İzolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (18) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

- *Brucella* izolatlarını saklamak için "Suş Saklama Prosedürü" kullanılabilir (bkz. UMS B-TP-01). Pozitif klinik örnekler de -80°C'de saklanabilir. Pozitif serum örnekleri de internal serolojik test kontrolleri için saklanmalıdır.
- Ancak, *Brucella* spp izolatları biyoterör amaçları için kullanılabileceği için izolatların stok kültürleri sadece 'biosecurity' (biyoemniyet) gereklerini yerine getirebilen laboratuvarlarda bulundurulabilir. Yetkilendirilmemiş laboratuvarların *Brucella* izolatlarının stok kültürlerini saklamaları önerilmez.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

4.1. Seroloji

- Rose Bengal testi – Sonuç "pozitif" veya "negatif" olarak raporlanır.
- SAT sonuçları –
 - (a) Tek serum örneği varsa; antikor titresi verilir ve $\geq 1/160$ titreler akut bruselloz lehine pozitif olarak bildirilir (5).
 - (b) Çift serum örneğinin paralel incelemesinde ≥ 4 kat titre artışı akut bruselloz için **kesin tanı** ölçütüdür (5).
- 2-ME (veya Rivanol) testi sonucu – SAT $\geq 1:160$ titrede pozitif iken merkaptan bazlı test ile 4 kat azalma gözleniyorsa "anlamli sonuç", yani, **aktif** enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilmektedir. Sadece testteki antikor titresi rapor edilir.
- Coombs testi - Değerlendirme ölçütü olarak tanımlanmış bir tanısai titre bulunmamaktadır. SAT titresinin iki veya dört katı değerinde ($\geq 1:320$ / $\geq 1:640$) CT titreleri "anlamli sonuç" olarak kabul edilir. Sadece testteki antikor titresi rapor edilir (6,10,11).
- ELISA – sonuç "pozitif" veya "negatif" olarak rapor edilir.

4.2. Kültür

- Hasta kanından, kemik iliğinden ve diğer dokulardan *Brucella* spp izolasyonu, bruselloz tanısı koydurur.
- Tanımlama adımlarında *Brucella* şüphesi hemen hekime ve enfeksiyon kontrol komitesine bildirilmeli ve tanı doğrulanarak kesin sonucun hızlıca çıkması sağlanmalıdır.
- Laboratuvarın kullandığı sistemin protokolü doğrultusunda uygun inkübasyon süresi sonunda "*Brucella* spp izole edilememiştir" veya "*Brucella* spp izole edilmiştir" şeklinde rapor verilir.

4.3. Moleküler

- Klinik örneklerde PCR ile pozitif sonuç **olası tanı** kabul edilir. Öte yandan PCR kültür izolatlarının doğrulanmasında iyi bir araçtır. Sonuçlar "*Brucella* spp pozitif veya negatif" olarak rapor edilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Kültür bruselloz tanısında altın standarttır. Ancak negatif sonuç hastalık olmadığını göstermez.
- Seroloji hızlı ve kolay tanı olanağı sağlaması nedeni ile tanıda öncelikli seçenektir. Ancak ticari *Brucella* antijenleri ile *B. canis*'e karşı gelişen antikorlar saptanamaz. Bu nedenle *B.canis* için etkene özgü antejenler ile serolojik test yapılmalıdır.
- Hastalığın ilk haftasında, prozon fenomeninde, blokan antikorların varlığında (kronik bruselloz), *B.canis* enfeksiyonu ve agamaglobünemi durumunda serolojik testlerde yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir.
- *Brucella* spp'nin *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Francisella tularensis* ve *Afipia clevelandensis* ile çapraz reaksiyonlar (yalancı pozitiflik) verebileceği ve seroloji sonuçlarının çapraz reaksiyonlardan etkilenebileceği unutulmamalıdır (2,3,16).
- Kültürden üretilen organizmaların doğrulaması antiserumlarla yapılır. İnsan patojeni olan dört *Brucella* türünden, biri hariç (*B.canis*) diğer üçü bu reaksiyonda aglütinasyon verir (1,6,7,16).
- *Brucella* bakterisinin enfektif dozu çok düşüktür; Risk Grubu 3 organizmadır ve biyoterör etkenleri arasında sınıflanmaktadır. *Brucella* bakterisi laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlardan da en sık sorumlu olan ajandır. Klinik örneklerden kültürlerinin kesinlikle BGK içinde yapılması gerekir. BGK bulunmayan klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Brucella* kültürü yapılmasına izin verilemez! Daha da ilerisi, BGK'sı bulunan klinik laboratuvarlar ise cins düzeyinde tanımladıktan sonra tür düzeyinde tanımlama ve tiplendirme adımlarına geçemez; bu amaçlar için izolatları BGD3 laboratuvara göndermekle yükümlüdürler (6,12,17).
- *Brucella* spp izole edildikten sonra bu bilgi tedaviye başlanması için yeterlidir.
- Rutinde *Brucella* suşlarına AMDT yapılması önerilmemektedir. Ancak biyoterörizm şüphesinde, hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyon varlığında ve relaps gelişiminde AMDT yapılması önerilir. Bu amaçla MİK düzeylerinin saptanması için mikrodilüsyon veya Epsilometer test uygulanabilir (6,12).

Ekler

Ek-1 Brusellozun serolojik tanısında temel prensipler

İnsan brusellozunun tanısında seroloji önemli bir yere sahiptir ve Rose Bengal testi (RB), standart/serum aglütinasyon testi (SAT), merkaptan bazlı testler, Coombs testi (anti-humanglobulin-AHG) ve ELISA gibi yöntemler kullanılmaktadır (14).

Bruselloz tanısında kullanılan aglütinasyon testleri "hızlı" ve "yavaş" olmak üzere iki ana gruba ayrılır (6,11). Hızlı aglütinasyon testleri dakikalar içerisinde aglütinasyon sonuçlarının alınabildiği ve renkli antijenlerin kullanıldığı testleri kapsamaktadır. Yavaş aglütinasyon testleri ise 8-24 saatlik inkübasyona ihtiyaç duyan ve temel olarak SAT ile onun Ig izotiplerini ve blokan antikoru saptayabilmek amacıyla geliştirilen modifikasyonlarını içermektedir (1,11,19).

Rose Bengal testi

Hızlı aglütinasyon testlerinde SAT için kullanılan antijenlerin (*B. abortus* S99 veya S1119.3 suşları) düşük asiditede (pH 3.65±0.05) hazırlanmasıyla elde edilen antijenler kullanılmaktadır (16). Asidik ortam IgM'in aglütinasyon kapasitesini azaltırken, IgG₁'in (ve ayrıca blokan IgA antikoru'nun da) reaksiyona katılmasını artırmaktadır. Böylece hızlı aglütinasyon testlerinde bakteri yüzeyindeki özellikle S-LPS ile reaksiyona giren IgG ve IgM antikoru (aglütininler) ile aglütinasyon vermeyen antikoru tespit edilmektedir. *Brucella* spp ile diğer bakteriler arasında görülen çapraz reaksiyonlar IgM'e bağlı olduğu için asidik ortam IgM'e bağlı çapraz reaksiyonları (yalancı pozitifliklerin) azaltır, böylece testin duyarlılığını artırarak ideal bir tarama testi olmasını sağlar (11,12,19,20).

Günümüzde Rose Bengal testi ve tamponlanmış antijen kart test (Buffered Antigen Plate Agglutination test-BPAT) endemik bölgelerde insan brusellozunun tanısında tarama testi olarak kullanılmaktadır (11,19).

Aktif brusellozlu olgularda yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre RB testinin duyarlılığı ve özgüllüğü %75-100 arasında değişmektedir. Buna karşın, kronik ve komplike olgularda -yüksek yalancı negatiflik oranı nedeniyle- testin duyarlılığı oldukça düşüktür (%33-50) (7,11,12,19,20).

Serum aglütinasyon testi (Wright testi)

1897 yılında Smith ve Wright tarafından geliştirilen bu yöntem günümüzde insan brusellozunun serolojisinde en sık kullanılan ve referans olarak kabul edilen yöntemdir. Serum aglütinasyon testi (SAT) ayrıca tüp aglütinasyon testi, standart tüp aglütinasyon testi ve Wright testi gibi farklı adlarla da anılmaktadır (10,15).

Antijen olarak *B. abortus* S kökenlerinin (*B. abortus* S 99 veya S 1119-3) ısı ile öldürülmüş fenollü *tam hücre* süspansiyonları kullanılır (pH 7.2-7.4).

SAT'da, özellikle bakterinin yüzeyindeki S-LPS ile reaksiyona giren IgM, IgG ve IgA antikorları saptanır. Ancak, test reaksiyonunun nötral değere yakın bir pH'da gerçekleşmesi nedeniyle, SAT IgM antikorlarını daha fazla saptamaktadır. IgM'in pentamer yapısı aglütinasyon reaksiyonunda iyi kafes formasyonu oluşmasına yol açarak tüp aglütinasyon testlerindeki duyarlılığının temel olarak IgG tipi antikorları saptayan Rose Bengal'e göre daha yüksek olmasına neden olmaktadır. Ancak, IgM antikorları nedeniyle gelişen çapraz reaksiyonlar (yalancı pozitiflik) SAT'in özgüllükle ilgili en önemli sorunudur.

Merkaptan bazlı testler

Merkaptan bazlı testler *Brucella* tüp aglütinasyon testinin bir modifikasyonudur. *Brucella* tüp aglütinasyon testinde total antikorlar saptandığı için immünglobülin izotiplerinin belirlenebilmesi amacıyla merkaptan/redükten [2-ME ve dithiothreitol] maddeler ile aglütinasyon testi geliştirilmiştir (2,7,11,20).

Merkaptanbazlı testlerde antijen olarak SAT antijeni kullanılmaktadır. Hastanın serum örneklerinin merkaptan maddelerle işleme tabii tutulması dışında protokol SAT ile aynıdır (13).

Serum örneğinin merkaptan/redükten maddelerle işleme tabii tutulmasıyla IgM pentamerinin disülfid bağları indirgenerek aglütinasyon yeteneğini kaybederken ortamdaki IgG etkilenmeden kalır. Böylece serumdaki IgG varlığı *indirekt* olarak belirlenir. Ancak kalan titrenin sadece IgG'yi değil, IgA varlığını da gösterdiği unutulmamalıdır. Yine bazı olgularda IgG moleküllerinin redükten maddelere duyarlı olabileceği ve yalancı negatif reaksiyonların görülebileceği de akılda tutulmalıdır (3,13,14).

Genel olarak, merkaptanbazlı testler akut brusellozun tanısı, hastalığın evrelerinin saptanması ve prognozun değerlendirilmesinde önemlidir.

Coombs testi (anti-human globulin test)

Bruselloz şüpheli olgularda enfeksiyonun çok erken döneminde veya agamaglobülinemi, aglütinasyon vermeyen (blokan, inkomplet) antikorların varlığı veya prozon fenomeni durumunda SAT negatif bulunabilir (7,11,13).

Tüp aglütinasyon testindeki en önemli yalancı negatiflik durumu komplike ve kronik olgularda görülmektedir. Bazı subakut ve kronik bruselloz olgularında klinik olarak bruselloz düşünülmeyle birlikte SAT yalancı negatif sonuç verebilir. Bu hastaların serumları blokan antikorlar açısından araştırılmalıdır (6,11,12).

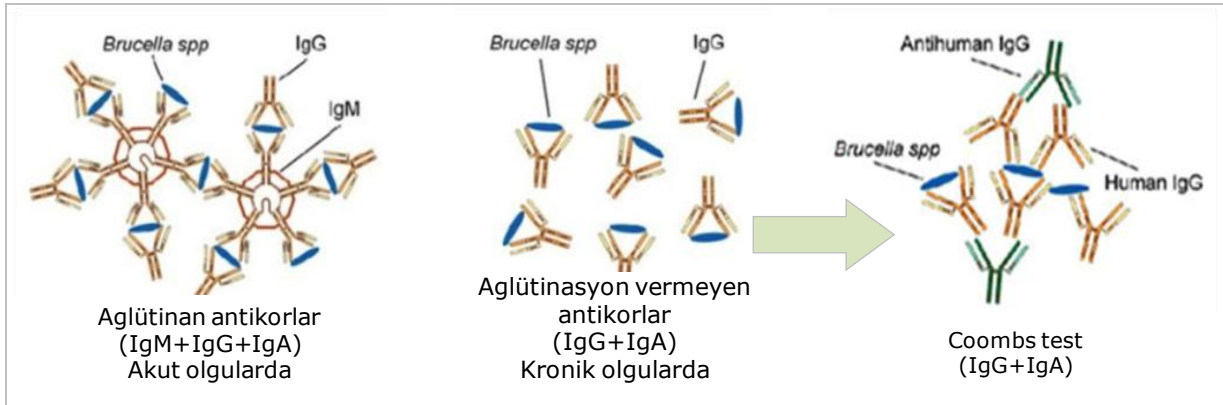
Blokan antikorlar daha çok kronik brusellozlu olgularda rastlanan ve özgül olarak antijene bağlanabilmesine rağmen aglütinasyona yol açmayan IgG (IgG₁ ve IgG₂) ve IgA yapısındaki antikorlardır (*bkz.* Şekil 3) (6,7,11,12).

Blokan antikorların aglütinasyon oluşturmamalarının mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Aglütinasyon görülmemesi; (i) menteşe bölgesinin çok esnek olması nedeniyle iki veya daha fazla epitopa optimal çapraz bağlanmayı sağlayacak açıyı verememelerine veya (ii) antijen molekülünde epitopların yüzeyden çok derin kısımlarda yer alması yada epitop dağılımının düzenli olmamasının antikorların bağlanmasını zorlaştırmasına bağlı olduğu öne sürülmüştür (6).

Brusellozlu hastaların serumlarında blokan antikor görölme sıklığı %0.47-6 arasında bulunmuştur (14,21).

Bruselloz seyrinde açığa çıkan blokan antikorların varlığı bir aglütinasyon testi olan Coombs testi veya 'immuncapture' aglütinasyon testi ile gösterilebilir (11,14,21). Anti-human globulin IgG (Coombs reajeni) eklenmesi veya mekanik işlem (yüksek devirde santrifügasyon) sonrasında blokan antikorların bağlanması indüklenebilir (bkz. Şekil 3) (11,14,15,16).

CT özellikle bruselloz şüpheli olgularda SAT sonuçlarının negatif olduğu veya düşük antikor titrelerinin saptandığı durumlarda oldukça yararlı bir yöntemdir. Bu tür tanısal sorunlar genellikle **kronik** bruselloz olgularında gözlenmektedir.



Şekil 3. Brusellozda oluşan aglütinan (solda) ve blokan (ortada) antikorlar. Blokan antikorların varlığı durumunda ortama anti-human IgG eklenmesi ile aglütinasyonun gerçekleşmesi (sağda). (Kaynak: Vircell SL, Granada, İspanya).

Ek-2 Rose Bengal aglütinasyon testi

Örnek, Reaktif, Donanım

- Hasta serumu (steril, vida kapaklı tüpte) – çalışma gününe kadar (ya da en fazla 5 gün) +4°C’de, daha uzun bekleme süresi için -20°C’de saklanır.
- Kan örneği (sarı veya kırmızı kapaklı tüpte) – en kısa sürede serum ayrılır ve teste kadar yukarıda tarif edildiği gibi saklanır.
- *B. abortus* Rose Bengal antijeni
- Steril SF
- Otomatik pipet ve pipet ucu (10-200 µL)

Testin uygulanması

- Serum örnekleri (kontrol serumları dahil), SF ve test antijeninin teste başlamadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenir (~30 dakika).
- Beyaz zemine sahip kartın üzerine serum örneğinden, pozitif ve negatif kontrollerden 50 µL bırakılır.
- Üzerine 50 µL RB antijeni damlatılır.
- Pipet ucu veya kürdan kullanılarak serum ve antijenin karışması sağlanır.
- Kartlara 100 rpm’de rotator ile veya elle dairesel hareket yatırılarak antijen ve serumun karışmasına yardımcı olunur ve reaksiyon bu sırada gözlenir.
- 4 dk içinde antijen antikor reaksiyonuna bağlı iri taneli kümeleşmelerin gözlenmesi **pozitif**, şeffaf renkli bir görünüm **negatif** olarak değerlendirilir.

Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- RB testi bir tarama testidir. Bu nedenle pozitif sonuçlar mutlaka SAT ile de çalışılmalıdır (1,14).
- RB antijeni asidik bir boya ile hazırlandığı için reaksiyon ortamı asidiktir. Buna bağlı olarak pentamer yapısındaki IgM’ler reaksiyona iyi katılmayabilir (11,19)
- Bir kart üzerinde numune, pozitif kontrol ve negatif kontrol çalışılıyor ise örneklerin birbirine karışmamasına dikkat edilmelidir.
- Testin inkübasyon süresinin uzadığında (>4 dk) fibrin pıhtılarının oluşması nedeniyle yalancı pozitif sonuç alınabileceği unutulmamalıdır (7,12,19).
- RB testinde *Yersinia enterocolitica* 0:9 ile çapraz reaksiyonlar alınmasına rağmen, *F. tularensis* veya kolera aşısı yapılanlarda çapraz reaksiyonlar görülmez (6,14).
- Yüksek düzeyde antikor varlığına bağlı (prozon fenomeni) ve kullanılan ticari antijenin özelliğine bağlı olarak yalancı negatif sonuçlar alınabilir (7,11,12,19).
- RB testinde bazen daha uzun inkübasyon süresine ihtiyaç olabilir. Blokan antikorlar veya prozon yoksa 4 dk içerisinde test pozitifleşirken, yüksek titrede non-aglütinan antikor (yüksek CT titresi) varlığında aglütinasyonun gelişmesi 8 dakikaya uzayabilmektedir (11,19).

Ek-3 Serum aglütinasyon testi (SAT)

Örnek, Reaktif, Donanım

- Hasta serumu veya kan örneği – bkz. "Ek-2 Rose Bengal testi"
- *Brucella* SAT antijeni - *B. abortus* S-99 ya da S 1119-3 suşlarından hazırlanmış
- Deney tüpleri, 5 mL
- İnkübatör 36±1°C
- Otomatik pipet (100-1000 µL) ve uygun pipet uçları
- Steril SF

Kalite kontrol

- Her testle birlikte negatif, pozitif ve antijen kontrolü çalışılır.
- Pozitif kontroller için test tüplerinden birer set hazırlanır ve test edilir.
- Negatif kontrol serumu ise, hasta serumunun ve pozitif kontrol serumlarının çalışıldığı test tüpü setinde sekizinci tüplere eklenir.
- Dokuzuncu tüp antijen kontrolü olarak kullanılır (sadece SF ve antijen içerir).
- Negatif kontrolde düşme tarzında çökme, pozitif kontrolde 1/160 titrede dantela tarzında çökme, antijen kontrolde düşme tarzında çökme testin çalıştığını gösterir.

Testin uygulanması

- 1) Serum örnekleri (kontrol serumları dahil), SF ve test antijeninin teste başlamadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenir (~30 dakika).
- 2) Örnek için dokuz test tüpü spora yerleştirilir, üzerlerine hastanın numarası ve titreler yazılır. Aynı işlem pozitif kontrol serumları için de yapılır.
- 3) İlk tüpe 0.9 mL ve diğer tüplere (2→8) ise 0.5 mL SF konulur.
- 4) İlk tüpe 0.1 mL hasta serumu (pozitif kontroller için de aynı şekilde) konularak karıştırılır. İlk tüpten ikinci tüpe 0.5 mL aktarılarak karıştırılır.
- 5) Bu işlem yedinci tüpe kadar devam ettirilerek "iki kat serum dilüsyonları" elde edilir.
- 6) Yedinci tüpten 0.5 mL dışarıya atılır.
- 7) Böylece elde edilen dilüsyonlar 1/10 ile 1/640 arasında değişmektedir.
- 8) Sekizinci tüpe negatif kontrol serumu konulur.
- 9) Dokuzuncu tüpe sadece antijen eklenir (antijen kontrol).
- 10) Tüplere 0.5 mL boyasız *Brucella* SAT antijeni eklenir.
- 11) Böylece 1/20-1/1280 son dilüsyonlar elde edilmiş olur.
- 12) En az 20 saniye çalkalayarak serum ve antijenin karışması sağlanır.
- 13) 37°C inkübatörde veya su banyosunda (titreşimsiz ortamda) 48 saat inkübe edilir.

Biyolojik Referans Aralığı

Değerlendirme için bulanıklık kontrol tüpleri hazırlanır.

- +4 için bir tüpe 1 mL SF konur
- +3 için bir tüpe 750 µL SF, 250 µL antijen konur
- +2 için bir tüpe 500 µL SF, 500 µL antijen konur
- +1 için bir tüpe 250 µL SF, 750 µL antijen konur
- "0" okuma için bir tüpe 1 mL antijen konur

Floresan aydınlatmada veya siyah zemin üzerinde aglütinasyon ve tüpteki berraklaşma değerlendirilir.

- + 4 aglütinasyon - Tüm hücrelerde aglütinasyon var, supernatan tümüyle berrak.
- + 3 aglütinasyon - Hücrelerin %75'inde aglütinasyon var, supernatan hafif bulanık.
- + 2 aglütinasyon - Hücrelerin %50'sinde aglütinasyon var, supernatandaki bulanıklık "okuma tüpündekine eşdeğer".
- + 1 aglütinasyon - Hücrelerin %25'inde aglütinasyon var, supernatandaki bulanıklık "kontrol tüpündekine göre daha az yoğun".
- "0" okuma - Aglütinasyon yok, supernatandaki yoğunluk "kontrol tüpündekine eşdeğer".
- Pozitif titre; +2 aglütinasyon gösteren en yüksek serum dilüsyonu pozitif titre olarak kabul edilir.
- **Düğme** tarzında dipte çöküntü görülmesi "negatif" olarak değerlendirilir. Ayrıca 1/160 dilüsyona kadar **dantela** şeklinde aglütinasyon görüldüğünde de sonuç "negatif" olarak değerlendirilir.
- 1/160 dilüsyon ve üzerindeki dilüsyonlarda dantela şeklinde en az +2 aglütinasyon görüldüğünde ise sonuçlar pozitif olarak değerlendirilir ve raporlanır.

Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- 1/20 titrede dantela tarzında aglütinasyonun görülmemesi, düğme şeklinde çökme görülmesi **negatif** olarak değerlendirilir ve sonuç "negatif" olarak raporlanır.
- 1/20 -1/80 titreler arasında aglütinasyon gözlenmiş ise yine **negatif** olarak değerlendirilir ve sonuç "negatif" olarak raporlanır.

ÖNEMLİ: Ancak, bu titreler daha önce geçirilmiş bir enfeksiyondan kalma olabileceği gibi enfeksiyonun başlangıcında oluşan düşük titredeki antikorları da gösteriyor olabilir.

Hastalığın erken döneminde titreler çok düşük olabildiğinden, özellikle uygun epidemiyolojik ilişki ve klinik belirtilerin varlığında 10-14 gün sonra yeni bir örnekle test tekrarı yapılmalı ve serokonversiyon ya da titre artışı olup olmadığı gözlenmelidir.

Çift serum örneğinde *Brucella* SAT titresinin negatiften pozitif değişimi (serokonversiyon) veya ≥ 4 kat artışı **kesin tanı** kriteridir.

- 1/160 titrede +2 aglütinasyon ve $\geq 1/160$ titrelerde görülen dantela şeklindeki aglütinasyon **pozitif** olarak değerlendirilir ve sonuç "pozitif" olarak raporlanır.
- Uygun epidemiyolojik ilişki (temas öyküsü) ve klinik bulguların varlığında tek bir serum örneğindeki SAT titresini $\geq 1:160$ akut/aktif brusellozla uyumlu olarak kabul edilir.

Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- İnkübasyon alanında ve değerlendirme aşamasında sarsıntıya neden olacak cihaz bulunmamalıdır. Titreşim aglütinasyonun dantela şeklini bozacağından düğme şeklinde bir çökmeye sebep olabilir. Bu görüntü de analist tarafından yanlışlıkla negatif olarak değerlendirilebilir.
- Çoğu sağlıklı bireyde geçmişteki tekrarlayan maruziyet ve asemptomatik enfeksiyon nedeniyle 1:80 - 1:160 gibi titrelerde aglütininler bulunabilir.
- SAT'da aşağıda sıralananlar "yalancı negatiflik" nedeni olabilir:
 - (a) Enfeksiyonun ilk haftası (erken bakteriyemik dönem <1:160 titreler)
 - (b) Blokan antikorların varlığı (kronik bruselloz?)
 - (c) Hasta serumunda antikor fazlalığı nedeniyle düşük sulandırımelerde aglütinasyonun görülmemesi/maskelenmesi (prozon fenomeni)
 - (d) *B.canis* enfeksiyonu ve
 - (e) Agammaglobulinemi
- Tüp aglütinasyon testindeki en önemli yalancı negatiflik durumu komplike ve kronik olgularda görülmektedir. Blokan antikorlar, daha çok kronik brusellozlu olgularda rastlanan ve özgül olarak antijene bağlanabilmesine rağmen aglütinasyona yol açmayan IgG (IgG₁ ve IgG₂) ve IgA yapısındaki antikorlardır. Blokan antikorların varlığından şüphelenildiğinde (vakaların %0.47 ila %6'sında) serum örneğinden Coombs testi veya ELISA çalışılmalıdır.
- Bruselloz tanısında **prozon** fenomeni özellikle 1/160 titreye kadar tüp aglütinasyon testi çalışan laboratuvarlar için sorun yaratabilir. Prozon fenomeni özellikle subakut ve kronik olgularda olmak üzere akut evrede de görülebilir. Genel olarak, prozon fenomeni yaklaşık %1.5-6 oranında bildirilmiştir. Fenomen sıklıkla düşük titrede ($\leq 1:20$) görülmesine karşın nadiren $> 1:80$ dilüsyonlarda saptanabilir.

Ek-4 2-Merkaptoetanol (2-ME) testi

Örnek, Reaktif, Donanım

- Hasta serumu veya kan örneği – bkz. Ek-2 Rose Bengal testi
- 0.1M 2-ME dilüent – SF içinde çalışılacak örnek sayısına göre taze olarak hazırlanır.
 - (a) 100 mL dilüent için; 99.286 mL SF üzerine, 0.714 mL (2=β)-ME eklenir.
 - (b) 2-ME'nin kokusu oldukça iritandır. Bu nedenle çeker ocakta hazırlanması veya hazırlama esnasında maske kullanılması tavsiye edilir.
- Diğer reaktif, donanım – SAT ile aynı; bkz. Ek-3 SAT

Kalite kontrol

- SAT ile aynı; bkz. Ek-3 SAT.

Testin uygulanması

- 1) Serum örnekleri (kontrol serumları dahil), 0.1M 2-ME dilüent ve test antijeninin teste başlamadan önce oda sıcaklığına gelmesi beklenir (~30 dakika).
- 2) Test tamamen SAT için tarif edildiği gibi uygulanır (bkz. Ek-3 SAT). **Fark** yalnızca serum dilüsyonu için SF yerine taze hazırlanmış 0.1M 2-ME kullanılmasıdır.

Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- **Düğme** şeklinde çökme görülmesi "negatif" olarak ve **dantela** tarzı aglütinasyonun görülmesi "pozitif" olarak değerlendirilir.
- 2-ME testinde, aglütinasyon gözlenen antikor titresi rapor edilir. Test için bir tanısal titre verilmemelidir.
- Merkaptanlarla çalışıldığında SAT titresinde ne kadar azalmanın anlamlı olduğu netlik kazanmamıştır. Akut ve subakut şüpheli olgularda;
 - (a) SAT $\geq 1:160$ titrenin merkaptan testlerde 4 kat azalması "anlamlı sonuç" yani aktif enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak, bazı yazarlar da klinik olarak uyumlu ve SAT titresi $\geq 1:160$ olan vakalarda merkaptan testlerde $\leq 1:80$ titrelerin saptanmasının **akut** bruselloz tanısı için güçlü bir kanıt olduğunu bildirmişlerdir.
 - (b) Daha geç dönemdeki olgularda ise, merkaptan testlerde tüp aglütinasyon testindeki titrenin bir dilüsyon azalması anlamlı kabul edilmektedir.

Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- İnkübasyon alanında ve değerlendirme aşamasında sarsıntıya neden olacak cihaz bulunmamalıdır. Titreşim aglütinasyonun dantela şeklini bozacağından düğme şeklinde bir çökmeye sebep olabilir. Bu görüntü de analist tarafından yanlışlıkla negatif olarak değerlendirilebilir.

Ek-5 Coombs testi

Örnek, Reaktif, Donanım

- Hasta serumu veya kan örneği – *bkz.* Ek-2 Rose Bengal testi
- Coombs serumu (anti-human globülin IgG)
- Diğer reaktif, donanım – SAT ile aynı; *bkz.* Ek-3 SAT

Kalite kontrol

- Her testle birlikte negatif, pozitif ve antijen kontrolü çalışılır.
- Pozitif kontroller için test tüplerinden birer set hazırlanır ve test edilir.
- Negatif kontrol serumu ise, hasta serumunun ve pozitif kontrol serumlarının çalışıldığı test tüpü setinde sekizinci tüplere eklenir.
- Dokuzuncu tüp antijen kontrolü olarak kullanılır (sadece SF ve antijen içerir).
- Negatif kontrolde düğme tarzında çökme, pozitif kontrolde 1/160 titrede dantela tarzında çökme, antijen kontrolde düğme tarzında çökme testin çalıştığını gösterir.

Testin uygulanması

- 1) SAT'ın "Testin Uygulanması" basamakları 1'den 12'ye kadar aynı şekilde uygulanır.
- 2) 13 basamakta tüpler aynı inkübasyon koşullarında 24 saat inkübe edilir.
- 3) Aglütinasyon veren tüpler not edilir ve testten çıkartılır.
- 4) Aglütinasyon vermeyen tüpler santrifüj edilir (2000 rpm × 20 dk).
- 5) Süpernatant atılır, çökelti üzerine 0.5 mL SF eklenir ve pipetleme yapılarak karışması sağlanır.
- 6) Üç kez santrifügasyon ve yıkama işlemi tekrarlanır (4. ve 5. basamaklar).
- 7) Çökelti üzerine 0.45 mL SF eklenir ve yeniden süspanse edilir.
- 8) Tüplerin üzerine 0.05 mL (50 µL) Coombs serumu (anti-human globülin) eklenir (Hazır Coombs serumu için en uygun çalışma konsantrasyonu belirlenmelidir).
- 9) Tekrar inkübatöre kaldırılarak 24 saat sonra aglütinasyon yeniden değerlendirilir.

Biyolojik referans aralığı

- Biyolojik referans aralığı SAT ile aynı (*bkz.* Ek-3 SAT).

Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

- Dantela tarzında aglütinasyonun görülmemesi ya da düğme şeklinde çökme görülmesi negatif olarak değerlendirilir.
- Dantela şeklindeki aglütinasyon "pozitif" olarak değerlendirilir.

- CT için tanısal titre konusu netlik kazanmamıştır. Yapılan çalışmalarda CT titresi SAT titresinin iki katı ($\geq 1:320$) olarak alınmıştır (22,23,24). Ancak bazı araştırmacılar SAT ile elde edilen titre değerinde en az 4 kat artış olmasını CT için "anlamlı sonuç" olarak kabul etmişlerdir (25).
- Akut brusellozda CT titreleri SAT titrelerinden genellikle 4-16 kat, tedavi almamış olgularda (kronik brusellozda) ise, 16-256 kat daha yüksektir (1,14).
- CT kronik seyir ve relaps sırasındaki antikor titresinde gelişen hafif değişiklikleri belirlemek için en uygun serolojik testtir (6,22,24).

Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- İnkübasyon alanında ve değerlendirme aşamasında sarsıntıya neden olacak cihaz bulunmamalıdır. Titreşim aglütinasyonun dantela şeklini bozacağından düğme şeklinde bir çökmeye sebep olabilir. Bu görüntü de analist tarafından yanlışlıkla negatif olarak değerlendirilebilir.
- CT titreleri genellikle SAT testinde elde edilen titrelere göre daha yüksek olup, daha uzun süre pozitif kalmaktadır.
- CT komplike ve kronik olguların değerlendirilmesinde önemlidir; ancak kronik olguların yaklaşık %7'sinde negatif olarak bulunduğu bildirilmiştir (26).

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (Brusellozun Mikrobiyolojik Tanısı) geçen bazı hususlarda daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda verilen UMS belgelerine başvurulabilir:

- UMS, B-TP-01 Suş saklama prosedürü
- UMS, B-TP-03 Gram boyama
- UMS, B-TP-10 Katalaz testi
- UMS, B-TP-16 Oksidaz testi
- UMS, B-TP-22 Üreaz testi
- UMS, B-TP-23 X, V ve XV faktör gereksinimi
- UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organization for Animal Health, and World Health Organization. Brucellosis in human and animals. Geneva: World Health Organization; 2006. WHO/CDS/EPR/2006.7
- 2 Robinson BD, Shah S, Jacobson R, Luper D. *Brucella*. Bioterrorism. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 16.6.1
- 3 *Brucella*. Sentinel Level Clinical Laboratory Guidelines for Suspected Agents of Bioterrorism and Emerging Infectious Diseases. American Society for Microbiology (ASM). <http://www.asm.org/images/PSAB/BrucellaJuly242013.pdf>. (son erişim tarihi: 12. 12.2013)
- 4 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 5 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı 2004, Ankara. <http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 6 Kılıç S. Bruselloz: Mikrobiyolojik Tanı. *Türkiye Klinikleri J Infect Dis Special Topics* 2012;5(1):46-66
- 7 Lindquist D, Chu MC, Probert WS. *Francisella* and *Brucella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 815-3.
- 8 T.C. Sağlık Bakanlığı (Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi TR0802.16-01 Avrupa Birliği ve Dünya Bankası desteği ile) (Akbaş E, Pr Danışmanı). Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Tanısında Mikrobiyoloji Laboratuvar Kapasitesi Mevcut Durum Değerlendirmesi: Anket - LabKap2012. XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 4 Kasım 2012.
- 9 Shapiro DS, Wong JD. *Brucella*. In: Murray PA, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1999, p.625-31.
- 10 Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:S12-7.
- 11 Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi* 2010;1:65-89.

- 12 Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9(7):833-45.
- 13 Bilgehan H. Antijen-antikor ilişkilerine bağlı inceleme yöntemleri: Bruselloz tanısında aglütinasyon (Wright deneyi) *in Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 5. Baskı, Barış Yayınları, İzmir. 2009, p. 223-228
- 14 Diaz R, Moriyon I. Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In Young EJ and Corbel MJ eds. *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1989, p. 73-83.
- 15 Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clin Lab* 2003;49(11-12):577-89.
- 16 Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. 1988.
- 17 Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part I: techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab* 2003;49(9-10):487-505.
- 18 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 19 Diaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. The Rose Bengal test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *P Lo S Negl Trop Dis*. 2011;5(4):e950. doi: 10.1371/journal.pntd.0000950.
- 20 Buchanan TM, Faber LC. 2-Mercaptoethanol *Brucella* agglutination test: Usefulness for predicting recovery from brucellosis. *J Clin Microbiol* 1980;11(6):691-693.
- 21 White RG. Immunglobulin profiles of the chronic antibody response. *Postgrad Med J* 1978;54:595-601
- 22 Orduna AA, Almaraz A, Prado A, Purificacio M, Gutierrez N, Garcia-Pascual A, et al. Evaluation of immuncapture agglutination test (BrucellaCapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4000-5.
- 23 Casao MA, Navarro E, Solerab J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *J Infect* 2004;49:102-8.
- 24 Casanova A, Ariza J, Rubio M, Masuet C, Díaz R. BrucellaCapt versus classical tests in the serological diagnosis and management of human brucellosis. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(6):844-51.
- 25 Morrodan T, Paliakova RN, Rubio M, Ariza J, Clavijo E, Smits HL et al. Evaluation of three methods to measure anti-Brucella IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *J Med Microbiol* 2001;50:663-666
- 26 Araj GF, Awar GN. The value of ELISA vs negative Coombs findings in the serodiagnosis of human brucellosis. *Serodiag Immunother Infect Dis* 1997;8: 169-172

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Şarbonun (*Bacillus anthracis* enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-20
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizma	5
2 Tanı için asgari gerekler.....	5
3 Şarbon tanısında kullanılan teknikler.....	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	12
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
6 Referans Laboratuvar	13
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13

Kapsam ve Amaç

Şarbon, *Bacillus anthracis* bakterisinin neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur. Esasen koyun, keçi, sığır gibi ot yiyen hayvanların hastalığıdır. İnsanlara genel olarak direkt temas ile nadiren de enfekte etlerin yenmesi ve sporların solunması ile bulaşabilir. Bulaş yolu hastalığın formlarını da belirler ve şarbon kutanöz, intestinal ya da akciğer (solunumsal) olmak üzere üç klinik formda ortaya çıkabilir. Solunumsal şarbon başlıca mesleki bir hastalık olmakla birlikte biyolojik terör tehdidi ile de ilişkili olabileceği için ayrıca önem kazanmıştır (1).

B. anthracis kolay üretilebilir bir organizma olması ve sporlarının solunum yolu ile yayılma potansiyeli nedeniyle biyotehdit ajanları arasında tanımlanmıştır (1). Ülkemizde de şarbon bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır (2,3).

Dünyada genellikle referans ya da yetkilendirilmiş laboratuvarlarda çalışılmasına izin verilen *B. anthracis* laboratuvar çalışanları için de yüksek riskli bir patojendir. İncelemelerin ideal olarak Referans laboratuvarlarda yapılması gerekir. Öte yandan *B. anthracis* rutin tanı olanakları içinde kültürlerden izole edilebilen bir organizmadır ve -sıklıkla kutanöz- şarbon şüpheli örnekler klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelir. Bu nedenle bu UMS belgesinde asgari laboratuvar şartları, sorumluluklar, örnek yönetimi, tanı süreçleri ve Referans laboratuvarla işbirliği için izlenecek temel adımlar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

KKA Koyun kanlı agar

KKD Koruyucu kişisel donanım

Genel Bilgi

B. anthracis gram pozitif, kalın, çomak şeklinde, sporlu ve kapsüllü bir bakteridir. Aerob veya fakültatif aerob özellikte ve hareketsizdir. Boyutları 1-2 x 3-8 µm arasındadır (1). Basilin köşeli bir yapısı vardır. Sporlanma aerob koşullarda olur. Sporlar yuvarlak veya oval yapıda olup fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı çok dirençlidirler. Sporların doğada 50-60 yıl süreyle canlı ve bulaşıcı kaldığı bilinmektedir (1,4,5,6). Vejetatif formlar dezenfektanlara ve ısıya dirençsizdir. 55-58°C'de 10-15 dakikada ölür. Buna karşın spor formu fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı çok dirençlidir. Otoklavda nemli sıcaklıkta 121°C'de 15 dakikada ve kuru sıcaklıkta 160°C'de 60 dakikada inaktif hale gelir. %0.1'lik cıva klorid 5 dakikada ve %10'luk formol 15 dakikada sporları öldürür (1,4,6). *B. anthracis* özgül gama fajı ile diğer basillerden ayırt edilebilir (1,7).

B. anthracis'in pXO1 ve pXO2 adlı iki plazmidi vardır; pXO1 plazmidi koruyucu antijen, letal (öldürücü) faktör ve ödem faktörünü kodlamaktadır; pXO2 ise kapsül oluşumunu sağlayan gen dizilerini taşır (1,8). Bakteri bu plazmidlerden birini ya da her ikisini kaybederse avirulan hale gelir, hastalık yapma yeteneğini kaybeder (1).

Şarbon, *B.anthraxis*'in etken olduğu ve sıklıkla otçul hayvanlarda görülen bir enfeksiyondur. İnsanlarda, etkenin bulaş yoluna göre kutanöz, gastrointestinal ve solunumsal şarbon olmak üzere 3 formu vardır (1,5).

- 1 *Kutanöz şarbon* en sık görülen formdur; bütün şarbon olgularının %95 kadarını oluşturur ve sıklıkla hayvan yünleri, derileri ve postları ile uğraşanlarda görülür. Uygun tedavi verildiği sürece, nadiren ölümcüldür.
- 2 *Gastrointestinal şarbon*, kontamine etlerin tam pişirilmeden tüketilmesini takip eden 1-7. günler arasında görülür ve mortalitesi yüksektir.
- 3 *Solunumsal (akciğer) şarbon* ise, *B. anthracis* sporlarının solunum yoluyla alınması sonucu oluşur. Erken prodromal dönemde tedavi edilebilir olmasına rağmen, semptomların başlamasından itibaren 48 saat içinde uygun antimikrobiyal tedavi başlanmazsa mortalitesi çok yüksektir (1).

İnsandan insana bulaş olduğu teyit edilmemiştir (1,5).

Gelişmiş endüstriyel ülkelerde şarbon -özellikle hayvansal ürünlerle ilgili sıkı ithalat düzenlemelerinin de bir sonucu olarak- hiç görülmeyen veya nadir görülen bir hastalıktır. Buna karşın insan şarbonu birçok ülkede ciddi bir halk sağlığı problemidir; özellikle ekonomisinde hayvancılığın önemli yer tuttuğu gelişmekte olan bölgelerde şarbon görülmeye devam etmektedir. Bu bölgelerden biri de Türkiye'dir. Her yıl dünya genelinde kaydedilen vakaların çoğunluğu Türkiye, Pakistan, İran ve Sudan'dan bildirilmektedir. Bir diğer ifade ile Ortadoğu, Asya ve Afrika'nın bazı bölgelerinde şarbon hiperendemik; Avrupa'nın güneyinde, Afrika, Avustralya, Asya ile Kuzey ve Güney Amerika'nın önemli bir kısmında ise endemiktir (6,7). (Şarbonun dünyadaki dağılımına dair harita için: http://www.vetmed.lsu.edu/whocc/mp_world.htm).

B. anthracis'in biyoterör ajanı olarak tarihi yüzyıllar kadar eskilere dayanır (7). Soğuk savaş yıllarında da pek çok ülkenin *B. anthracis*'i biyolojik silah olarak geliştirdiği bilinmektedir. Ancak en sarsıcı gelişme, yakın geçmişte 2001 yılında ABD'de yaşanan biyoterör saldırısıdır. Mektup zarfları içinde taşınan toz halinde sporların inhalasyonu sonucu 22 kişide akciğer şarbonu geliştiği ve %45 ölümle sonuçlandığı rapor edilmiştir (6,7,8). Bu olay pek çok yönü ile şarbonun ele alınmasına vesile olmuştur ve dikkatleri özellikle laboratuvar tanısının ve kolay elde edilebilirliğinin önemine de yönlendirmiştir. Bu nedenle DSÖ -kasıtlı salınım olasılığı da dahil epidemik hazırlıklılık için- her ülkenin şarbon tanısında yeterli bir kapasiteye sahip olmasını hedef olarak göstermektedir. Bu çerçevede ülkeler değişik laboratuvar seviyelerinde; (i) klinik örneklerden *B. anthracis*'in izolasyonu ve doğrulaması ve (ii) *B. anthracis* için diğer destekleyici laboratuvar testleri (kan ve doku örneklerinin yaymalarında M'Fadyean (polikrom metilen mavisi) boyama, immünohistokimyasal boyama, klinik örneklerde PCR ile *B. anthracis* DNA'sının gösterilmesi vb.) yapılabiliyor olmalıdır (1).

ABD'de mevcut bildirim sistemine göre tek bir pulmoner şarbon vakasının görülmesi halinde bile sağlık personelinin biyoterörizm olasılığını düşünmesi ve harekete geçmesi yönünde uyarı vardır (7,9,10,11). Bu duyarlılık ülkenin epidemiyolojik verilerine göre 2001 yılından önceki 100 yıl boyunca sadece 18 pulmoner şarbon vakasının görülmüş olması ile de ilişkili görünmektedir.

Şarbonun tanısı başlıca etkenin kültürlerden izolasyonuna dayanır. *B. anthracis* sıvı ve katı kültürlerde kolaylıkla ürer. Ayrıca mikroskopi, moleküler tanı ve seroloji de destekleyici tanı araçları olarak önem arz eder (6,7,8,9).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Bacillus anthracis

2 Tanı için asgari gerekler

2.1. Laboratuvar güvenliği

Bacillus anthracis Risk Grubu 3 mikroorganizmadır ve yüksek aerosol bulaş potansiyeli taşır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyona neden olabilir.

Şarbon kuşkulu **klirik örneklerin** kültür ve tanımlama işlemleri asgari BGD2 standardına sahip bir laboratuvarda yapılabilir; mutlaka sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde çalışılmalı standart güvenlik önlemleri daima uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). Kültürlerde *B. anthracis* üretilirse işleme, BGD3 laboratuvarlarda devam edilmelidir. **Çevresel örnekler** (şüpheli zarflar içinde bulunan toz materyal vb.) doğrudan BGD3 laboratuvarda çalışılmalıdır.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Türkiye şarbon için hiperendemik bir bölge kabul edilmektedir. Vakaların en büyük kısmı deri şarbonu olup sahada bu örnekler sıklıkla klinik mikrobiyoloji laboratuvarları (BGD2) tarafından incelenmektedir. Öte yandan nadir olsa da, intestinal ve pulmoner şarbon vakalarının klinik örnekleri de (vakada henüz şarbondan kuşulanılmamışken veya başka ön tanımlarla) klinik laboratuvarlara gelmiş ve kültürlerden ilk üremeleri takiben şarbondan şüphelenilmiş olabilir. Her iki durumda da hastane laboratuvarı hastadan alınan bütün örnekleri ve şüpheli izolatları ilgili düzenlemelere uygun bir şekilde (bkz. IATA kuralları ve ulusal mevzuat) 3'lü paketleme yöntemi ile paketleyerek Referans (BGD3) laboratuvara göndermekle yükümlüdür (12,13).

İster BGD2, ister BGD3 olsun şarbon şüpheli örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm laboratuvar personeli; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün işlem adımlarında **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir.

Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli, herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

Referans laboratuvar; hasta örneklerinde ve şüpheli çevresel örneklerde etkenin kesin tanımlamasını yapmak ve sahada biyoterör olasılığının hızla incelenebilmesi için ilgili kurumlara sonucu en kısa sürede bildirmekle yükümlüdür.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Şarbon şüphesinde örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir.

Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- *Deri şarbonu için* - Direkt vezikülden eküvyon ile ya da eskar varsa kabuk kaldırılmadan alttan gelen sızıntıdan bir Pastör pipeti yardımıyla veya eküvyon ile örnek alınır (steril sentetik –dakron vb.- eküvyon kullanılmalı). Eküvyon bir taşıma besiyerinin içine daldırılır. Pastör pipetiyle alınan örnek de taşıma besiyerine konur.
 - *Gastrointestinal şarbon için* – Genellikle ağır bir tablodur. Duruma göre;
 - (a) Dışkı örneği alınır. Hastalığın erken döneminde alınmalıdır. Eğer 1 saat içinde kültür yapılamayacaksa bir eküvyon ile Cary-Blair taşıma besiyerine aktarılır ve laboratuvara öyle gönderilir.
 - (b) Ağız, burun ve anüsten gelebilecek kanlı sıvılar eküvyon ile alınıp taşıma besiyerine (Cary-Blair veya Stuart) konur.
 - (c) Kan kültürü örneği ağır vakalarda ya da hastalığın daha geç dönemlerinde tercih edilmelidir.
 - *Akciğer şarbonu için* – Mesleki maruziyet düşünülüyorsa, biyoterör olasılığı ile beraber en az 3 evrede örnek alınması önerilir:
 - (a) Maruziyet sonrası erken dönemde (0-24. saatler arası) - eküvyon ile burun ve boğaz sürüntüleri; baş ve yüzün saçlı kısımlarından sürüntü örnekleri taşıma besiyerine (Cary-Blair veya Stuart) konur ve gönderilir. Hastadan ayrıca indüklenmiş balgam alınmalıdır.
 - (b) Prodromal semptomlar döneminde (24-48 saat) – hastada balgamlı (prodüktif) öksürük varsa kültür ve Gram boyama için balgam alınır. Ancak pnömoni inhalasyon şarbonunda kural değildir (5).
 - (c) Geç dönemde (2-8. günler arası) – kan ve/veya BOS alınır ve gönderilir. Laboratuvara 1 saatte ulaşamayacaksa BOS örneğinin bir kısmı (mümkünse >2 mL) bir pediatrik kan kültür şişesine inoküle edilir ve oda sıcaklığında gönderilir.

NOT: Kan ve BOS asla buzdolabına konmamalıdır!
 - Postmortem doku örnekleri – Asepsiye dikkat edilerek en az 2-3 parça doku örneği (2-3 g) alınmalıdır. Kaba 1-2 mL steril SF eklenir.
 - Çevresel örnekler – Özellikle biyoterör şüphesinde çevresel örnekler de incelenmelidir. Bu örnekler yalnızca Referans Laboratuvarda incelenebilir. Çevresel örnek olarak toprak, yüzey sürüntüleri, su, şüpheli toz içeren zarf gibi örnekler alınıp gönderilir.
- ÖNEMLİ NOT:** Çevresel örneklerin alınması ve gönderilmesi ile ilgili olarak mutlaka Halk Sağlığı Müdürlüğü ile iletişime geçilmelidir.

Örneklerin laboratuvara gönderilmesi

- Vezikül sıvısı ve lezyon sürüntü örnekleri (eküvyonlar), 24 saat fazla gecikme olmayacaksa oda sıcaklığında transfer edilir.
- Dışkı örnekleri, 1 saatten kısa süre için oda sıcaklığında, 1 saatten daha uzun süre gerekiyorsa +4°C'de transfer edilir.
- Balgam örnekleri, 2 saatten kısa sürecek ise oda sıcaklığında, 2-24 saat arasında +4°C'de transfer edilir.
- BOS örnekleri daima oda sıcaklığında laboratuvara gönderilir. 1 saatten kısa süre için doğrudan, 1 saatten daha uzun süre gerekiyorsa bir pediatrik kan kültürü şişesine inoküle edilerek gönderilmelidir.
- Kan örnekleri kan kültürü şişelerine inoküle edilmeli ve oda sıcaklığında laboratuvara gönderilmelidir.

Besiyeri / Reaktif

- Gram boyama reaktifleri
- Temel plak besiyerleri - %5 Koyun Kanlı Agar (KKA), Çikolata Agar, MacConkey Agar
- Triptik Soy Buyyon (TSB)
- Fenil-etil alkol (PEA) agar
- Formol (%10-30'luk)
- Sporlara etkili dezenfektanlar (%0.5 sodyum hipoklorit, %3-6 H₂O₂ veya <%1 perasetik asit)

Diğer gereç, donanım

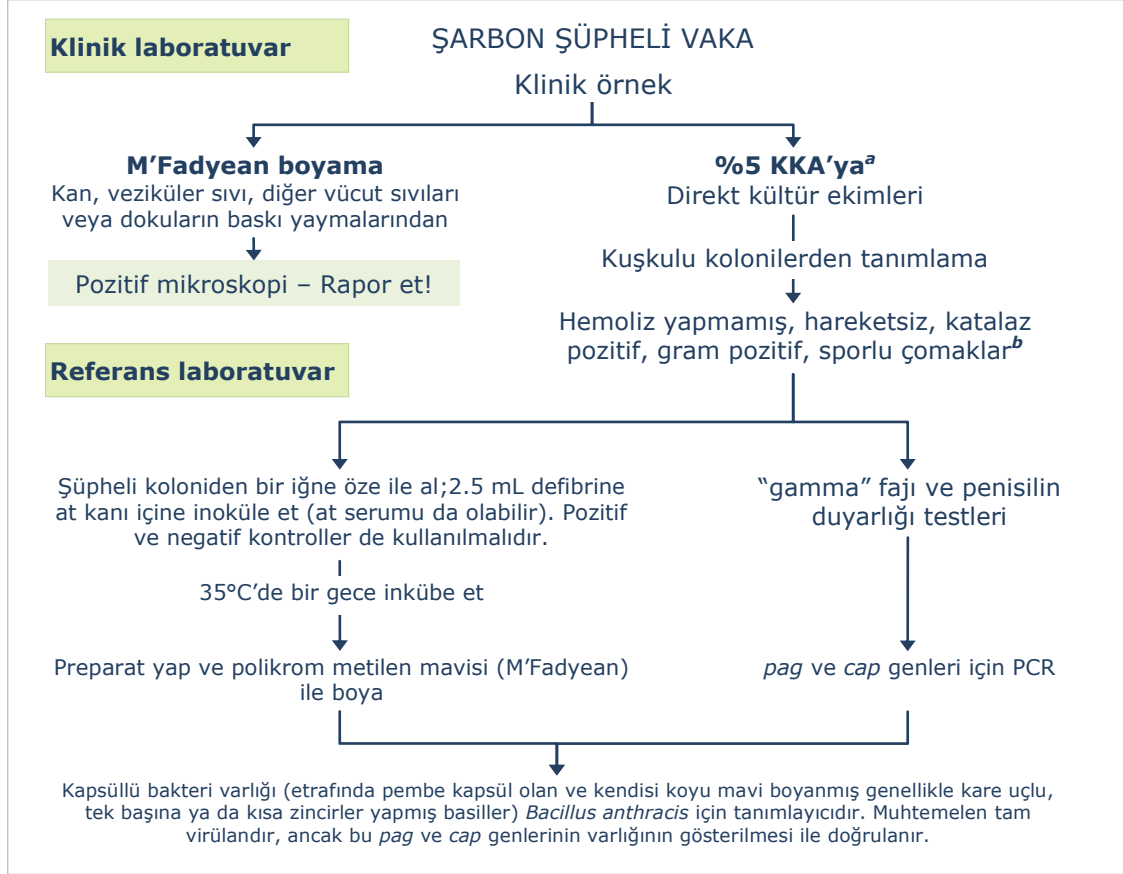
- Sınıf-IIA BGK, sertifikalı
- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.
NOT: 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (14).
- Önceden temizlenmiş lamalar (25×75 mm) – tercihen kenarı rodajlı
- Öze, steril, tek kullanımlık
- Santrifüj

2.4. Kalite kontrol

- Besiyerleri, boyalar ve reaktifler için rutin kalite kontrol işlemleri uygulanmalıdır.
- Veterinerlikte kullanılan aşı suşu (kapsülsüz, avirulan *B.anthraxis* Stern kökeni) %5 KKA'ya ekilip, inkübe edilerek üretilebilir. Elde edilen suş hem eğitim, hem de kalite kontrol amacıyla kullanılabilir.
- Mikroskop belirli aralıklarla (yoğun kullanılıyorsa yılda en az bir kez) kalibre edilmelidir. Tüm objektifler için kalibrasyon faktörleri göz önündeki bir panoda asılı olmalıdır (bkz. UMS, P-TP-01 Mikroskop Kalibrasyonu) (14).

3 Şarbon tanısında kullanılan teknikler

3.1. Şarbon tanısı için akış şeması



Şekil 1. Şarbon şüpheli örneklerden bakterinin tanımlanması süreci için akış şeması.

^a Deri lezyonu ve diğer doku örnekleri KKA, MacConkey ve TSB'ye; balgam bunlara ilave olarak çikolata agara; dışkı KKA, MacConkey ve PEA agara ekilmelidir.

^b Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları ilk izolasyon adımlarından sonra şüpheli izolatları Referans laboratuvara göndermelidirler.

3.2. Örneklerin incelemeye hazırlanması

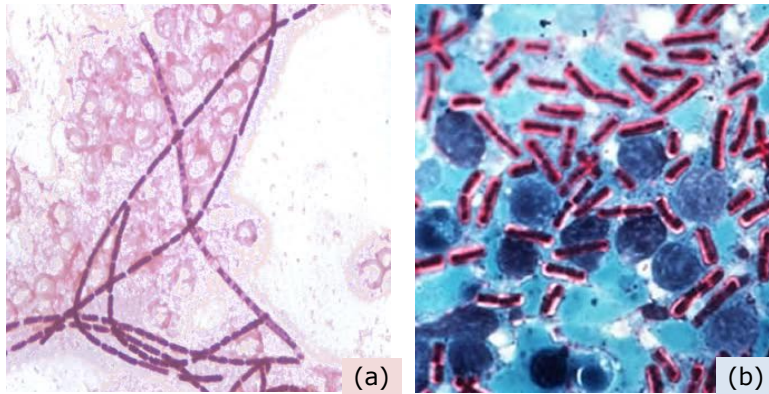
- Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı şarbon şüpheli örnekleri, eğer bir sınıf IIA BGK içinde çalışabilecekse, kabul edebilir. Bu şartı sağlamayan laboratuvar örnekleri doğrudan Referans laboratuvara yönlendirmelidir.
- Her klinik örnekten 2 adet yayma hazırlanmalı ve kültür ekimleri yapılmalıdır (BGK içinde). Örnekler KKA ve diğer uygun besiyerlerine inoküle edilir. Plaklar 35°C'de bir gece inkübasyona kaldırılır (Şekil 1).
- Biyopsi örneğinden yayma, lam üzerine doku parçasının birkaç kez bastırılması ile elde edilir.
- Yaymalar saf metanol ile 1 dakika sabitlenir; biri Gram boyası ile, diğeri de M'Fadyean boyama yöntemi ile boyanır. Kan ve BOS yaymaları ilave olarak Çini mürekkebi ile de boyanır.

ÖNEMLİ: Şarbon şüpheli örneklerden yapılmış preparatlar boyanırken yıkama aşamasında lam içi 10.000 ppm sodyum hipoklorit solüsyonu içeren bir kabın üzerinde tutularak yıkanır.

NOT 1: M'Fadyean boyama herhangi bir 'iyi polikrom hale getirilmiş' metilen mavisi boya (ör., olgunlaştırılmış Loeffler'in metilen mavisi) kullanılarak yapılabilen basit bir boyamadır. Polikrom hale getirme (demetilasyon) Loeffler'in metilen mavisinin morumsu bir renk yakalayana kadar birkaç ay boyunca havaya ve ışığa maruz bırakılması ile elde edilir (Loeffler'in metilen mavisinin hazırlanışı için bkz. UMS, B-TP-14). Ancak oksidasyon süreci ısı uygulaması ile veya son konsantrasyon %1 olacak şekilde K_2CO_3 eklenerek de hızlandırılabilir (1,15).

NOT 2: M'Fadyean boyama kapsülün gösterilmesi için ideal bir boyama yöntemidir. Sabitlenmiş yaymanın üzeri polikrom metilen mavisi ile kaplanır. 30-60 saniye beklenir. Sonra lam yumuşak bir şekilde yıkanır ve mikroskopta incelenir.

- Kan kültürü diğer rutin örnekler gibi işlem görür.



Şekil 2.

(a) Kan kültüründeki üremeden Gram boyalı yaymada *B.anthraxis*'in görünümü (7); (b) doku yaymasından yapılmış M'Fadyean boyamada kapsül görünümü (16).



Şekil 3.

B.anthraxis'in kanlı agar plakta koloni görünümü (7)

3.3. Mikroskopi

- Gram boyamada, büyük, 1-1.5 µm x 3-5 µm boyutlarında gram pozitif basiller görülür. Vejetatif hücrede şişkinlik yapmamış (hücrenin şeklini genişletmemiş) santral veya subterminal yerleşimli oval sporları vardır (bkz. Şekil 2).
- Ancak, klinik örneklerin direkt boyamalarında, eğer atmosferik seviyelerde CO₂'e maruz kalmazlarsa, spor yapıları görülmez (vücuttaki CO₂ düzeyi spor oluşumunu inhibe eder).
- Klinik örneklerin Gram boyamalarında vejetatif hücreler 2-4 basil içeren kısa zincirler şeklinde görülürler. Genellikle spor yapıları ayırt edilmez.
- %5 KKA'da üreyen kolonilerin Gram boyamasında ise kesik uçlu, bambu kamışı izlenimi veren uzun zincirli, kapsülsüz, gram pozitif çomaklar görülür (1,5).
- M'Fadyean boyalı preparat özellikle kapsül varlığının değerlendirilmesi amacıyla kullanılır. İmmersiyon objektifi ile incelemede kapsül, mavi-siyah boyanmış basilleri çevreleyen kırmızımsı pembe (metakromatik) amorf bir yapı şeklinde görülür (1,15).
- Beyin omurilik sıvısı ve kanda basilin kapsül yapısı Çini mürekkebi uygulaması ile daha iyi ayırt edilir. *B.anthraxis* harici diğer türlerde kapsül görülmesi nadirdir.

3.4. Kültürden izolasyon ve ilk tanımlama

- *B. anthracis* 16-24 saatlik inkübasyon sonunda MacConkey agarda üremezken diğer besiyerlerinde (KKA, çikolata, PEA...) ürer (1,4,5,7).
- *B. anthracis* suşları kültürlerde 2-5 mm çapında, düzensiz yuvarlak ve düz veya hafif konveks yapıda, buzlu cam görünümünde, hafif dalgalı kenarları olan koloniler oluşturur (bkz. Şekil 2). Sıklıkla kolonilerin kenarlarında bulunan virgül şeklinde çıkıntılar "Medusa başı" görünümü olarak da tanımlanmaktadır. Koloninin sıkı bir kıvamı vardır; öze ile dokunulduğunda çırpılmış yumurta akı gibi kalkar.
- %5 KKA'da hemoliz oluşturmazlar. Ancak bakterinin yoğun üremesine bağlı olarak koloninin etrafında yeşilimsi hemoliz zonu veren bir renk değişimi görülebilir (1,4).
- Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında morfolojik olarak benzeyen kolonilerden Gram boyama, katalaz ve hareket testi yapılır.
NOT: Şüpheli kolonilerden tanımlama amacıyla yapılacak bütün işlemler mutlaka sınıf-IIA BGK içinde gerçekleştirilmelidir.
- Bu ilk tanımlama testlerinden sonra *B. anthracis* şüpheli (katalaz pozitif, hareketsiz, Gram morfolojisi ve koloni görünümü uyumlu) izolatlar Referans laboratuvara gönderilmelidir (bkz. Şekil 4) (1,5,7).
NOT: *Bacillus megaterium* da hareketsizdir.

3.5. İleri tanımlama testleri

- Referans laboratuvarlarda geleneksel tanımlama teknikleri ve moleküler yöntemlerle doğrulama yapılır.
- Geleneksel teknikler penisilin duyarlılığı, gamma fajına duyarlılık, biyokimyasal testler, sporlanma ve kapsül indüksiyon testleri ile M'Fadyean boyamayı içerir.
- B. anthracis* türleri çoğunlukla penisiline duyarlıdır (bir biyoterör saldırısında penisiline dirençli suşların kullanılabileceği hatırlanmalıdır).



Şekil 4. Bir klinik mikrobiyoloji laboratuvarında *B. anthracis* izolasyonu şüphesinde izlenmesi önerilen adımlar (7).

3.6. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Yukarıda da belirtildiği gibi, klinik laboratuvarlar kendi mikroskopik inceleme bulgularını (pozitif veya negatif) rapor ettikten sonra şüpheli örnekleri ve izolatları Referans laboratuvara gönderirler. Bu amaç için izolatlar bir **yatık** 'nutrient' agar tüpüne (vida kapaklı) pasajlanarak oda sıcaklığında gönderilmelidir.
- Klinik laboratuvarlar şüpheli örnek ve izolatları gönderdikten sonra kalan bütün kontamine mikrobiyolojik kültür plaklarını ve tüplerini otoklavlayarak imha etmelidir.

- Klinik laboratuvar hasta örneklerini ve/veya şüpheli izolatları Referans laboratuvara gönderir. Örneklerin ve izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (12,13) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).
- Referans laboratuvar, izolatların doğrulamalarını yapar, moleküler tiplendirme yöntemleri ile hastadan ve olası kaynaktan elde edilen *B.anthraxis* izolatlarının epidemiyolojik ilişkisi olup olmadığını analiz edebilir, bir salgınla (biyoterör olayı ile) ilişkileri olup olmadığını ortaya koyabilir. Bu incelemeler halk sağlığı önlemleri için ilgili otoritelere yol gösterici sonuçlar üretir.

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Klinik örneklerin (özellikle deri lezyonunun) mikroskopik incelemesi sonucu büyük, gram pozitif, tek veya kısa zincirler yapmış çomaklar gözlenmiş ise hemen klinisyene "*B. anthracis* morfolojisi ile uyumlu bakteriler gözlemlendi" şeklinde rapor edilmelidir.
- Solunumsal şarbon şüphesi ile gelen örneklerde mesleki maruziyet düşünülmüyorsa, diğer en yakın olasılık biyoterör olduğundan pozitif mikroskopi bulguları **hemen** İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne de haber verilmelidir (3).
- Kültürlerde üreme karakteristikleri, koloni morfolojileri, Gram boyama ve diğer tanımlayıcı testlerin (penisiline ve gamma fajına duyarlılık, biyokimyasal testler, sporlanma ve kapsül indüksiyon testleri) sonuçları *B. anthracis* ile uyumlu ise etken "*Bacillus anthracis* üredii" şeklinde rapor edilir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- *B. anthracis* Risk Grubu 3 mikroorganizmadır. Şüpheli bütün örnekler en az BGD2 laboratuvar şartlarında ve mutlaka biyogüvenlik kabini içinde incelenmelidir. Kültürlerde *Bacillus* spp üretilirse, ileri tanımlamalara BGD3 laboratuvarında devam edilmelidir.
- *B. anthracis* izolatlarının kesin tanımlanması için laboratuvarın en az BGD3 gereklerini karşılıyor olması gereklidir.
- *B. anthracis* sporlu bir bakteri olması, sporlarının solunum yolu ile alınabilmesi ve enfektif dozunun düşük olması nedeniyle ideal bir biyoterör ajanıdır. Ayrıca laboratuvar kaynaklı enfeksiyon riski yüksektir.
- Şarbon toksine bağlı bir klinik tabloya sahip olması nedeni ile negatif sonuçlar hastalık olmadığını göstermez. Uygun klinik belirti ve bulguların varlığında, klinik örneklerden yapılmış boyalı preparatlarda kapsüllü, düzgün gram pozitif basillerin görülmesi şarbon tanısını destekler.

6 Referans Laboratuvar

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı
(Bakteriyel Zoonozlar P3 Laboratuvarı)
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok, Zemin kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5435 / 5562 Faks: 0312 565 5455
www.thsk.gov.tr

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (Şarbonun Mikrobiyolojik Tanısı) geçen bazı hususlarda daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda verilen UMS belgelerine başvurulabilir:

- UMS, B-TP-03 Gram Boyama
- UMS, B-TP-10 Katalaz Testi
- UMS, B-TP-04 Hareket Testi
- UMS, B-TP-14 Metilen Mavisi Boyama (Loeffler'in)
- UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Anthrax in humans and animals. WHO Guidelines of Anthrax 2008, p.115-137.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547536_eng.pdf (son erişim tarihi:12.12.2013)
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı 2004, Ankara.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 4 WHO Manual for Laboratory Diagnosis of Anthrax. World Health Organization Regional Office for South-East Asia New Delhi, 2003. http://209.61.208.233/LinkFiles/Reports_anthrax.pdf (son erişim tarihi: 06.02.2014)
- 5 Keck G. Bioterrorism: *Bacillus anthracis*. In: Garcia LS (ed. in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 16.4.1-16.4.8
- 6 Sharp SE, Loeffelholz M. Biothreat agents. In: Versalovic J (ed. in chief). *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 174-187
- 7 Anthrax (*Bacillus anthracis*). Sentinel level clinical laboratory guidelines for suspected agents of bioterrorism and emerging infectious diseases. American Society for Microbiology (ASM). http://www.asm.org/images/PSAB/Anthrax_July23_2013.pdf. (son erişim tarihi: 12.12.2013)

- 8 Logan NA, Hoffmaster AR, Shadomy SV, Stauffer KE. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Versalovic J (ed. in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 381-403
- 9 Weyant RS, Ezzell JW, Popovic T, Lindsay KQ, Morse SA. Basic laboratory protocols for the presumptive identification of *Bacillus anthracis*. In: Bioterrorism Preparedness and Response. 1999
- 10 Gilchrist MJ, McKinney WP, Miller JM, Weissfeld AS. Cumitech 33. Laboratory safety, management, and diagnosis of biological agents associated with bioterrorism. Snyder JW (coordinating ed). ASM Press, Washington D.C. 2000
- 11 Kletmann WF, Ruoff KL. Bioterrorism: Implication for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:364-381
- 12 Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013–2014. World Health Organisation. WHO/HSE/GCR/2012.12, 2012.
- 13 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 14 Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 9.3.2.1-4
- 15 Kiernan JA. Histology FAQ - Staining, Histochemistry and Histotechnology: McFadyean's stain for anthrax bacilli. <http://www.ihcworld.com/faq/histology-faq/stain/s12.htm> (son erişim tarihi: 16.02.2014)
- 16 *Bacillus anthracis*, methylene blue stain. <http://www.merckmanuals.com/vet/multimedia/v4735979.html?Ref=s&ItemId=v4735979&Speed=256&Plugin=WMP&Error=> (son erişim tarihi: 16.02.2014)

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Tulareminin (*Francisella tularensis* enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-21
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizma	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 Tularemia tanısında kullanılan teknikler	8
4 Raporlama, bildirim, transfer	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
EKLER.....	11
Ek-1 MAT testinin yapılışı.....	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	13
KAYNAKLAR.....	13

Kapsam ve Amaç

Tularemi, *Francisella tularensis*'in neden olduğu vahşi-doğa kaynaklı zoonotik bir enfeksiyondur. Enfeksiyöz dozun çok düşük olabilmesi (<10 organizma) ve enfeksiyöz aerosollerle (solunum yoluyla) alınabilmesi *F. tularensis*'i halk sağlığı ve güvenliği açısından riskli bir patojen haline getirmektedir. Nitekim, *F. tularensis* bu özellikleri dolayısı ile Risk grubu 3 mikroorganizma olarak sınıflandırılmış ve biyotehdit ajanları arasında tanımlanmıştır (1,2,3). Bilhassa kültürlerden izolasyon özel laboratuvar şartları gerektirmektedir ve dünyada genellikle referans laboratuvarlarda çalışılmasına izin verilen yüksek riskli bir organizmadır. Ülkemizde de bildirim sisteminde "ihbarı zorunlu hastalıklar" arasında yer almaktadır (4,5).

Anlaşılabacağı üzere, tularemi tanısı klinik mikrobiyolojinin rutin tanı faaliyetleri kapsamına girmemektedir. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol oynayacaktır. Ancak klinik laboratuvarlar tularemi ön-tanısı almadan gelmiş örneklerde bazen farkına varmadan mikroorganizmayı izole edebilirler ve ciddi bir risk doğabilir. Serolojik ve/veya moleküler tanı ise klinik laboratuvarlar düzeyinde konabilir. Her iki duruma yönelik olarak da sahadaki laboratuvarlar için temel bir "hazırlıklılık" yaklaşımına gereksinim vardır. Bu nedenle bu UMS belgesinde asgari laboratuvar şartları, sorumluluklar, örnek yönetimi, tanı süreçleri ve işbirliği için izlenecek temel adımlar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- MAT** Mikroaglutinasyon testi
BCYE Buffered charcoal yeast extract (agar)
EDTA Etilen diamin tetra asetik asit

Genel Bilgi

Tularemi bir zoonotik enfeksiyondur. Ateş, lenf nodlarının tutulumu ve toksik bir tablo ile karakterizedir. Hastalığın nedeni olan *Francisella tularensis* küçük (0.2-0.5 x 0.7-1.0 µm boyutlarında), pleomorfik, hareketsiz, zorunlu aerob, fakültatif hücre içi, gram negatif bir bakteridir. Toksin üretmeyen ve ince lipopolisakkarid yapıda bir kapsülü bulunan bakteri dış ortam şartlarına fazla dayanıklı değildir (6).

Doğadaki rezervuarları tavşanlar, su-sıçanları ve tarla fareleridir. Doğal odaklarda periyodik salgınlar (epizootikler) gerçekleşir.

Tularemi, ülseroglandüler, glandüler, oküloglandüler, orofaringeal, respiratuvar ve tifoid olmak üzere altı klinik formda seyredebilir (7,8).

Etkenin vücuda giriş yolu ile tularemiye gözlenen klinik formlar arasında bir ilişki vardır. Orofaringeal formda kontamine su veya yiyecek alımı; oküloglandüler formda kontamine el ile göze temas veya aerosoller; ülseroglandüler ve glandüler

formlarda kene, sinek gibi vektörler, enfekte hayvan ya da dokuları ile temas (avcılar); ve respiratuvar formda ise laboratuvar ortamında aerosol maruziyeti veya dışarıda kontamine toz, saman inhalasyonu (tahıl veya yem ürünlerini işleme) ile bulaş rol oynamaktadır. Tifoidal (sistemik) formda vücuda giriş yolu tam bilinmemektedir (1,3,5,6). İnsandan insana geçiş bildirilmemiştir (1).

Tulareminin klinik bulguları *F.tularensis*'in virulansına, giriş yoluna, alınan bakteri miktarına ve kişinin bağışık yanıtına bağlı olarak değişmektedir. Asemptomatik bir seyrinden sepsise kadar değişebilen klinik tablolar görülebilmektedir (1,6).

Kuluçka süresi 1-21 gün arasında (ortalama 3-5 gün) olabilir. Hastalık aniden başlar, üşüme ile ateş 38-40°C'ye çıkar. Halsizlik, baş ağrısı, kas ağrısı, iştahsızlık, boğaz ağrısı (farenjit), öksürük ve göğüs ağrısı eşlik eder. Daha nadir olarak bulantı, kusma görülebilir. Semptomlar özgül değildir. Etkenin giriş bölgesinde bir ülser olabilir. Ateş genellikle 2-4 gün sürer, tedavi edilmeyen olgularda semptomlar günlerce (30 günden fazla) devam edebilir. Tulareminin başlangıç formlarından herhangi biri bakteremik yayılımla pnömونيye veya daha nadir olarak sepsise ya da menenjitte ilerleyebilir. Olguların yaklaşık yarısında rölatif bradikardi görülür (1,6,7,9).

F. tularensis aerosolize formda yüksek düzeyde enfeksiyözüdür. Solunum yolu ile enfeksiyöz dozu 10-50 organizma kadar düşük olabilmektedir. Tarih boyunca bir biyolojik silah olarak kullanımı yolunda pek çok girişim olmuştur. 2. Dünya Savaşında Japonlar biyolojik silah olarak *F.tularensis*'in kullanımı üzerine araştırma yürütmüşlerdir. Amerika Birleşik Devletleri de 1950'ler ve 60'larda aerosol olarak salınabilen *F.tularensis* silahları üretmişler; 1973'de bu silahları imha etmişlerdir. Sovyetler Birliği ise sadece *F.tularensis*'i değil, aynı zamanda antibiyotik-dirençli suşlarını biyolojik silah olarak üretmişler (2,3). 1969 yılında DSÖ'nün yürüttüğü bir tahmin çalışmasına göre, 50 kg'lık *F.tularensis* ürününün, gelişmiş bir ülkede bir metropolün üzerine aerosol olarak salınması halinde 250.000 kişinin hastalanmasına ve 19.000 kişinin ölümüne neden olacağı hesaplanmıştır. Böyle bir olayda vakaların en çok pnömönik formda olacağı ve tedavisiz olgularda ölüm oranlarının %30-50 olacağı düşünülmektedir (2,3,7).

Enfeksiyöz dozunun çok düşük (<10 bakteri) olabilmesi ve aerosol yayılma potansiyeli nedeniyle *F. tularensis* **laboratuvar kaynaklı** enfeksiyonların da en sık görülen nedenleri arasındadır (9,10,11).

F. tularensis Kuzey Yarımkürede yaygın bir mikroorganizmadır ve yakın dönemde pek çok ülkede, en önemlileri de Norveç'te ve Türkiye'de kaydedilmiş olan tularemi salgınlarından sorumludur (9,12,13,14,15).

Tularemi gerçekte bir kırsal bölge hastalığıdır ve geçmişte de büyük epidemiler yapmıştır. Ülkemizde başta Marmara, Batı Karadeniz, İç Anadolu Bölgesi olmak üzere tüm coğrafik bölgelerden salgın veya sporadik olgular şeklinde bildirilmektedir (13,14,16).

Hastalığın kesin tanısı laboratuvar incelemesine dayanır. Bakterinin kültürlerden izolasyonu veya serolojik incelemede çift serum örneğinde serokonversiyonun ya da özgül antikor titrelerinin dört kat arttığının gösterilmesi tanı koydurucudur. Hastalığın görece nadir olması nedeniyle PCR'in tanıdaki rolüne dair henüz yeterince veri toplanmış değildir. Ülseroglandüler form örneklerinde geleneksel PCR'a dayalı başarılı tanı uygulamaları vardır. Yakınlarda çeşitli klinik örneklerde gerçek-zamanlı PCR tekniği ile uygulamalar da yayınlanmıştır. Ancak, PCR'a dayalı teknikler henüz *F. tularensis*'i *F.novicida*'dan ayırt edememektedir (6).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Francisella tularensis

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

F.tularensis Risk Grubu 3 mikroorganizmadır ve yüksek aerosol bulaş potansiyeli taşır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyona neden olabilir. Tularemi kuşkulu klinik örneklerin ilk işlemleri BGD2 laboratuvar şartlarında yapılabilir. Eğer Gram boyama ve/veya kültürler *F.tularensis* olasılığına işaret ediyorsa bütün işlemler kesinlikle sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılmalı ve BGD3 laboratuvarında devam edilmelidir. Bütün işlemlerde **mutlaka** eldiven ve -önü ve kolları tam kapalı- laboratuvar önlüğü kullanılmalıdır!

Klinik dışı örnekler (çevresel veya hayvan örnekleri) kesinlikle hastane laboratuvarı şartlarında işlenmemelidir. Kültürlerin değerlendirilmesi, pasajlar, biyokimyasal testler, antibiyogram, antijen üretimi gibi bakterinin yoğun üretimi ile sonuçlanan çalışmalar BGD3 laboratuvarında yapılmalıdır.

Yüzey dekontaminasyonu için çamaşır suyu (1:10 sulandırılmış, taze hazırlanmış) kullanılmalıdır. Laboratuvarın içinde otoklav bulunmalı, tüm kültürler, işi bittikten sonra hemen otoklavlanmalıdır.

Serolojik ve moleküler tanı BGD2 laboratuvarında gerçekleştirilebilir. Serum veya plazma örnekleri ile çalışırken en ciddi risk personele kan-kaynaklı patojenlerin (HIV, hepatit etkenleri) bulaşma riskidir. Serum/plazma ayırma ve testlerin yapılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir. Bütün düzeylerde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen tularemiden şüpheleniyorsa örnekleri laboratuvara göndermeden önce, *yüksek laboratuvar-kaynaklı enfeksiyon olasılığı nedeniyle*, laboratuvar ile iletişim kurmalı, haber vermelidir.

Tularemi şüpheli örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir.

Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır. Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. İnceleme örnekleri

Alınacak örnekler hastalığın klinik formuna göre belirlenir. Örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serum - Serolojik tanı için, akut ve konvalesan fazlarda olmak üzere, hastadan 10-21 gün ara ile 2 kez alınmalıdır.
- Kan kültürü için kan örneği - Ateşin ilk yükselmeye başladığı dönemde alınır (1). Antibiyotik başlamadan önce ve ateşin yükselme evresinde alınmış 3 örnek yeterlidir; antibiyotik başlanmışsa 48 saat içinde 6 örnek alınır. Kan alınır alınmaz kan kültürü şişesine aktarılır. Kan kültürü şişeleri asla buzdolabına konmamalıdır!
- PCR için kan - EDTA'lı veya sodyum sitratlı steril bir tüpe >1 mL alınır.
- Doku biyopsi örnekleri - SF içeren steril bir tüpte veya Amies besiyeri içinde gönderilebilir. Kesinlikle formol içermemelidir.
- Lenf bezi (yumuşak doku) aspiratı - Örnek enjektör ile aspire edilerek (eğer süpürasyon yoksa doku içine 0.5-1 mL steril SF enjekte ettikten sonra aspirasyon yapılarak) alınır. Aspirat steril vida kapaklı tüpe aktarılır; enjektör içinde gönderilmez. Enjektörle nakli kaçınılmaz ise iğne atılır ve bir 'Luer-Lok' (enjektör ucu için sızdırmaz kapak) takılır. *Enjektör **asla** üzerinde iğne ile laboratuvara gönderilmemelidir!*
- Balgam ve diğer solunum yolu örnekleri de alınıp gönderilebilir.
- Kültür için boğaz sürüntüsü, konjonktival sürüntü, ülser sürüntüleri alınıp gönderilebilir. Eküvyon yüzeyini kaplayacak kadar örnek alınmalıdır. Eküvyonlar Amies taşıma besiyerine daldırılarak gönderilir.
- İnvaziv girişim gerektiren bütün örnekler aseptik şartlarda hekim tarafından alınmalıdır.

2.4. Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi

- Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi ile ilgili 2 olasılık vardır:
 - (a) Birincisi, sağlık kurumuna başvuran vakada klinik ve epidemiyolojik bulgulara dayanılarak tularemiden şüphelenilmesi - Bu durumda örnekler doğrudan Referans laboratuvara gönderilir.
 - (b) İkincisi, tularemiden şüphe edilmeden örneklerin (ör., rutin inceleme için kan kültürü) klinik laboratuvara gönderilmiş olduğu, ancak incelemeler sürerken etkenin *F.tularensis* olabileceğinin düşünüldüğü durum- böyle bir durumda o ana kadar elde edilmiş izolatlar ve saklanmış örneklerin hepsi hemen Referans laboratuvara gönderilir (ayrıca bkz. "3.1. Ön hazırlık ve gerekler").
- Şüpheli örnekler İl Halk Sağlığı Müdürlüğü kanalıyla Referans laboratuvarına gönderilir. Bu nedenle en kısa sürede İl Halk Sağlığı Müdürlüğü ile iletişime geçilmelidir. Örnekleri göndermeden önce Referans laboratuvarla da telefon bağlantısı kurulmalıdır. Örnekler daima hasta hakkında gerekli bilgileri içeren bir form ile birlikte gönderilmelidir.

- Kan örnekleri oda sıcaklığında, diğer örnekler soğuk zincirde nakledilirler. Kan örnekleri 18 saat içinde laboratuvara ulaşmalıdır. Diğer örnekler 2 saat içinde oda sıcaklığında veya 24 saate kadar +4°C'de taşınabilirler. Serum örneğinin laboratuvara ulaşması 48 saati geçecek ise dondurulmalı ve kuru buz içinde gönderilmelidir.
- Örneklerin/izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (17,18) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

2.5. Besiyeri, Reaktif, Kit, Donanım

Besiyeri/Reaktif

- Serolojik testler için – MAT reaktifleri (bkz. Ek-1) ve/veya ELISA
- Kan kültürü şişeleri/sistemi – Kan, kemik iliği ve vücut sıvıları için ticari hazır otomatik kan kültürü sistemi kullanılmalıdır. Agar ve sıvı fazlı bifazik sistemler ya da bir lizis-santrifügasyon sistemi kullanılabilir.
- Primer ekimler ya da pasajlar için besiyerleri:
 - (a) Genel besiyerleri – Koyun kanlı agar, çikolata agar, MacConkey agar veya EMB agar
 - (b) Sistein kalp agar – Piyasadan temin edilir. Kültürden *F. tularensis* izolasyonunda öncelikli besiyeridir. Thayer-Martin veya BCYE agar da sistein destekli besiyeri olarak kullanılabilir (9).
 - (c) Sistein destekli sıvı besiyeri – %1 IsoVitalax'li tiyoglikolat buyyon
- Tanımlamada kullanılacak test reaktifleri
 - (a) Gram boyama reaktifleri (bkz. İlgili diğer UMS belgeleri)
 - (b) Katalaz, oksidaz, üreaz, β -laktamaz, X/V faktör gereksinimi testleri için reaktifler (bkz. İlgili diğer UMS belgeleri)
- Uygun dezenfektan (%10'luk çamaşır suyu, taze hazırlanmış)

Diğer gereç, donanım

- Biyogüvenlik kabini, sınıf IIA
- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Santrifüj

2.6. Kalite kontrol

- Uzun süre depolanan besiyeri plakları nem kaybına uğrayabilir; içeriğin madde yoğunluğu artabilir ve üremeyi baskılayıcı özellik kazanabilir. Kullanmadan önce besiyerlerinin son kullanma tarihi içinde olduğundan emin olunmalıdır. Son kullanma tarihi dolmamış olsa da eğer kuruma, çatlak vb. gözlenirse, o besiyeri plakları kullanılmamalıdır.
- Her zaman kitin kontrol serumları kitin talimatına göre teste dahil edilmelidir. Laboratuvar aynı zamanda kendi kalite kontrol serumlarına veya örneklerine sahip olmalı ve testlere dahil etmelidir.
- Bütün donanımın bakım ve kalibrasyonları düzenli yapılmış olmalıdır.
- Bütün kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Tularemi tanısında kullanılan teknikler

3.1. Ön hazırlık ve gerekler

- Klinik materyal mutlaka bir sınıf IIA **biyolojik güvenlik kabini** içinde, normal laboratuvar protokolleri çerçevesinde işlenir; boyamalar için preparatlar hazırlanır ve kültür besiyerlerine ekimler yapılır.

ÖNEMLİ NOT: Bir vakada, tularemi akla gelmeksizin örnekleri alınmış ve klinik laboratuvara gönderilmiş olabilir. Bir klinik laboratuvar kendisine "tularemi ön-tanısı" almadan gönderilmiş böyle örnekleri incelemeye almış olabilir.

Laboratuvar, eğer kural olarak solunum yolu örneklerini ve invaziv yöntemlerle alınmış bütün klinik örnekleri bir biyolojik güvenlik kabininin içinde işleme alıyorsa (yayma hazırlanması, pasajların yapılması vb.) ve genel olarak asgari BGD2 gereklerini karşılıyor, standart güvenlik önlemlerini sistematik olarak uyguluyorsa, bu örneklerle çalışma bir sorun teşkil etmez. Ancak, kültürlerden ilk izolasyonları takiben *F.tularensis* şüphesi doğduğu andan itibaren izolatlar ve saklanmış klinik örnekler Referans laboratuvara nakledilmelidir.

- Kültür ekimleri için besiyeri seti içinde kanlı agar, MacConkey Agar, çikolata agar, bir sisteinli plak besiyeri (sistein kalp agar, BCYE agar vb.) ve buyyon bulunmalıdır.
- Plaklar %5-10 CO₂ içeren atmosferde, 35°C'de, yüksek nemli ortamda (inkübatör içine su tepsisi konarak) inkübasyona kaldırılır.
- Kan kültürleri de normal laboratuvar protokolleri çerçevesinde işlenir. Eğer kan kültürü üreme sinyali verirse, yukarıda tarif edildiği gibi, preparatlar hazırlanır ve agar plaklara pasajları yapılır.
- Zıt-boyayı güç alan bir bakteri olduğu için klinik örneklerin preparatlarında bakteri ayırt edilemeyebilir. Bu nedenle örneklerden mikroskopik inceleme için boyalı preparat yapılması anlamlı değildir.
- Serum test gününe kadar derin dondurucuda saklanır.

3.2. Kültür

- Bir klinik laboratuvarında kültürden ilk izolasyonu takiben *F.tularensis* şüphesi doğduğu takdirde (katalaz ve oksidaz negatif, Gram boyamada güç zıt-boyanan çok küçük kokobasiller) izolatlar ve saklanmış klinik örnekler Referans laboratuvara (BGD3) nakledilmelidir.
- İlk izolasyon süresi 3-7 gündür. Bazen daha uzun sürebilir.
- Klinik laboratuvarlarda ticari tanımlama sistemlerinin -işlem esnasında aerosol üretimi olasılığı yüksek olduğu için- *F. tularensis* şüpheli izolatların tanımlanmasında kullanılması önerilmemektedir. *F.tularensis* en sık *Haemophilus influenzae* (satellit veya XV pozitif) ve *Aggregatibacter* spp (eski adı *Actinobacillus* spp dahil; β -laktamaz negatif) ile karışabilir (9).

3.3. Seroloji

- *F.tularensis*'in yüksek riskli bir patojen olması, kültürünün zaman alıcı ve kültürden izolasyon duyarlılığının düşük olması nedeniyle günümüzde serolojik testler tercih edilmektedir (6).
- MAT, tulareminin serolojik tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test olup "referans serolojik yöntem" olarak kabul edilmektedir.
- MAT kolayca uygulanabilen ve hızlı bir testtir ve tanıda en çok tercih edilen yöntemdir. Test için çok az miktar antijene gereksinim vardır.
- Test bir mikropakta hasta serumunun dilüsyonu sonrası *F.tularensis* antijeni (ölü bakteri süspansiyonu) eklenerek aglütinasyon olup olmadığının gözlenmesine dayanır. Testin uygulanması ve değerlendirilmesi için bir prosedür **Ek-1**'de verilmiştir.
- MAT ile 10-21 gün ara ile alınan çift serum örneğinde antikor titrelerinin negatiften pozitif değişmesi (serokonversiyon) veya antikor titresinin dört kat artışı tularemia tanısı koydurur (1,6).
- Serokonversiyonun beklenmesi tanıda gecikmeye neden olabildiği ve ayrıca genellikle hastalardan tek bir serum örneği alınabildiği için, çoğu kez tek serum örneğinde gözlenen titreler üzerinden değerlendirme yapılır.
- Tek serum örneğinde MAT ile elde edilen $\geq 1/160$ antikor titresi de akut tularemia için "kesin tanı" bulgusu olarak değerlendirilmektedir (daha detaylı bilgi için bkz. "Sağlık Bakanlığı Tularemia Hastalığının Kontrolü için Saha Rehberi")(5).
- Serumda IgM, IgG ve IgA varlığının araştırılması amacıyla ticari ELISA kitleri de geliştirilmiştir (1,6,10).
- ELISA yüksek duyarlılığı, otomatize çalışma potansiyeli ve sero-epidemiolojik saha araştırmalarına kolay uygulanabilmesi nedeniyle avantajlı bir yöntemdir. Son yıllarda ELISA'nın ticari olarak üretilmesi tularemia tanısında standardizasyon sağlamıştır. Ancak ELISA ile titre tayin edilememesi bir dezavantajdır (1,6,10).

3.4. Moleküler

- Tularemia tanısında PCR kullanılabilir ancak elde edilen pozitif sonuçlar "olası tanı" bulgusu olarak değerlendirilmektedir (1,6).
- Geleneksel PCR'ın tanı amacıyla en çok ülseroglandüler form örneklerinde başarılı uygulamaları vardır; bu çalışmalarda *Francisella* cinsine özgü *tul4* gen bölgesinin amplifikasyonuna dayanan PCR ile duyarlılığın (%75) kültürlerin duyarlılığından (%62) daha yüksek olduğu gözlenmiştir.
- Yakınlarda çeşitli klinik örneklerde gerçek-zamanlı PCR tekniği ile uygulamalar da yayınlanmıştır. Ancak, PCR temelli uygulamaları sınırlandıran en önemli faktör henüz *F. tularensis*'in *F. novicida*'dan ayırt edilememesidir (6).

4 Raporlama, bildirim, transfer

- Kùltùrlerden ilk değerlendirmeler sonrası aşağıdaki özellikleri gösteren bakteri izolatları *F.tularensis* olasılığı ile Referans laboratuvara gönderilmelidir:
 - (a) Gram boyamada güç zıt-boyanan çok küçük kokobasiller
 - (b) Kanlı agar besiyerinde zayıf üremiş veya ürememiş, çikolata agarda 48 saatte gri-beyaz koloniler
 - (c) MacConkey agarda 48 saate üreme göstermeyen, *S.aureus* etrafında satellit üreme göstermeyen,
 - (d) Oksidaz negatif, katalaz zayıf pozitif veya negatif ve β -laktamaz pozitif.
- İzolatları göndermeden önce Referans laboratuvar ile iletişime geçilmelidir (bkz. 2.4 Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi).
- Örnekleri gönderen hekime *F.tularensis* olasılığı ile Referans laboratuvara gönderildiği bilgisi verilmelidir.
- Akut dönemde alınmış tek serum örneğinde MAT ile elde edilen $\geq 1/160$ antikor titresi "kesin tanı" bulgusudur.
- Konvalesan faz (2-6 hafta sonra) serum örneğinde MAT ile ilk serum örneğine göre 4 kat titre artışı saptanması "kesin tanı" bulgusudur.
- MAT sonuçları rapor edilirken testte saptanan titreler yazılmalı, tanısal değerler belirtilmelidir (bkz. Ek-1).
- ELISA ile elde edilen sonuç "pozitif" veya "negatif" olarak rapor edilir.
- PCR ile elde edilen sonuç "pozitif" veya "negatif" olarak rapor edilir.
- Tularemia ÷lkemizde bildirim zorunlu bir hastalıktır (4,19). Hastanın raporu hekime gönderilirken, hemen harekete geçebilmeleri için ilgili birimler de sonuç hakkında bilgilendirilmelidir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Serolojik çalışmalarda *F.tularensis* antijenleri ile *Brucella* ve *Yersinia enterocolitica* ile çapraz reaksiyon gör÷lebilir. Hastalığın ilk haftasında yalancı negatif sonuçlar elde edilebilir.
- *F.tularensis* bakterisinin enfektif dozu çok düş÷ktür ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyon riski yüksektir. Şüpheli bütün örnekler kesinlikle BGK içinde işlenmeli, kùltùrlerden *F.tularensis* şüpheli izolatlar elde edilmesi halinde işleme BGD3 laboratuvarında devam edilmelidir (11,20).
- Solunum yolu örneklerinden *Legionella* kùltùrleri yapan laboratuvarlar BCYE agarda *F.tularensis* üreyebileceğini akılda tutmalıdırlar.
- Henüz *F.tularensis* için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir PCR tekniği geliştirilememiştir.

Ekler

Ek-1 MAT testinin yapılışı

Reaktif/Donanım

- *Francisella tularensis* boyalı antijeni
- Mikroaglutinasyon (MAT) dilüenti - %0.4 formaldehit içeren SF (2 mL formaldehit 498 mL SF ile karıştırılarak hazırlanır).
- Mikroplak, 96 çukurlu, U tabanlı
- İnkübatör (36°C ±1°C)
- Otomatik pipetler - tek kanallı 2-20 µL ve çok kanallı 50 µL)
- Pipet ucu
- Plastik küvet

Kalite kontrol

- Her testle birlikte negatif, pozitif ve antijen kontrolü çalışılır (bkz. Şekil.2).
- Negatif kontrolde düşme tarzında çökme, pozitif kontrolde $\geq 1/160$ titrede dantela tarzında çökme, antijen kontrolde düşme tarzında çökme testin çalıştığını gösterir.

Testin yapılışı (21,22,23,24)

- 1 Çalışmanın başlangıcında MAT çalışma formu doldurulur. Değerlendirmeler bu form üzerine kaydedilir.
- 2 Çalışılacak örnek sayısı ve kontrollere göre mikroplak üzerinde kodlama yapılır.
- 3 A sırasındaki çukurlara (pozitif ve negatif kontrol serumları ve hasta örneği sayısı kadar) 90 µL ve B→H çukurlarına 50 µL örnek dilüenti konulur (bkz. Şekil 2).
- 4 A1'e pozitif kontrol serumu, A2'ye negatif kontrol serumu ve A3'den itibaren (A3→A12) hasta serumları olacak şekilde serumlardan 10'ar µL konulur ve pipetleme yapılarak karıştırılır (bkz. Şekil 2).
- 5 Her serum karışımının 50 µL'si, kendi altındaki çukura aktarılır, pipetlenir ve bu B'den G'ye kadar aynı şekilde tekrarlanarak iki katlı serum dilüsyonları elde edilir (1/10→1/640).
- 6 En son G çukurunda pipetleme yapıldıktan sonra 50 µL çekilerek pipet ucu ile birlikte kesici-delici atık kutusuna atılır (bkz. Şekil 2).
- 7 H sırasındaki çukurlar sadece dilüent içerir ve "antijen kontrol" olarak kullanılır.
- 8 Bütün çukurlara (çukur A→G) 50'şer µL *F.tularensis* MAT antijeni eklenir. Böylece 1:20'den →1:1280'e son dilüsyonlar elde edilmiş olur.
- 9 Elle mikroplak kenarına hafifçe vurarak (20 sn kadar) antijen ve serumların karışması sağlanır veya mikroplak düşük hızlı karıştırıcı üzerine konarak reaktiflerin karışması sağlanır.
- 10 Mikroplağın üzeri kapakla kapatılarak nemli ortamda 37°C'de 18-20 saat inkübe edilir.

Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

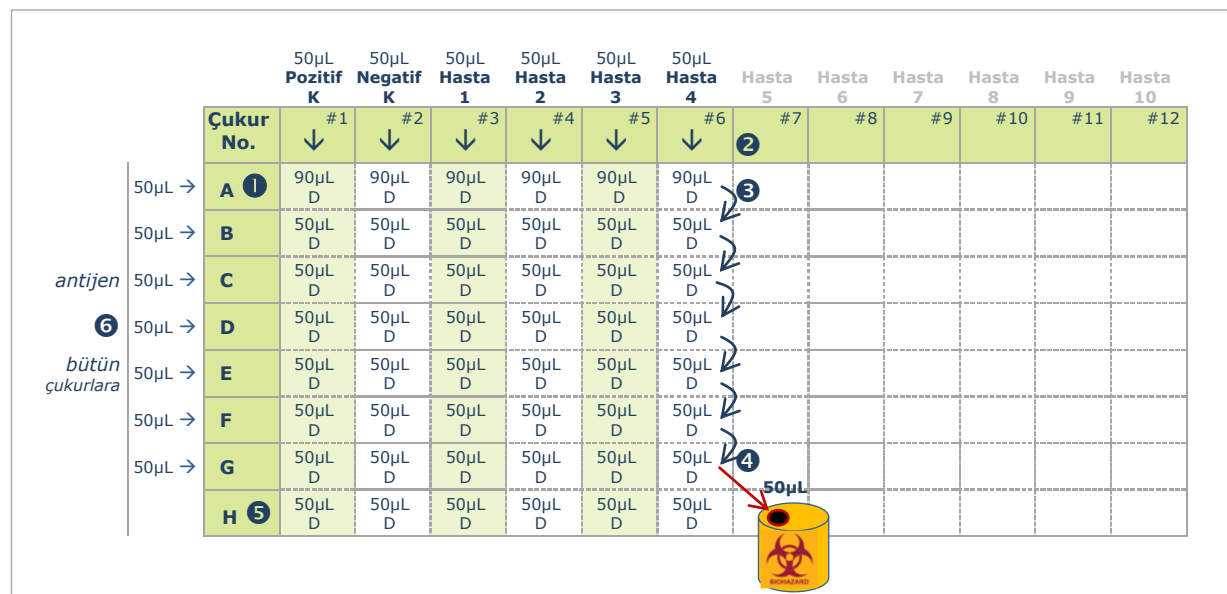
- Dipte **düğme tarzında çöküntü** aglütinasyon olmadığı (antikor bulunmadığı) anlamına gelir. Dipte **dantela tarzında görüntü**, aglütinasyon olduğu (antikor bulunduğ) anlamına gelir.
- Dantela şeklinde aglütinasyon $<1/160$ dilüsyon ise sonuç *F.tularensis* enfeksiyonu için "negatif" olarak değerlendirilir.

NOT: 1/20-1/80 titreler arasında aglütinasyon gözlenmiş ise sonuç "negatif" olarak raporlanır. Ancak raporda, 7-10 gün sonra yeni bir örnekle testin tekrarı önerilir.

- Dantela şeklinde aglütinasyon $\geq 1/160$ dilüsyon görüldüğünde ise sonuç *F.tularensis* enfeksiyonu için "**pozitif**" olarak değerlendirilir.
- Raporda hem titre verilir, hem de negatif veya pozitif şeklinde yorum eklenir.

Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- İnkübasyon alanında ve değerlendirme aşamasında sarsıntıya neden olacak donanım bulunmamalıdır. Titreşim aglütinasyonun dantela şeklini bozar ve düğme şeklinde bir çökmeye sebep olabilir. Bu görüntü de yanlışlıkla negatif olarak yorumlanabilir.
- Test, *Brucella* spp ve *Yersinia enterocolitica* ile çapraz reaksiyonlar verebilir.



Şekil 2. *F.tularensis* MAT testinin yapılışı için şematik diyagram. (K, kontrol)

- ➊ İlk sıraya 90 µL, alt sıralara 50 µL dilüent dağıtılır.
- ➋ İlk sıradaki çukurlara sırayla pozitif, negatif kontrol serumları ve hasta serumları 50 µL ilave edilir.
- ➌ Her serum ilavesi yapıldığında, pipetlenerek karıştırılır ve 50 µL alınarak bir alt çukura aktarılır; tekrar pipetlenerek karıştırılır ve işlem G çukuruna kadar sürdürülür. Böylece her serumun iki kat seri dilüsyonu yapılmış olur (1/10→1/640). (NOT: Daha fazla dilüsyon yapılması gerekiyorsa mikropalak sıra ve sütunu yer değiştirilerek çalışılabilir).
- ➍ G çukurundan 50 µL alınarak atılır (pipet ucu ile birlikte, kesici-delici atık kutusuna!)
- ➎ H çukurunda dilüent “antijen kontrol” için kalır.
- ➏ Bütün çukurlara *F.tularensis* antijeninden 50 µL konur. Böylece serumların son dilüsyonları 1/20’den → 1/1280’e şeklinde olur.

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (Tulareminin Mikrobiyolojik Tanısı) geçen bazı hususlarda daha ayrıntılı veya ilave bilgi için aşağıda verilen UMS belgelerine başvurulabilir:

UMS, B-TP-03 Gram boyama

UMS, B-TP-10 Katalaz testi

UMS, B-TP-16 Oksidaz testi

UMS, B-TP-22 Üreaz testi

UMS, B-TP-23 X, V ve XV faktör gereksinimi

UMS, B-MT-06 Lejyoner hastalığının mikrobiyolojik tanısı (BCYE besiyeri için)

UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO Guidelines on tularemia. World Health Organization. WHO /CDS/EPR/2007.7
- 2 Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EA. Biological Warfare: A Historical Perspective. *JAMA* 1997;278:412-417
- 3 McLendon MK, Apicella MA, Allen LAH. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol* 2006;60:167-85.
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı 2004, Ankara.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 Tularemia Hastalığının Kontrolü için Saha Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı 2011, Ankara
- 6 Petersen JM, Schrieffer ME, Araj GF. *Francisella* and *Brucella*. In: Versalovic J (editor in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed., ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 751-769
- 7 Sjøstedt A. Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1105:1-29
- 8 Hornick RB. Tularemia. In: Alfred SE, Philip SB (eds). *Bacterial Infections of Humans Epidemiology and Control*. Plenum Publishing Co. New York. 1991, p. 787-802.
- 9 *Francisella tularensis*. Sentinel level clinical laboratory guidelines for suspected agents of bioterrorism and emerging infectious diseases. American Society for Microbiology (ASM). Third revision, July 2013. <http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 10 Luper D. Tularemia. Bioterrorism. In: Garcia LS. (ed in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 16.8.1-3
- 11 Shapiro D, Schwartz DR. Exposure of laboratory workers to *F.tularensis* despite a bioterrorism procedure. *J Clin Microbiol* 2002;40:2278-81
- 12 Larssen KW, Afset JE, Heier BT, Krogh T, Handeland K, Vikøren T, Bergh K. Outbreak of tularemia in central Norway, January to March 2011. *Euro Surveill* 2011;16(13). pii: 19828.
- 13 Dikici N, Ural O, Sümer S, Öztürk K, Albayrak Yiğit O, Katlanır E, Keleş B. Konya bölgesinde tularemia. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(2):225-35.
- 14 Ulu-Kilic A, Gulen G, Sezen F, Kilic S, Sencan I. Tularemia in central Anatolia. *Infection* 2013;41(2):391-9.

- 15 Simşek H, Taner M, Karadenizli A, Ertek M, Vahaboğlu H. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012. Mar 3. <http://www.springerlink.com/content/n63702q3w7667536/fulltext.pdf>.
- 16 Gürcan Ş, Eskiocak M, Varol G, Uzun C, Tatman-Otkun M, Şakru N, Karadenizli A, Karagöl Ç, Otkun M. Tularemia re-emerging in European Part of Turkey after 60 years. *Jpn J Infect Dis* 2006;59:391-3. <http://www.nih.go.jp/JJID/59/391.html>
- 17 WHO. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013–2014. World Health Organisation. WHO/HSE/GCR/2012.12, 2012.
- 18 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 19 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 20 Singh K. Laboratory acquired infections. *Clin Infect Dis* 2009;49:142–7
- 21 *Francisella tularensis* MAT Antijeni (Safranin-O ile) Hazırlama Çalışma Talimatı. THSK, Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı. 2012.
- 22 Brown SL, McKinney FT, Klein GC, Jones WL. Evaluation of Safranin-O stained antigen microagglutination test for *Francisella tularensis* antibodies. *J Clin Microbiol* 1980;11(2):146-8.
- 23 Sato T, Fujita H, Ohara Y, Homma M. Microagglutination test for early and spesific serodiagnosis of Tularemia. *J Clin Microbiol* 1990;28(10):2372-4.
- 24 Özçürümez MP, Kischel N, Priebe H, Splettstösser W, Finke EJ, Grunow R. Comparision of ELISA, WB, microagglutination, IFA and flowcytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(6):1008-1015.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Q Ateşinin (*Coxiella burnetii* enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-22
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Patojenin özelliği	3
Epidemiyoloji ve bulaş.....	3
Klinik özellikleri	4
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Q ateşi tanısında kullanılan teknikler.....	9
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	12
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Q (Query) ateşi *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu dünya genelinde yaygın bir zoonozdur. *C. burnetii* vahşi ve evcil memeliler, kuşlar ve kene gibi artropotlar olmak üzere geniş bir rezervuara sahiptir (1,2). *C. burnetii* yüksek aerosol bulaş potansiyeli nedeniyle biyotehdit ajanları arasında sınıflanır ve kültürleri ile çalışan laboratuvarlarda sık laboratuvar kaynaklı enfeksiyon nedenidir (3).

Q ateşi ülkemizde bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde yer alır (4,5).

Semptomların özgül olmayışı tanıyı güçleştiren bir faktördür. Vakaların genellikle gözden kaçtığı ve olduğundan az rapor edildiği düşünülmektedir (6). Tanı öncelikle serolojiye dayanır. Etkili bir sürveyans laboratuvar tanısı gerektirdiği için daha fazla klinik laboratuvar, en azından serolojik yöntemlerle tanı konması hedeflenebilir. Bu UMS belgesinde de Q ateşi tanısı için örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları, sorumluluklar ve tanı süreçleri içinde izlenecek temel adımlar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

EDTA Etilen daimin tetra asetik asit

FITC Fluorescein isothiocyanate

KBT Kompleman birleşme testi

Genel Bilgi

Patojenin özelliği

Etken *C. burnetii* hareketsiz, kapsülsüz, zorunlu hücre içi paraziti olarak yaşayan, küçük (0.2-0.4 ile 0.4-1.0 µm) düzensiz kokobasil şeklinde gram negatif bir bakteridir (1,2). Özellikle mononükleer fagositleri tutma eğiliminde olsa da diğer hücre tiplerini de enfekte edebilir. *C. burnetii* filogenetik olarak *Pseudomonas*, *Francisella*, ve *Legionella*'lar ile daha uzaktan da *Rickettsia*'lar ile ilgilidir (7).

C. burnetii gelişimsel döngüsünde antijenik- veya faz-varyasyonu olarak da tanımlanan farklı morfolojik biçimler gösterir. Bu, dış membran lipopolisakarit yapısındaki değişikliklerle ilişkili olup bakterinin önemli bir özelliğidir. Bazı formlar varlığını ekstrasellüler şartlarda sürdürebilir ve hatta çevrede birikebilir (6,8).

Epidemiyoloji ve bulaş

Coxiella burnetii'nin insanlara bulaşması başlıca enfeksiyöz aerosollerin solunması ile olur. Bulaşta en sık enfekte hayvanların doğum sıvılarından kaynaklanmış enfeksiyöz aerosollere doğrudan maruz kalınması veya kurumuş doğum sıvıları ve atıkları ile kontamine tozların solunması rol oynamaktadır. Sığır, koyun, keçi

C. burnetii için birincil rezervuarlardır; ancak, ev hayvanları, tavşanlar, kuşlar gibi pek çok türün de enfeksiyon kaynağı olabileceği doğrulanmıştır (1,6,8).

Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile etkenin oral yoldan alınması mümkün olabilir. İnsanda transplasental geçiş de bildirilmiştir. Kene tutunması ya da insandan insana geçiş gibi diğer bulaşma modları oldukça nadirdir (6,8). Hayvan enfeksiyonlarının çoğu asemptomatiktir. Geviş getiren hayvanlarda klinik hastalık esas olarak düşük, ölü doğum ve mastit gibi üreme sistemi sorunları ile karakterizedir (6).

Q ateşi esasen çiftçiler, veterinerler ya da hayvan kesimi ile uğraşanlarda görülen mesleki bir hastalıktır. *C. burnetii* ile çalışan laboratuvarlarda da laboratuvar kaynaklı enfeksiyon riski yüksektir. Öyle ki, bu tür laboratuvarlar ve veterinerlik araştırma enstitüleri gibi maruz kalma riski yüksek işyerlerinde çalışanlar için bir Q ateşi tıbbi gözetim sistemi kurulması tavsiye edilmektedir.

C. burnetii çevre koşullarına son derece dayanıklıdır. Aerosollerde 2 hafta boyunca ve toprakta 5 aya kadar enfektif kalabilir. Organizma havaya karışarak rüzgar akımları ile kilometrelerce uzağa gidebilir ve salgınlara yol açabilir. Çünkü sadece tek bir organizmanın solunum yolundan alınması bile enfeksiyon meydana gelmesi için yeterli olabilmektedir. Bu özelliği nedeniyle *C. burnetii* biyotehdit ajanları arasında sınıflanmaktadır (9). Aynı zamanda Risk Grubu 3 patojendir ve kültürleri asgari BGD3 gereklerini karşılayan laboratuvarlarda çalışılabilir (10).

C. burnetii ilginç olarak Yeni Zelanda hariç dünyanın hemen her yerinde görülmektedir. İnsidans ve seroprevalans raporlarına göre akut Q ateşi gençlerden ziyade ≥ 40 yaş bireyler arasında daha yüksektir ve yaşla birlikte hastalığın şiddeti artmaktadır (6). Salgınların incelenmesi esnasında elde edilen serokonversiyon verilerine göre, etkilenen bireylerin önemli bir kısmında (%60'a kadar) enfeksiyon asemptomatik seyretmektedir. Bilinen en büyük Q ateşi salgını 2007-2010 yılları arasında yaklaşık 4.000 vaka ile Hollanda'da kaydedilmiştir. Bu salgının yoğun nüfuslu bir yerleşim bölgesine yakın süt keçisi çiftlikleri ile bağlantılı olduğu ve insanların rüzgarla taşınan organizmalarla enfekte olduğu ileri sürülmektedir (11). Bakterinin yayılmasının hayvansal kaynaklarla yakından ilgili olduğu bilinmesine rağmen, hayvancılık ile yakınlığı ya da bilinen bir maruziyetin olmadığı kentsel vakalar ve salgınlar da bildirilmiştir (6).

Klinik özellikleri

Q ateşi kliniği insanlarda geniş bir çeşitlilik sergiler. Erken -bazen fark edilmeyecek kadar hafif- bir enfeksiyonu **akut** Q ateşi ya da şiddetli **kronik** bir hastalık takip edebilir.

Akut Q ateşi belirtileri değişkenlik gösterebilirse de, genellikle ateşle birlikte atipik pnömoni veya hepatit vardır. Vakalar en sık pnömoni (%47-63), hepatit (%60) veya tek başına ateş (%14) ile ortaya çıkabilir (1,2,7,12).

Organizmalar kontamine aerosollerin solunum yoluyla alınmasını takiben akciğerlerde çoğalırlar ve sonra da dolaşım sistemine yayılırlar. Küçük hücre varyantı olarak tanımlanan spor benzeri bir formu vardır ve hücre dışı çevresel şartlara önemli ölçüde dayanıklıdır. Büyük hücre varyantı da mevcuttur ve vejetatif, metabolik olarak aktif form budur. Fagolizozomlarda her iki form da bulunabilir (7).

Belirtiler genellikle maruziyetten sonraki 2-3 hafta içinde ortaya çıkar ve hastalar eğer tedavi edilmezlerse semptomlar haftalar veya aylar boyunca sürebilir. En sık görülen semptomlar ateş, halsizlik, titreme ve kas ağrısıdır. Şiddetli, yıpratıcı baş ağrıları da sık belirtilerden biridir. Baş ağrısı göz arkasına ('retroorbital') lokalize ve artmış ışık duyarlılığı ile ilişkili olabilir.

Normal lökosit sayımı, trombositopeni ve artmış karaciğer enzimleri ile birlikte uzamış ateş (>10 gün) akut Q ateşi lehine yorumlanmalıdır (6).

Pnömoni akut Q ateşinin önemli bir klinik görünümüdür ancak klinik ya da radyolojik olarak diğer pnömonilerden ayırt edilemez. Öksürük sıklıkla vardır ve vakaların aşağı yukarı yarısında prodüktif değildir. Çocuklarda hastalık genellikle daha hafif seyreder ve yetişkinlere göre daha yüksek olasılıkla (vakaların %50 kadarında) bir döküntü vardır. Gebelik sırasında Q ateşi geçiren kadınlar düşük ve erken doğum için artmış risk altındadır (6).

Kronik Q ateşi gelişimi oldukça ciddi bir durumdur; hastaların <%5'den azında akut -semptomatik veya asemptomatik- enfeksiyonu takip eden birkaç ay içinde ya da yıllar sonra, bazen 20 yıl kadar geç, ortaya çıkabilir. Kalp en sık etkilenen organdır; bunu karaciğer, kemik dokusu, vasküler doku ve akciğer izler (1,2,6,7).

Kronik Q ateşinin majör komplikasyonu endokardittir ve özellikle mitral ve aort kapaklarının tutulumu ile karakterizedir. Q ateşinde genel mortalite oldukça düşük (yaklaşık %2.4) iken, kronik hastalıkta bu oran %65'e kadar çıkabilir (7). Bir diğer ifade ile tedavisiz olgularda hastalık daima fatal seyirlidir ancak erken tedavi hayat kurtarıcı olabilir. Endokarditli kronik Q ateşi olan hastalarda rutin kan kültürleri negatif bulunur. Kronik Q ateşi osteoartiküler enfeksiyon, kronik hepatit, kronik akciğer enfeksiyonları ve kronik yorgunluk sendromu ile de seyredebilir (1,2,6).

Laboratuvar tanısı

Q ateşinin akut ve kronik formları iki ayrı antijenik faza karşılık gelen antikor yanıtı tipleri ile ayırt edilir. Akut enfeksiyon sırasında, *C. burnetii* faz-II antijene karşı antikor yanıtı baskın ve faz-I antijene karşı olan yanıtın daha yüksek iken kronik enfeksiyon faz-I IgG titrelerinin yüksekliği ile karakterlidir (6,7,12).

Akut Q ateşinin laboratuvar tanısı öncelikle serolojiye dayanmaktadır ve IFA referans test kabul edilmektedir. Ancak kesin tanı için akut ve konvalesan serumlar arasında faz-II IgG antikor titrelerinin 4 kat arttığının gösterilmesine gerek olması, pratik anlamda geriye dönük (retrospektif) tanıya imkan verir. *C. burnetii* faz-II IgM antikorları ise hızla ortaya çıkar, 14 günde en yüksek titrelere ulaşır ve 10-12 hafta kalır. Bir negatif serolojik sonucun Q ateşini dışlamayacağını, akut hastalığın erken dönemlerinde IFA'nın negatif bulunabileceğini hatırlatmakta fayda vardır. Akut Q ateşinin erken dönemlerinde kesin tanı için serolojik testin PCR ile paralel uygulanması da önerilmektedir. Semptomların başlangıcında, oldukça erken dönemlerde tam kan veya serumdan PCR pozitif bulunabilir ancak antikorların gelişmeye başlaması veya antibiyotik tedavisi ile birlikte negatif hale gelir (6). Etken kültürlerden izole edilebilir ancak bu özel laboratuvar koşulları (BGD3) gerektirmektedir.

Serolojik testler kronik hastalığa dönüşümü saptamak için akut hastalıktan sonraki iki yıl süresince vakanın takip edilmesinde de kullanılır.

Kronik Q ateşinde ise tanı, belirlenmiş bir kronik enfeksiyonun (ör., endokardit) varlığında faz-I IgG antikorlarının yükseldiğinin ($>1:800$) gösterilmesine dayanır. Etkilenen dokudan PCR, immünohistokimyasal boyama ya da kültür ile de *C.burnetii* enfeksiyonu doğrulanabilir (7,12,13,14).

Q ateşinin evrelerine göre tanı testleri, örnek tipleri ve semptomların başlangıcına göre örnek alma zamanları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Coxiella burnetii

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Q ateşinin laboratuvar tanısı öncelikle serolojiye dayandığından serolojik tanı (ve benzer şekilde moleküler tanı) BGD2 şartlarını karşılayan klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yürütülebilir. Serum veya plazma örneklerinden çalışılırken en ciddi risk kan-kaynaklı patojenlerin (HIV ve hepatit etkenleri) bulaşma riskidir. Serum ayırma sırasında ve testler çalışılırken **daima** eldiven giyilmeli, standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. “Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi”).

C. burnetii Risk Grubu 3 organizmadır ve yüksek aerosol bulaş potansiyeline sahiptir; enfektif dozu çok düşüktür; inhalasyon ile alınan <10 bakteri hastalığa neden olabilir. Bu özelliği ile bağlantılı olarak *C. burnetii* biyoterör ajanları arasında sınıflandırılmıştır. Kültürleri ile uğraşanlarda laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlardan da yüksek sıklıkta sorumludur (8,3,9,10). Bu nedenle şüpheli örneklerin hücre kültürü ekimleri, her türlü inokülasyon, enfekte dokuların işlenmesi ve enfekte hayvan nekropsileri asgari BGD3 laboratuvar şartlarında (Referans laboratuvarı) ve sertifikalı sınıf-IIA BGK içinde gerçekleştirilmelidir.

Ayrıca, *C. burnetii* başta fibroblast hücreler olmak üzere çeşitli hücre kültürü dizilerinde üreyebildiğinden dolayı, hücre kültürü yapabilen klinik laboratuvarlar (BGD2) öngörmemiş olsalar da etkeni izole edebileceklerinden dikkatli olmalıdırlar (5-15 günlük inkübasyonu takiben *C. burnetii* ile enfekte hücreler sitoplazmik inklüzyonlar ile ayırt edilir).

Potansiyel *C. burnetii* bulaşında yüzey dezenfeksiyonu için %95’lik alkol önerilir. Çamaşır suyu etkisiz kalabilir. Spor-benzeri formlar UV ışık, yoğunluğu düşük çamaşır suyu veya kısa süreli (<10 dk) otoklavlamaya dirençlidir (7).

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

İnceleme örnekleri için uygun zamanlama ve test seçiminde Tablo-1'den yararlanılabilir. Örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi ise "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serum - Serolojik tanı için kullanılır. Q ateşinde seroloji en kolay, hazır ve öncelikli tanı yöntemidir. Kesin tanı için çift serum örneğinde sero-konversiyon veya titre artışının gösterilmesi önemlidir. Bu nedenle semptomların başlamasını takiben hastadan hemen bir akut faz örneği gönderilir; 14. günden sonra da ikinci serum örneği gönderilmelidir.
- Tam kan - Kültür için kan heparinli tüpe (en az 5 mL) alınmalıdır. PCR için ise EDTA veya sodyum sitrat içeren tüp kullanılır; en az 2 mL kan alınmalıdır.
- Doku (karaciğer, kalp kapakçığı vb.) biyopsi örnekleri – kültür veya PCR için kullanılır; SF içeren steril bir tüpte gönderilebilir. Kesinlikle formol içermemelidir.

NOT: İnvaziv girişim gerektiren bütün örnekler aseptik şartlarda hekim tarafından alınmalıdır.

Reaktif / Kit

- IFA testi için kitler – piyasada mevcuttur. Kit şunları içeriyor olmalıdır:
 - a) IFA lamaları – çukurlarında *C. burnetii* faz-I ve faz-II antijenleri kaplı, çukurları teflonla çevrelenmiş lamalar; 4°C ya da -20°C'de saklanır.
 - b) Konjugat – FITC işaretli keçi anti-human IgM, IgG veya IgA konjugat üreticinin talimatına göre sulandırılarak kullanılır. Sulandırmada genellikle %1'lik Evans mavisi önerilmektedir.
 - c) Pozitif, düşük titrede pozitif ve negatif kontrol serumları.
 - d) Serum diluenti (%10 yumurta sarısı kesesi, pH 7.4 PBS vb.) - kit içinde mevcut değilse laboratuvar ayrıca temin etmelidir.
- Lam kaplama solüsyonu ('mounting medium') – tamponlu gliserindir (%75'lik gliserol-PBS). Ticari olarak temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir. Bunun için; 7.5 mL gliserole 2.5 mL PBS eklenir, pH 8.5.
- İmmersiyon yağı – çok düşük floresan
- ELISA, kompleman birleşme testi veya mikroaglutinasyon da antikor tespiti amacıyla kullanılabilir.
- Dezenfektan - %95'lik alkol, %10'luk çamaşır suyu veya %10'luk formol. Dekontaminasyon için otoklav yoksa veya kullanılamıyorsa kontamine materyal bu dezenfektanlardan biri içine yatırılarak en az 24 saat tutulmalıdır.

Diğer gereç, donanım

- Floresan mikroskop - objektifler 40× ve 100× immersiyon; oküler 10×; BG38, K480, KP490 (iki), TK510, K515 *FITC filtreleri* ile.
- İnkübatör (36±1°C)
- ELISA okuyucu, yıkayıcı – ELISA yapılacaksa

2.4. Kalite kontrol

- Kullanılan kitlerin son kullanım tarihleri ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir.
- Her testte pozitif ve negatif kontrollerin kullanılması esastır.
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

Tablo 1. Q ateşinin evrelerine göre tanı testleri, örnek tipleri ve semptomların başlangıcına göre örnek alma zamanları (6).

Enfeksiyonun fazı ve örneğin türü	Semptomların başlangıcından itibaren zamanlama	Analiz tipi
Akut		
Tam kan	14. güne kadar (antibiyotik tedavisinden önce)	PCR
Serum	IFA için 21. güne kadar PCR için 14. güne kadar (ve antibiyotik tedavisinden önce)	IFA (faz-I ve II IgG, IgM) PCR
Konvalesan		
Serum	Akut örneğin alınmasından 3-6 hafta sonra	IFA (faz-I ve II IgG, IgM)
Kronik		
Tam kan	Akut hastalıktan >6 hafta sonra	PCR
Serum	Akut hastalıktan >6 hafta sonra	IFA (faz-I ve II IgG, IgM) PCR
Kalp kapakçığı, diğer dokular	6 haftadan yıllar sonrasına kadar	PCR, kültür, immüno-histokimyasal boyama

Tablo 2. Q ateşi tanısında IFA testinin tanısal titreleri

Hastalığın Evresi	Faz I Antikorlar (IgG)	Faz-II Antikorlar (IgG)
Akut*	Pozitif ancak faz-II IgG'den daha düşük titrede	≥1/128**
Kronik	≥1/800	Pozitif ancak faz-I IgG ile aynı veya daha düşük titrede

* Kronik hastalığa dönüşümü saptamak için akut hastalıktan sonraki iki yıl süresince vakanın serolojik testler ile takip edilmesi önerilir.

** Akut ve konvalesan örneklerle göre 4 kat titre artışı saptanması - kesin tanı

3 Q ateşi tanısında kullanılan teknikler

3.1. Seroloji

- *C.burnetii*'nin yüksek bulaşıcılığı ve kültürünün de hem zaman alıcı olması hem de duyarlılığının düşük olması nedeniyle tanıda serolojik testler tercih edilir. Serumda IgM, IgG ve IgA varlığının araştırılması amacıyla ticari IFA ve ELISA kitleri geliştirilmiştir (3,12,14).

IFA

- IFA günümüzde Q ateşinin serolojik tanısında referans yöntem olarak kabul edilmektedir.
- IFA, kolayca uygulanabilen, hızlı, test için çok az miktarda antijene gereksinim gösteren ve her iki faza karşı gelişen antikorları sınıflarına göre (IgM, IgG, IgA) ayrı ayrı saptayarak hastalığın evresinin belirlenmesini de sağlayan bir yöntemdir.
- IFA ile 2-4 hafta (en az 14 gün) ara ile alınan çift serum örneğinde faz-II antikor titresinde negatiften pozitif değişim (serokonversiyon) veya dört kat titre artışı akut Q ateşi tanısını koydurur.
- Uygulamada serumların faz-II antijene karşı taranması ve pozitif bulunan serumların farklı immünglobülin sınıfları (IgG, IgM ve IgA) için ve hem faz-I, hem de faz-II antijenlere karşı test edilmesi önerilir.

NOT: Sonuçların test farklarından etkilenmemesi için her iki serum örneği de aynı testte (aynı zamanda ve aynı laboratuvarda) incelenmelidir. Bu yapılmadığında, testler / laboratuvarlar arası farklar sonuçların hatalı değerlendirilmesine neden olabilir.

- Serokonversiyonun beklenmesi tanıda gecikmeye neden olur. Öte yandan, genellikle hastalardan tek bir serum örneği alınmakta ya da alınabilmektedir. Bu durumda tek serum örneğinde gözlenen titreler üzerinden değerlendirme yapılması gerekebilir.

ELISA

- ELISA yüksek duyarlılığı, otomatize edilebilmesi ve seroepidemiyojik çalışmalarda kolay uygulanabilmesi nedeniyle avantajlı bir yöntemdir. Özellikle akut enfeksiyonun tanısında IgM antikorlarını göstermek için ELISA'ya başvurulabilir. Son yıllarda ELISA'nın ticari olarak üretilmesi ile laboratuvarlar arası standardizasyon sorunları da giderilmiştir. Ancak ELISA ile akut ve kronik Q ateşi ayırımı konusunda kabul edilmiş kriterler bulunmamaktadır ve titre verilememesi nedeniyle tedavinin takibi için uygun değildir (12,14,15,16).

KBT

- Kompleman birleşme testi (KBT) ile *C. burnetii*'nin faz-I ve faz-II antijenlerine karşı gelişen IgG antikorları saptanabilir.

3.2. Kültür

- Kan, kemik iliği ve homojenize doku örneklerinden hücre kültürlerine ve embriyolu tavuk yumurtasına BGD3 şartlarında ekim yapılır.

3.3. Diğer tanı yöntemleri

- Q ateşinin tanısında PCR kullanılabilir (12,16,17). Biyopsi ve benzeri klinik örneklerde immünohistokimyasal boyama yapılabilir (20).

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Serolojik testler için laboratuvara gelen örnekler alındığı günden itibaren en fazla 5 gün için +4°C'de saklanabilir. İdeali, serumun uygun sayıda alikota bölünmesi ve test gününe kadar -20°C'de saklanmasıdır.
- Pozitif bulunmuş örnekler laboratuvarda sonraki çalışmalarda iç kalite kontrol amacıyla kullanılmak üzere saklanmalıdır.
- Moleküler testler ya da immünohistokimyasal boyamalar için gönderilmiş doku biyopsileri ya da vücut sıvıları gibi örnekler test gününe kadar -70°C'de saklanmalıdır.
- Dondurulmuş örneklerin tekrarlayan dondurma-çözme işleminden sakınılmalıdır. Bunun için örnekler her zaman alikotlara ayrılarak derin dondurucuya kaldırılmalıdır.
- Tanı veya ileri teknikler için Referans laboratuvara örneklerin gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (18,19) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- Serolojik testler *C.burnetii*'nin faz-I ve faz-II antijenlerine karşı gelişen antikorların varlığı ile değerlendirilir. Akut Q ateşinde serokonversiyon 7-15 gün sonra gerçekleşir. Hastaların yaklaşık %90'ında 3. haftada saptanabilir düzeyde antikorlar mevcuttur (bkz. Şekil 1).
- **Akut** Q ateşinde, faz-II antikorları hakimdir ve titreleri faz-I antikorlara göre daha yüksektir. **Kronik** Q ateşinde ise faz-I antikor titreleri faz-II antikorlarından daha yüksektir (Tablo 2). Her iki faz antikorlar da enfeksiyonu takiben aylar, yıllar boyunca devam eder.
- Sonuç raporunda daima kullanılan test belirtilmelidir. IFA ya da KBT sonuçları raporlanırken titreler ve hangi faza karşı antikorların incelenmiş olduğu rapora yazılmalı, tanısal değerler de belirtilmelidir. ELISA sonuçları "pozitif" veya "negatif" olarak rapor edilir (3,12,14,20).

4.1. Akut Q ateşinin tanısı

- Hastalığın başlangıcında alınan **tek serum örneğinde** IFA IgG titresinin $\geq 1:128$ bulunması ya da ELISA ile IgM antikorlarının pozitif olarak saptanması "olası tanı" bulgusudur.
- Hastalığın başlangıcında alınan **tek serum örneğinde** IFA ile faz-II antijenine özgü (faz-I de olabilir) IgG titresinin $\geq 1:64$ ve aynı anda IgM titresinin $\geq 1:48$ olması ise **akut Q ateşi** için "kesin tanı" koydurur.

- IFA ile **çift serum örneğinde** 4 kat titre artışı saptanması da akut Q ateşi için "kesin tanı" bulgusudur.
- KBT ile antikor titrelerinde ≥ 4 kat artış veya tek serumda KBT titresinin $\geq 1:40$ bulunması akut Q ateşi tanısını destekler.

4.2. Kronik Q ateşinin tanısı

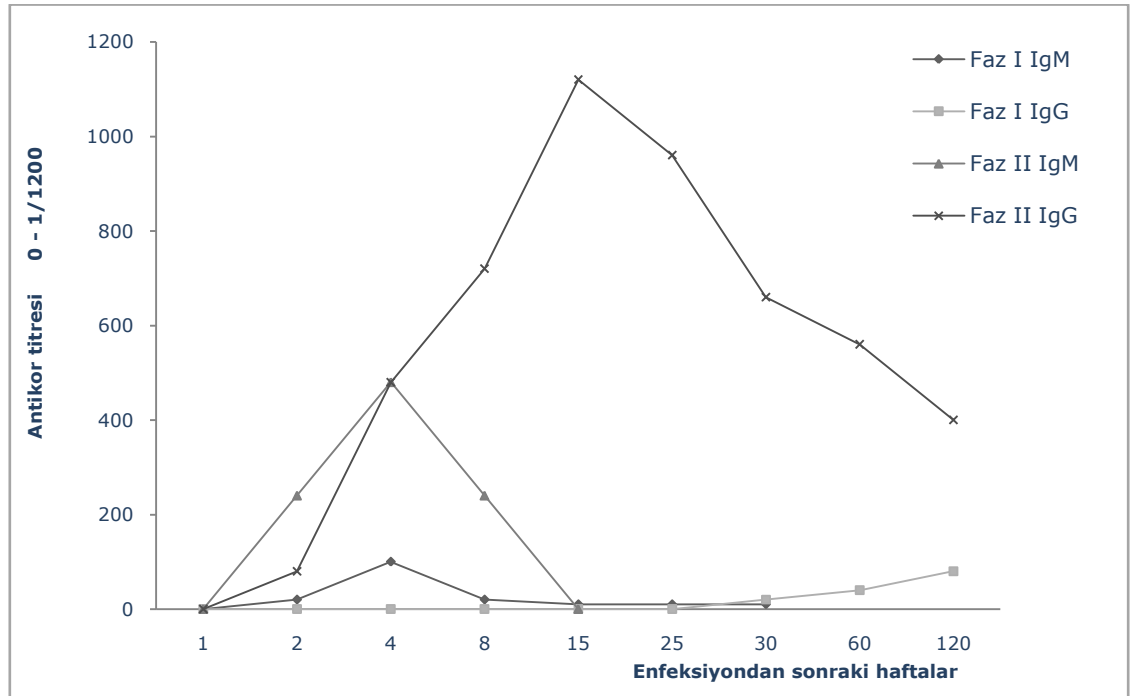
- IFA ile faz-I antijene karşı IgG antikorlarının $\geq 1:800$ bulunması **kronik Q ateşi** (endokardit) için "kesin tanı" bulgusudur. KBT ile $\geq 1:200$ titreler kronik Q ateşi tanısını doğrular (3,12,14).

- Faz I'e karşı IgG antikor titresinin $\geq 1:128$ olması ayrıca ek olarak IFA ile $< 1:800$ titre saptanması "olası tanı" bulgusudur.

NOT 1: Q ateşi endokarditli hastaların serumlarında *Bartonella* türleri ile çapraz reaksiyonlar görülebilir. Ancak reaksiyon zayıftır ve titre farklılıkları ile ayırım kolaylıkla yapılmaktadır. Öte yandan endokarditli olgularda serolojik olarak *Bartonella* tanısı konulan hasta serumlarının *C.burnetii* antikorlarının varlığı açısından da incelenmesi önerilir.

NOT 2: Uygun tedaviye rağmen anti-faz I antikorlarının devam etmesi veya kaybolan antikorların yeniden ortaya çıkması kronik Q ateşi olasılığını güçlendirir. Kan örneğinden PCR yapılarak teyit edilebilir.

- Şüpheli vakanın kan ya da doku örneklerinde *C. burnetii* özgül gen bölgesinin gösterilmesi ya da endokarditli vakada kalp kapakçığı dokusunda immünohistokimyasal boyama ile pozitiflik saptanması "kesin tanı" bulgusudur.



Şekil 1. *C.burnetii*'nin faz varyasyonlarına göre antikor yanıtı.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Vakalarda klinik olarak Q ateşinden şüphelenilmesi için özgül kriterlerin olmayışı laboratuvar tanısını da güçleştirmektedir.
- Kültürlerden izolasyonun güç ve tehlikeli olması nedeniyle vakaların en büyük kısmında serolojik bulgulara dayanarak/güvenerek karar verilmesi gerekmektedir.
- Serolojik çalışmalarda *C. burnetii* faz-II antijenleri ile *Legionella* ve *Bartonella* spp arasında çapraz reaksiyonlar görülebilir. Bu durumda faz-I ve faz-II antikorları ayrı ayrı çalışılarak ayırıcı tanı yapılmalıdır (3,12,14).

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesinde (Q Ateşinin Mikrobiyolojik Tanısı) geçen bazı hususlarda daha ayrıntılı bilgi için şu UMS belgelerine başvurulabilir:

UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Maurin M. Raoult D. Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4): 518-53.
- 2 Africau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 2005;36: 327-49.
- 3 Madariaga MG, Katayoun R, Trenholme GT, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infectious Dis* 2003;3(11):709-721.
- 4 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhbs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (erişim tarihi: 18.12.2013)
- 5 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 6 Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and management of Q Fever. United States, 2013 Recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. Recommendations and Reports, *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2013;62(3).
- 7 *Coxiella burnetii*. Sentinel level clinical laboratory guidelines for suspected agents of bioterrorism and emerging infectious diseases. American Society for Microbiology (ASM). 2013.
http://www.asm.org/images/PSAB/Coxiella_July2013.pdf (son erişim tarihi: 12.12.2013).
- 8 OIE. Q fever. OIE *Terrestrial Manual*, Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010, Chapter 2.1.12. 2010, p. 1-13
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_Q-FEVER.pdf (son erişim tarihi: 12.12.2013).
- 9 Artenstein AW. Bioterrorism and biodefense. In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG, et al, eds. *Infectious diseases*. 3rd ed., Elsevier Ltd. 2010, p. 747-58

- 10 Prescott LM, Harley JP, Klein DA eds. Global Travel and Health Considerations: The Emerging Threat of Bioterrorism. *In: Microbiology*. 5th Ed. ISBN: 0-07-282905-2, The McGraw-Hill Companies, USA, 2002; Chapter 37: p. 863.
- 11 Schimmer B, Dijkstra F, Vellema P, et al. Sustained intensive transmission of Q fever in the south of the Netherlands, 2009. *Euro Surveill* 2009;14:3.
- 12 Brouqui P, Marrie T, Raoult D. *Coxiella*. *In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed., ASM Press, Washington D.C. 2007, p. 1062-9.
- 13 Welch D. Bioterrorism: Q fever. *In: Garcia LS, Isenberg HD (eds). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed update, ASM Press, Washington D.C, 2010. p.16.12.1
- 14 Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q Fever. *J Clin Microbiol* 1998;367: 1823-34
- 15 Kılıç S, Çelebi B. *Coxiella burnetii* (Q humması) ve Türkiye'deki epidemiyolojisi. *Türk Hijyen Den Biyol Derg* 2008;3 (Suppl.3): 1-31.
- 16 Vaidya VM, Malik SV, Kaur S, Kumar S, Barbuddhe SB. Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. *J Clin Microbiol* 2008;46(6):2038-44.
- 17 Rolain J-M, Raoult D, Marmion BP, Harris R.J, Storm P, Ayres JG. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. *QJM* 2005;98:615-620.
- 18 WHO. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013–2014. World Health Organisation. WHO/HSE/GCR/2012.12, 2012.
- 19 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 20 Setiyono A, Ogawa M, Cai Y, Shiga S, Kishimoto T, Kurane I. New criteria for immunofluorescence assay for Q fever diagnosis in Japan. *J Clin Microbiol* 2005;43: 5555-9.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Leptospirozun (*Leptospira* spp enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-23
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizmalar	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 Leptospiroz tanısında kullanılan teknikler.....	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
6 Referans Laboratuvar	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Leptospiroz (Weil Hastalığı), *Leptospira interrogans* grubunda yer alan serotipler tarafından oluşturulan ve tüm dünyada yaygın olarak görülen bir zoonozdur. Etkene maruz kalan bireylerin büyük kısmında enfeksiyon belirti vermese de semptomatik bireylerde klinik tablo ciddi seyirli ve ölümcül olabilmektedir. Belirli iklim ya da epidemiyolojik koşullar oluştuğunda salgınlar yapabilmesi nedeniyle leptospiroz ayrıca halk sağlığı önemine sahip bir hastalıktır. Ülkemizde de leptospiroz bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer alır (1,2).

Leptospirozun klinik bulguları, halk sağlığı tehdidi kabul edilen bazı hastalıklar da dahil pek çok hastalıkla karışabildiğinden dolayı (ör., enterik ateş, viral hemorajik ateşler, viral hepatitler, ensefalitler, influenza vb.) ayırıcı tanı büyük önem arz etmektedir. Kesin tanı laboratuvar incelemesi ile konur. Her ne kadar leptospiroz tanısı daha ziyade uzmanlaşmış merkezlerde yapılabilen incelemelere (serolojik tanı için MAT, *Leptospira* kültürü vb.) dayanıyor olsa da klinik laboratuvarların da ayırıcı tanıda ve örneklerin referans laboratuvara yönlendirilmesinde rolü vardır. Bu UMS'nin amacı da, klinik laboratuvarlara leptospiroz şüpheli vaka tanısında geçerli tanı yaklaşımına dair ve gerektiğinde örnekleri *Referans* laboratuvara yönlendirmeye yardımcı bir rehber sunmaktır.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- BSA** Bovine serum albumin
EMJH Ellinghausen-McCullough-Johnson Harris (besiyeri; *Leptospira* için)
ICT İmmünokromatografik test (lateral flow assay)
MAT Mikroskopik aglütinasyon testi

Genel Bilgi

Leptospira'lar gram negatif, hareketli, zorunlu aerob, sarmal bakterilerdir. Uzunlukları 6-12 µm, çapı 0.1 µm'dir. Sıvı ortamda bir ya da her iki ucunda tipik çengeller bulunur (3). Serotipler morfolojik olarak aynıdır. Klasik mikrobiyolojik boyalarla boyanamadıkları için ışık mikroskobu ile görülemezler. Sıvı besiyerinden ıslak preparatı karanlık alan mikroskobunda incelendiğinde karakteristik hareketleri ile ayırt edilebilirler (4,5,6).

Leptospira cinsi içinde, bütün patojen suşları içeren *Leptospira interrogans* ve çevresel saprofit suşları içeren *Leptospira biflexa* olmak üzere iki tür vardır (5).

Leptospiroz, dünyanın hemen her yerinde görülebilirse de, daha çok nemli subtropikal ve tropikal iklimlerde ve mevsimsel eğilimle ortaya çıkan bir hastalıktır (3). Vahşi ve evcil hayvanlar bir *L. interrogans* serovarının kaynağı olabilir.

Enfeksiyon insanlara, genellikle enfekte hayvan idrarıyla direkt temas sonucu veya enfekte idrar ile kontamine çevre ve yüzey sularından (nehir, göl, pınar vb.), toprak ve bitkilerden bulaşır. Etken haftalarca kontamine toprak ve sularda,

özellikle 28-32°C sıcaklıkta canlılığını sürdürebilir. Hastalık sıklıkla meslek veya uğraşla ilişkilidir. Pirinç tarlası ve şeker kamışı tarlası çalışanları, mezbaha işçileri, hayvancılıkla uğraşanlar, kanalizasyon çalışanları, balıkçılar, madenciler, veterinerler, askeri birlikler, doğa yürüyüşü yapanlar ya da doğada kamp yapanlar, doğada su sporları ile uğraşanlar (rafting, mağara keşifleri vb.) risk grupları arasındadır. Aşırı yağmurlara bağlı sel ve su baskınlarını takip eden salgınları kaydedilmiştir (6,7).

Leptospiroz; olguların %90'ında klinik olarak belirtisiz veya hafif, anikterik ve kendi kendini sınırlayan ateşli bir tablo olarak görülürken, %5-15 vakada klinik Weil hastalığına ya da ağır geç manifestasyonlara ilerler (3,5). Klinik hastalık birkaç gün içinde sonlanabileceği gibi haftalar da sürebilir. Gebelikte fetal ölüm, düşük veya konjenital enfeksiyona neden olabilir (8).

İnsanda hastalık tipik olarak şu dört klinik kategoriden birini sergileyebilir: (i) ılımlı grip-benzeri tablo; (ii) sarılık, renal yetmezlik, miyokardit (aritmiler) ile karakterize Weil sendromu; (iii) menenjit veya meningoensefalit; (iv) solunum yetmezliği ile giden pulmoner kanama (8).

Sarılık ile seyreden form, Weil hastalığı, leptospirozun en ağır formudur. Vakalar genellikle tanımlanamamakta veya hatalı bir şekilde dengue, sıtma ya da erken dönemde özgül olmayan belirtiler nedeniyle influenza olarak tanımlanmaktadır. Tanımlanmamış aseptik menenjitlerin %10 kadar önemli bir kısmının leptospiroz olabileceği tahmin edilmektedir (8). Ciddi leptospiroz ayrıca diğer akut sarılık ve renal yetmezlik ile seyreden hantavirüs enfeksiyonu, riketsiyal enfeksiyonlar, enterik ateş, viral hepatitler ve gram-negatif sepsisleri ile karışabilmektedir.

İnkübasyon dönemi ortalama 5-14 gündür (3,5). Hastalıkta genellikle iki faz vardır: *birincisi* leptospiremik veya ateşli (febril) faz, ki 5-7 günde sonlanır; *ikincisi* ise febril fazı takip eden ve 4 ila 30 gün sürebilen konvalesan veya immün fazdır. Bazen bu iki faz arasında 3-4 günlük, ateşin düşmesi ile karakterli bir evre olabilir. Ancak iki fazın hiç ayırt edilemediği vakalar olabilir ya da vakalar doğrudan ikinci faz özellikleri ile başvurabilir.

Leptospiroz olasılıkla, tanıdaki güçlükler, pek çok hastalıkla karışması ve laboratuvar tanısının yaygın olmayışı nedeni ile yeterince rapor edilmemektedir. Bu durum hastalık kontrolü ile ilgili çalışmaların yetersiz kalmasına neden olduğu kadar, aynı zamanda hastalığın şiddetini ve ölüm oranını artıran bir faktördür.

Tanıda klinik örneklerin kültürlerinden organizmanın izolasyonu mümkündür; hastalığın 10. gününe kadar kandan ve BOS'dan ve 7. günden sonra idrardan *Leptospira* izole edilebilir; ancak duyarlılık hayli düşüktür. Kültür için özel kültür besiyerinin el altında olması gerekir ve bazen kültürden izolasyon için inkübasyon süresi 16. haftaya kadar uzayabilir (5,8,9).

Bu nedenlerle leptospirozda tanı öncelikle serolojik incelemeye dayanır (8,10). MAT serolojik tanıda altın standarttır ve diğer testler onunla kıyaslanır. Farklı bölgelerde farklı *Leptospira* serovarları görülebildiği için MAT o bölgede olası serovarların bir paneli kullanılarak yapılan görece zahmetli bir test olsa da elde edilen sonuçlarla kesin tanı konabilir. Serolojik tanının en önemli dezavantajı, bazı olgularda antikor yanıtının gecikmesi veya olmamasıdır. Ayrıca serokonversiyon asemptomatik kişilerde de, özellikle endemik bölgelerde, meydana gelebilir. ELISA tabanlı testler ve IgM dot ELISA 'dipstick' hızlı serolojik tanı testleri de geliştirilmiştir. Hızlı tanı testinin duyarlılığı hayli yüksektir ve akut enfeksiyon tanısında iyi bir alternatif olabileceği ileri sürülmektedir (8,10).

Klinik örneklerde veya otopsi örneklerinde leptospiraların gösterilmesinde immünofloresan, immünohistokimyasal ve nükleik asit saptama teknikleri de kullanılabilir (11,12,13). Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılık ve özgüllüğü çok düşük olduğu için tanıda yeri yoktur. Çünkü, bir mikroskop sahasında bir *Leptospira* görülebilmesi için kanın veya idrarın en az 10^4 organizma /mL içermesi gerekir (5).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

13 pathogenic *Leptospira* serogrubu olup 260'tan fazla serotip bulunmaktadır (3). Patojen serogruplar aşağıdaki gibi listelenebilir:

L. alexanderi, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomospecies 3), *L. weilii*, *L. wolffii*

Ülkemizde insanlarda en çok hastalık oluşturan serotipler şunlardır:

L. kirchneri grippotyphosa Moskva V, *L. icterohaemorrhagiae* Wijnberg, *L. pomona* Pomona, *L. Australis bratislava*, *L. hardjo* Hardjoprajitno, *L. hebdomadis* Hebdomadis, *L. canicola* Hund Utrecht IV.

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Leptospira spp Risk Grubu 2 organizmadır. Şüpheli bütün örnekler en az BGD2 laboratuvarlarda işlenmeli, kültürleri ile çalışılırken biyolojik güvenlik kabini kullanılmalıdır. Daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi"). *Leptospira* bakterisinin enfektif dozu çok düşüktür, sağlam deriden vücuda girebilir. İnsandan insana geçiş söz konusu değildir.

Serum/plazma örnekleri ile çalışılırken en ciddi risk personele kan-kaynaklı patojenlerin (HIV, hepatit etkenleri) bulaşma riskidir. Serum/plazma ayırma ve testlerin yapılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Bu UMS'yi kullanacak laboratuvar personeli; (i) yöntem(ler)i uygulamadan önce, amaçlanan kullanım ile ilgili eğitim almış olmalı; (ii) uygulamaya tüm yönleriyle aşina olmalı, ve; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Geçerli kılınmış referans metotlar ile çalışılmalıdır. Özellikle MAT testi tecrübe isteyen bir testtir.

Testlerin prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, reaktif, kit, donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

Serum - Serolojik tanı amacıyla alınır. Kesin tanı için çift serum örneğinde titre artışının gösterilmesi önemli olduğundan, akut örnek gönderildikten 10-14 gün sonra ikinci serum örneği de gönderilmelidir.

- BOS – Kültür ve PCR için kullanılabilir; 4-10. günler arasında alınır.
- Kan - Kültür ve PCR için kullanılabilir. Kan hastalığın ilk 7 gününde alınmalı ve hemen *Leptospira* kültür besiyerine 2 damla inoküle edilmelidir. Besiyeri yoksa kan heparin, sodyum oksalat veya sitrat içeren vakumlu bir tüpe kan alınır ve oda sıcaklığında gönderilir. Eğer PCR yapılacaksa sitrat veya EDTA'lı tüp tercih edilir; çünkü diğer antikoagülanlar PCR için inhibitör etkilidir!
- İdrar - DFA, PCR ve kültür için kullanılabilir. Hastalığın ikinci haftasından sonra alınmalıdır (3,5). En az 10 mL idrar gerekir. Mikroflora ile kontamine idrarın kültüründe diğer bakterilerin aşırı üremesi yüzünden *Leptospira* izole edilemez. Bu nedenle orta akım idrar temin edilmeli ve 3 saat içinde laboratuvara gönderilmelidir.

NOT: İdrar, özellikle asidik ise, en kısa zamanda kültür besiyerine ekilmelidir. Bu mümkün değilse %1'lik BSA'ya (1 kısım idrar / 9 kısım BSA) konur ve laboratuvara öyle gönderilir. BSA yoksa, idrar sodyum bikarbonat ile nötralize edilebilir. Ardından 1500 rpm'de 30 dk santrifüj edilmeli ve çökelti PBS ile tamponlanmalıdır.

- Otopsi örnekleri (karaciğer, böbrek, beyin) - PCR ve kültür için kullanılabilir. Ölümünden sonraki 4 saat içinde (dokularda otoliz başlamadan; otoliz başlarsa leptospiralar yaşayamaz) örnekler alınmış ve laboratuvara ulaştırılmış olmalıdır.

Tablo 1. Leptospiroz tanısında örnekleme zamanı için özet tablo.

Örnek	Örnekleme zamanı
Serum	Akut ve konvalesan faz örnekleri olmak üzere 10-14 gün aralıkla alınır.
Kan*	İlk 7 gün içinde alınmalıdır.
Kültür için	<i>Leptospira</i> besiyeri tüplerine hemen 2'şer damla (100 µL) inokülasyon yapılır. Besiyeri yoksa kan heparin, sodyum oksalat veya sitratlı tüpe alınır.
PCR için	Sitratlı veya EDTA'lı tüp tercih edilir.
BOS*	4-10. günler arasında alınmalıdır.
İdrar*	Hastalığın 7. gününden sonra alınmalıdır.
Otopsi örnekleri	Ölümünden sonraki 4 saat içinde alınmalıdır.

* mümkünse antibiyotik başlanmadan önce alınmalıdır.

Besiyeri / Reaktif

MAT için;

- *Leptospira* serovarlarından oluşan panel – bölgede endemik olan serovarların her biri bir kültür tüpü içinde olacak şekilde laboratuvarda pasajlarla sürdürülüyor olmalıdır.

Kültür için;

- *Leptospira* EMJH besiyeri – Baz ve zenginleştirme olmak üzere iki kısımdır. Piyasada BSA-Tween 80 besiyeri adıyla satılıyor olabilir. Toz besiyeri piyasadan temin edilebilir ve üretici firmanın talimatına göre hazırlanır. Maddeler laboratuvarda bir araya getirilerek de hazırlanabilir.
- Fletcher'in besiyeri – Piyasadan tüplerde hazır besiyeri olarak temin edilebilir veya laboratuvarda hazırlanabilir. Et özütü, pepton, tavşan serumu içeren bir besiyeridir.

- Besiyerleri %1.5 agar eklenerek yarı-katı hazırlanabilir.

- %0.4-1 oranındaki tavşan serumu, bazı zayıf ve zor üreyen *Leptospira* serotiplerinin izolasyon şansını arttıracaktır.

- Besiyerlerine 5-florourasil (ya da aktidion, nalidiksik asit vb.) eklenebilir veya eklenmeyebilir.

NOT: Bu maddeler kontaminasyonu önlemek için kullanılırsa da az sayıdaki canlı leptospiraların üreme şansını da azaltabilirler. *Leptospira* suşlarının çoğu çeşitli antibiyotikleri içeren besiyerlerinde üreyemez.

- İdrar örnekleri inoküle edilecek tüplere kontaminant organizmaları inhibe etmek için 5-florourasil solüsyonundan (0.1 mL; son konsantrasyon 200 µg/mL) eklenmelidir. 5-florourasil hazırlamak için:
 - (a) 50mL steril distile suya 1g 5-florourasil eklenir. Eritmek amacıyla üzerine 1-2mL 2N NaOH eklenir ve <56°C'de 1-2 saat ısıtılır.
 - (b) 1N HCl ile pH 7.4'e ayarlanır ve hacim steril su ile 100mL'ye tamamlanır. Son olarak filtre ile steril edilerek buzdolabında saklanır. Bir yıl raf ömrü verilir.
- Besiyerleri steril, vida kapaklı tüplere 5 mL'lik alikotlar halinde dağıtılır. Tüpler buzdolabında saklanmalıdır. Yarı-katı hazırlanmış olanlar oda sıcaklığında saklanabilirler. EMJH için raf ömrü 36 ay kadar uzundur.

Diğer gereç, donanım

- Karanlık alan mikroskobu
- İnkübatör (29±1°C)

2.4. Kalite kontrol

- *L. interrogans* kalite kontrol suşları besiyerlerinin kalite kontrolü amacıyla kullanılır. Kontrol organizmaları olarak aşağıdaki suşlar veya eşdeğer laboratuvar izolatları kullanılabilir:

Leptospira interrogans subsp. *canicola* (ATCC 23470)

Leptospira interrogans subsp. *grippotyphosa* (ATCC 23604)

- Her besiyeri lotundan en az iki tüpe standart suş inoküle edilir ve 7 güne kadar oda sıcaklığında inkübe edilir. Bu sürenin sonunda karanlık alan mikroskopisinde tipik morfolojik özellik ve iyi bir üreme gözlenmelidir. Besiyerinin performansı bu şekilde en az 6 ayda bir kontrol edilir veya suşlar ayda bir yeni tüplere 0.5 mL pasajlanarak hem canlı tutulur hem de besiyeri kontrol edilmiş olur.
- Serolojik testler yapılırken pozitif ve negatif kontrol antiserumları her testte kullanılmalıdır.

3 Leptospiroz tanısında kullanılan teknikler

3.1. Mikroskopik Aglütinasyon Testi (MAT)

- MAT leptospirozun serolojik tanısında DSÖ tarafından referans test olarak kabul edilmektedir (5,12).
- MAT, bilinen bütün serogrupları temsil eden antijenlerin (canlı *Leptospira* serovarlarının) kullanıldığı bir testtir. Sıvı besiyerinde üretilmiş *Leptospira* serovarları -karanlık alan mikroskopunda yoğunluk kontrol edilerek- mL'de $1-2 \times 10^8$ bakteri olacak şekilde standart dilüsyonda hazırlanırlar. Sonra her biri hastanın 1/50'den başlayan serum tireleri ile mikropakta 2 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda her bir serum dilüsyonu yine karanlık alan mikroskopunda, kontrol preparatı ile kıyaslanarak değerlendirilir ve serbest leptospiraların oranına göre karar verilir. Preparatta, leptospiraların %50'den fazlası serbest ise test negatif, %50'den azı serbest ise (leptospiraların büyük kısmı kümelenmiş ise) o titre için test pozitif olarak değerlendirilir.
- Pozitif reaksiyon için eşik değer titre birçok laboratuvarıda 1/100 olarak kabul edilmiştir. Ancak antikor titresi diğer bazı değişkenler de göz önüne alınarak değerlendirilmelidir (12):
 - (a) İncelenen örneğin semptomların başlangıcından ne kadar süre sonra alındığı,
 - (b) 2 ya da 3 ardışık serum örneğinde antikor titrelerinin değeri,
 - (c) Etken serogrup,
 - (d) Hastaya antibiyotik verilip verilmediği
- Test, hastalıkla beraber *Leptospira* antikorlarının yükselmeye başlamasından itibaren en yüksek duyarlılık ile sonuç verir. *Leptospira* etkenlerine karşı oluşan antikorlar, semptomların başlangıcından sonraki 5-7. günden itibaren tespit edilmeye başlanır. Akut vakalarda (ateşli dönemde) kanda henüz antikorlar oluşmadığı için serolojik tanıda negatif sonuçlarla karşılaşılabilir (12).

3.2. Diğer serolojik testler

- Piyasada *L. biflexa* serovar *patoc* kullanılarak hazırlanmış ticari ELISA kitleri mevcuttur ve oldukça yüksek bir duyarlılık ile sonuç verirler. IgM antikorlarının saptanmasında MAT'dan biraz daha erken pozitif sonuç alınabilir.

- Ancak test MAT'a göre daha erken bir dönemde negatif hale gelir. Özellikle tarama amaçları için, kolay uygulanabilmesi nedeniyle kullanışlıdır. Ancak ELISA ile cinse özgü antikorları saptamak mümkündür ve test sonuçlarının da referans yöntem olan MAT ile doğrulanması gerekir (12).
- Leptospirozun serolojik tanısında kullanılmak üzere ayrıca çok çeşitli serolojik teknikler (kompleman fiksasyon, lateks aglütinasyon, IHA, IFA, vb.) geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Hemen hepsi tarama amacıyla kullanılan testler olup pozitif sonuçların MAT ile doğrulanması gerekmektedir (12).
- *L. biflexa* antijeninden hazırlanmış ICT, hızlı 'dipstick' testtir. IgM ve IgG antikorlarının ayrı ayrı saptanabilmesi bir avantajdır. ICT de bir tarama testi olup test sonuçlarının referans yöntem olan MAT ile doğrulanması gerekmektedir.

3.3. Kültür

- Etken kan, BOS, periton diyaliz sıvısı, idrar gibi hastalığın ilk 10 günü içinde alınmış örneklerden izole edilebilir.
- Kültür için örnekler BSA-Tween 80 besiyeri tüplerine inoküle edilir (12):
 - (a) Kan iki tüpe birer damla, diğer iki tüpe de ikişer damla ekilir.
 - (b) BOS bir besiyeri tüpüne 0.5 mL olmak üzere olabildiğince çok tüpe ekilmelidir.
 - (c) İdrar önce BSA-Tween 80 besiyeri kullanılarak 1:10 ve 1:100 sulandırılmalıdır. Bu işlem idrardan kaynaklanacak inhibitörlerin ve kontaminantların etkisini azaltacaktır. Takiben hem orijinal idrardan hem de her bir dilüsyondan birer damla ikişer besiyeri tüpüne ekim yapılır. Ayrıca 5-florourasil eklenmiş besiyeri tüplerine de aynı şekilde ekim yapılır. Böylece idrar toplam 12 adet besiyeri tüpüne ekilmiş olmalıdır.
- Kültürler, $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de en az 16 hafta tercihen 26 hafta tutulmalıdır.
- Kültürler her 1-2 haftada bir -ışık kaynağı 100 watt olan kaliteli bir mikroskop ile- karanlık alan mikroskobunda kontrol edilir (4,5,9,13).

3.4. Diğer teknikler

- *Leptospira* nükleik asitlerinin saptanmasına yönelik geleneksel PCR çalışmalarında bugüne kadar pek çok primer çifti tanımlanmıştır. PCR'ın geniş klinik değerlendirmelerden elde edilmiş sonuçlarına göre kültürden daha duyarlıdır ve duyarlılık çift serum örneğine dayalı MAT sonuçları ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Avantajı ise akut dönemde serolojiden erken sonuç vermesidir. Gerçek-zamanlı PCR testleri de yakın zaman önce geliştirilmiştir.
- PCR temelli testlerin en önemli dezavantajı enfektif serovarin PCR ile belirlenememesidir (3,4,5,6). Serovarin belirlenmesinin hasta yönetimi açısından değilse de epidemiyolojik çalışmalar ve halk sağlığı açısından önemi vardır (5).

- Bir mikroskop sahasında bir *Leptospira* görülebilmesi için kanın veya idrarın en az 10^4 organizma /mL içermesi gerekir (5). Klinik örneklerin karanlık alan mikroskopisinde leptospiraların görülebileceği klasik kitaplarda yer alıyorsa da duyarlılık çok düşük olduğu gibi bulgular da şüpheli olabilir. Çünkü serum proteinleri ve fibrin iplikçikleri ve kanda bulunabilen diğer hücresel döküntüler leptospiralara benzeyebilirler. İdrarda ise konsantrasyon yöntemlerine rağmen organizma, çok düşük miktarda bulunduğundan gözlenemeyebilir. Direkt mikroskopinin, bu nedenlerle, rutin tanıda yeri yoktur (12).

3.5. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Tanı, uzmanlaşmış veya referans merkezlerde konulabildiğinden dolayı klinik laboratuvarlar şüpheli örneklerin alınması ve gönderilmesinde rol oynayabilirler. Eğer besiyeri tüpleri varsa (Referans laboratuvarından temin edilmiş ise) hastanenin klinik laboratuvarı örnekler transfer edilmeden önce inokülasyonları gerçekleştirebilir. Bu işlemin yapılabilmesi için laboratuvarında biyogüvenlik kabini bulunmalıdır.
- *Leptospira* spp'nin ticari kan kültürü sistemlerinde bir kaç gün canlı kalabildiği gösterilmesine karşın tanımlanmış bir taşıma besiyeri mevcut değildir. Bu nedenle kan heparin, okzalat veya sitrat içeren tüplere alınarak oda ısısında da nakledilebilir.
- Örneklerin gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (14) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- MAT ile pozitif reaksiyon titresi için eşik değer birçok laboratuvarında 1/100 olarak kabul edilmiştir. Ancak antikor titresi diğer değişkenler de (serumun alındığı zaman, 2 ya da 3 ardışık serum örneğinde antikor titrelerinin değeri, etken serogrup ve hastaya antibiyotik verilip verilmediği) göz önüne alınarak yorumlanır (12).
- Sonuçlar antibiyotik kullanımından etkilenir; ilk serum örneğini almadan önce antibiyotik tedavisi başlanmış hastalarda genellikle titreler daha geç yükselmektedir. Bu nedenle ilk serum örneğinde sonucu negatif bulunan hastalardan 7-10 gün sonra 2. serum örneği de alınıp incelenmelidir.
- Bildirim sistemi kapsamında leptospiroz 'standart vaka tanımı'na göre (bölgesel suşlarda sıklıkla temsil edilen antijenleri taşıyan *Leptospira* kökenlerinin kullanıldığı MAT ile)
 - (a) tek serum örneğinde antikorların $\geq 1/200$ titrede pozitifliği, veya
 - (b) çift serum örneğinde ≥ 4 kat titre artışı
 "kesin tanı" kabul edilmektedir.
- MAT sonucunda bulunan pozitiflik titresi ve serotipin ismi raporda belirtilir.

- Negatif sonuçlar "antikor tespit edilmemiştir" şeklinde, şüpheli bulunan durumlar "7-10 gün sonra test tekrar edilmelidir" şeklinde raporlanır.
- ELISA testleri, üretici firmanın (test kitinin) değerlendirme ölçütlerine göre yorumlanır. Pozitif, negatif veya şüpheli (ara değer) olarak raporlanır. Şüpheli durumlarda; 7-10 gün sonra ikinci bir serum örneği alınarak test tekrar edilmelidir.
- Klinik örneklerden etkenin izolasyonu "kesin tanı" ölçütüdür. Kültürlerin "negatif" olarak değerlendirilebilmesi için uzun inkübasyon sürelerinin tamamlanması beklenir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Leptospirozun teşhisi çok sınırlı merkezler tarafından yapılmaktadır.
- Patojen *Leptospira*'lar 13 serogrup içerisinde 260'ın üzerinde serotipe sahiptir (3,4,5,6). Serogruplar arasında çapraz reaksiyon olmamasına rağmen, aynı serogrup içerisindeki serotipler arasında çapraz reaksiyon bulunmaktadır. Serolojik teşhiste kullanılan serotipler coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Bu durum teşhiste zorluklara neden olmaktadır. Belirgin hastalık semptomlarının görüldüğü fakat serolojik olarak negatif bulunan hastalarda test edilmemiş serotipler tarafından hastalık oluşabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (4).
- *Leptospira*'ların enfektif dozu çok düşüktür, sağlam deriden vücuda girebilir. Klinik örneklerle çalışırken daima eldiven giyilmelidir (4,5,6).
- Besiyerlerinin bakteriyel kontaminasyonu izolasyon şansını düşürür. Örneklerin alınması ve kültür ekimleri aseptiye yüksek düzeyde dikkat edilmesini gerektirir. Kültür ekimleri yapılırken mutlaka biyogüvenlik kabini kullanılmalıdır.
- Kültürün duyarlılığı düşüktür. Özellikle örneklerin alınmasından önce hastada antibiyotik kullanılmaya başlanmış ise izolasyon şansı belirgin düşer.

6 Referans Laboratuvar

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü,
 Spiroket Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı
 Ahmet Şefik Kolaylı Caddesi No:23
 06020 Esertepe, Keçiören - Ankara.

Tel: 0312 326 0090

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Leptospirozun Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, B-TP-08 Karanlık alan mikroskopisi

UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Bulaşıcı Hastalıklar Süveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 2 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Süveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 3 Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;140:287-296.
- 4 OIE. Leptospirosis. Chapter 2.1.9. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual). The World Organization for Animal Health (OIE). 2008, p. 251-264
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf (son erişim tarihi: 07.02.2014)
- 5 Levett P. *Leptospira* species, In: Versalovic J (ed in-chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10nd ed, ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 916-24.
- 6 Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect* 2013;43(1):1-9.
- 7 Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis, WHO, Geneva, 1982
- 8 Glynn K, Hartskeel R, Ko A, Meslin F. Leptospirosis. In: Heymann DL (ed). *Control of Communicable Diseases Manual*. 19th ed. American Public Health Association (APHA). United Book Press, Inc., Baltimore, Md. 2008, p. 351-357
- 9 Bey RF, Johnson RC. Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infect Immun* 1978;19:562-569
- 10 Terpstra W, Ligthart GS, Schoone GJ. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). *Zbl Bakt Hyg* 1980;247: 400-405
- 11 Cole JR, Ellinghausen HC, Rubin HL. Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. *Proc. U.S. Anim Health Assoc* 1980;83:189-199
- 12 Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO and International Leptospirosis Society (ILS), Geneva, 2003.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf (son erişim tarihi: 10.12.2013)
- 13 Schreier S, Doungchawee G, Chadsuthi S, Triampo D, Triampo W. Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9(3):263-80
- 14 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Lyme Hastalığının (*Borrelia burgdorferi* enfeksiyonunun) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-24
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizmalar	5
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	5
3 Lyme borrelioz tanısında kullanılan teknikler.....	7
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	10
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	11
6 Referans Laboratuvarlar	11
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	12
KAYNAKLAR.....	12

Kapsam ve Amaç

Lyme hastalığı (Lyme borrelioz), insanlara *Ixodes* türü sert kenelerle özellikle de *Ixodes ricinus* tarafından bulaşan *Borrelia* türlerinin neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur (1). Hastalık, Kuzey Amerika ve Avrupa'da en sık görülen kene kaynaklı enfeksiyon olup epidemik ve sporadik olarak bildirilmektedir (1,2).

Lyme borrelioz, insanlarda *Borrelia burgdorferi*'nin *B. burgdorferi* sensu lato kompleksinde yer alan *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* ve *B. afzelii* genotiplerinin oluşturduğu hastalığı tanımlamaktadır (3,4).

Lyme hastalığının tanısı başlıca 'iki-aşamalı seroloji' stratejisi ile desteklenmiş klinik tanıya dayanır (5). LB ülkemizde bildirimi zorunlu bir hastalıktır ve vaka tanımı da bu stratejiyi esas almaktadır (6). Tanıda daha az önemli olmakla beraber, kültür ve PCR da kullanılabilir (1,4,7). Ancak hangi yöntem olursa olsun, LB tanısı, rutin laboratuvarlardan ziyade uzmanlaşmış merkezlerde konulabilir.

Bu nedenle bu UMS'de, genel olarak laboratuvarlara LB tanı yaklaşımını ve bulguların yorumlanmasını kapsayan bir rehber sunulması hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

- BSK-H** Barbour-Stoenner-Kelly besiyeri
EM Erythema migrans (eskiden 'erythema chronicum migrans')
LB Lyme borrelioz
WB Western Blot

Genel Bilgi

Lyme hastalığı, *B. burgdorferi*'nin neden olduğu, deri, eklemler, kalp ve santral sinir sistemi gibi çok sayıda sistemi tutan, akut ve kronik evrelerle (remisyonlar ve alevlenmeler ile) seyreden multisistemik bir hastalıktır (2,3,8). Amerika ve Avrupa'da en sık görülen kene-kaynaklı enfeksiyondur.

Lyme hastalığı sıklıkla Kuzey Amerika ve Avrupa ülkeleri ile Rusya, Çin ve Japonya'da kaydedilmektedir. Vektörle bulaşan diğer hastalıklarda olduğu gibi LB epidemiyolojisi de vektörü olan kenenin yaşayabildiği iklim ve ekolojik şartlara göre şekillenir (1,5). Ülkemizde bazı bölgelerden LB seroprevalansına yönelik çalışma ve olgu bildirimleri olmasına karşın kapsamlı epidemiyolojik araştırmalar mevcut değildir.

B. burgdorferi, *Spirochetes* ailesinin *Borrelia* cinsine ait bir üyedir. Morfolojik olarak 0.2-0.5 µm x 3-30 µm boyutlarında, gram negatif, hareketli, flagellalı, mikraerofilik ve spiral burğu şekilli bakterilerdir (1,4). *Borrelia* türleri Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-H) besiyerinde, 30-35°C sıcaklıkta ürer. Yavaş üreme özelliği gösteren bakterinin ikiye bölünme süresi yaklaşık 7-20 saattir (ortalama 12 saat) (1,4,7).

En sık klinik bulgu hastalığın I. evresinde etkenin konağa giriş yerindeki deri lezyonu olan 'erythema migrans'dır (EM) (2,8,9,10). EM hastaların %60-80'inde ilk görülen bulgudur; tipik olarak kırmızı makül veya papül olarak başlayıp günler veya haftalarca sürebilir; büyük yuvarlak veya oval bir forma dönüşürken sıklıkla kısmî merkezi iyileşme gösterir. Hastaların çoğunda EM'ye yorgunluk, ateş, baş ağrısı, ense sertliği, artralji veya miyalji gibi diğer akut semptomlar eşlik eder. Bu semptomların tipik özelliği aralıklı olmalarıdır (2,8,9,10).

Tablo 1. Lyme hastalığının klinik evreleri (11)

Erken hastalık (Evre I ve II) - Kene ısırmasından sonraki birkaç günden birkaç haftaya kadar	
Erken lokalize	Kene ısırması yerinde EM
Erken yaygın	EM; ateş, grip benzeri belirtiler, baş ağrısı ve birden fazla cilt lezyonları ile birlikte Nörolojik belirtiler (%15); menenjit, kranial sinir felçleri, motor ve duysal radikülonevritler Kardiyak belirtiler (%5); atriyoventriküler bloklar, miyoperikardit
Geç hastalık (Evre III) - Hastalık başlangıcından aylar sonra	
Artrit	Tedavisiz hastaların ~%60'ında aralıklı artrit atakları gelişir
Kronik nöroborrelyoz	Tedavisiz hastaların ~%5'inde; kronik aksonal nöropati, kronik ensefalomiyelit (Avrupa'da <i>B. garinii</i> kaynaklı), kronik ensefalopati (bilişsel bozukluklar)
ACA	Avrupa'da <i>B.afzelii</i> 'nin neden olduğu kronik deri lezyonu

ACA, achrodermatitis chronica atrophicans

LB tanısında en son benimsenmiş olan 'iki-aşamalı seroloji' (ELISA/IFA ve WB) yaklaşımı ile desteklenmiş klinik tanıdır.

Lyme şüpheli bütün olgularda serolojik tanıda mutlaka iki-aşamalı test yaklaşımı uygulanır. ELISA ve IFA ilk aşama testleridir. ELISA IFA'ya nazaran daha yaygın olarak tercih edilir. Vakanın serumu bu testlerden biri ile negatif bulunduysa inceleme -*mevcut serum örneği için*- sonlandırılır. Eğer serum pozitif veya ara bir değerde pozitif bulunduysa ikinci aşamaya geçilir ve bir 'immünoblotting' test (WB) uygulanır (bkz. Şekil 1) (3,4,5).

Serolojik testlerin standardizasyonu genel olarak iyi değildir ve değerlendirmede dikkatli olunmasını gerektirirler. Hastalığın ilk haftalarında duyarlılıkları düşüktür ve erken dönemde antibiyotik almış vakalarda negatif kalabilirler (5).

Erken tanıda, rekombinant dış yüzey protein C'nin (rOspC) kullanıldığı IgM ELISA, tam hücre antijeninin kullanıldığı ELISA'dan daha duyarlıdır. VlsE (Vls lokus ekspresyon bölgesi) veya C6 rekombinant antijenleri ise IgG immünoblot duyarlılığını yükseltirler. Hastalığın ilerleyen evrelerinde test duyarlılıkları artar. Ancak bazı kronik Lyme hastalığı vakalarının seronegatif kalabileceği hatırlanmalıdır. Sifiliz, leptospiroz ve diğer spiroket hastalıklarında, HIV enfeksiyonu, enfeksiyöz mononükleoz, lupus veya romatoid artritte çapraz reaksiyonlar IFA ve ELISA'da yanlış pozitifliklere neden olabilirler (4,5).

Lyme hastalığında santral sinir sistemi tutulumunun tanısında intratekal antikor yapımının gösterilmesi gerekir ve BOS'da antikor bakılır. Etkenin kan ve doku örneklerinden kültürlerde üretilmesi güçtür. Ancak EM lezyonlarından alınmış biyopsi örneklerinde izolasyon oranı %80 gibi hayli yüksektir (5).

B.burgdorferi sensu lato genetik materyalini PCR ile eklem sıvısı, BOS, kan ve idrarda, deri ve diğer dokularda saptamak mümkündür. Ancak duyarlılık hayli düşüktür. En yüksek duyarlılık oranları Lyme artritli olguların eklem sıvılarının PCR'ında kaydedilmiş olmakla birlikte, bu tür olguların çok büyük bir kısmı aynı zamanda seropozitif oldukları -yani, serolojik olarak tanı konabildiği- için eklem sıvısından PCR öncelikli bir seçenek olmamaktadır (4,5).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizmalar

Borrelia burgdorferi'nin *B.burgdorferi sensu lato* kompleksi.

Moleküler çalışmalarla *B. burgdorferi*; *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. andersonii*, *B. bisettii*, *B. japonica*, *B. turdi*, *B. tanukii* ve *B. sinica* olmak üzere en az sekiz genotipe ayrılmaktadır.

Bu genotiplerin çoğu patojen olmayıp bazılarının (*B. valaisiana*, *B. bisettii*, *B. miyamotoi*, *B. lonestari*) patojen olma olasılığı vardır (2,7).

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

Borrelia spp Risk Grubu 2 organizmadır. Şüpheli bütün örnekler en az BGD2 laboratuvarlarda işlenmeli, kültürleri ile çalışılırken biyolojik güvenlik kabini kullanılmalıdır. Daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Borrelia türlerinin enfektif dozu çok düşüktür. İnsandan insana bulaşmaz. Kültürde genellikle 10-15 pasajdan sonra patojenitesini yitirir ve bu zamandan sonra artık enfeksiyöz değildir.

Serum/plazma örnekleri ile çalışılırken en ciddi risk personele kan-kaynaklı patojenlerin (HIV, hepatit etkenleri) bulaşma riskidir. Serum/plazma ayırma ve testlerin yapılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından, tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, reaktif, kit, donanım

İnceleme örnekleri

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serum - Serolojik tanı için, akut ve konvalesan fazlarda olmak üzere, hastadan 2-3 hafta ara ile 2 kez alınmalıdır.
- BOS - Serolojik inceleme, kültür ve moleküler tanı için kullanılabilir. En az 1 mL örnek alınmalıdır. BOS örneğinde kültür ve moleküler tanı duyarlılığı çok düşüktür (~%20). BOS daha ziyade antikorların varlığının gösterilmesi amacıyla alınır. BOS ile birlikte aynı anda serum da alınmalı ve gönderilmelidir; antikor indeksi bakılmalıdır.
- Eklem sıvısı örnekleri - Kültür ve moleküler tanı için iğne aspirasyonu ile alınıp gönderilebilir. En az 2 mL örnek alınmalıdır.

NOT: Enjektörle alınmış örnekler steril, vida kapaklı bir tüpe aktarılır. Örneğin enjektör ile gönderilmesi tercih edilmez ancak bu kaçınılmaz ise enjektörün iğnesi atılır ve ucuna bir 'Luer-Lok' takılarak gönderilir. Enjektör asla üzerinde iğne ile laboratuvara gönderilmemelidir!

- Kan - Kültür ve moleküler tanı için kullanılabilir. Kültür için hazırda uygun *Borrelia* kültür besiyeri (BSK-H besiyeri) yoksa ya da örnek laboratuvara hemen ulaştırılamayacaksa, heparinli veya sodyum oksalatlı, vakumlu bir tüpe kan alınır. Antikoagülan olarak **kesinlikle** sitrat kullanılmaz!
- Deri biyopsisi - Erken lokalize evrede (evre 1-ilk bir ay) kültürden *Borrelia* spp izolasyonu ve moleküler tanı için alınabilir. Örnek EM'li vakadan, deri lezyonunun kenar kısımlarından 'punch' biyopsi ile alınır. 1-2 mL steril SF eklenebilir. Kesinlikle formol eklenmez!

Tablo 2. Lyme borrelioz tanısında evrelere göre incelenebilecek örnekler (1,3,4,7).

Evre	Klinik Belirti	Örnek	
		Kültür, PCR	Antikor araştırılması
<i>Evre I: Erken lokalize Lyme - kene temasından günler-haftalar sonra</i>	EM	Deri biyopsisi	Serum
<i>Evre II: Erken yaygın Lyme - Kene temasından haftalar-aylar sonra</i>	Multiple EM Borreliyal lenfositoma Lyme karditi Nöroborrelioz	Deri biyopsisi Deri biyopsisi Endomiyokardiyal biyopsi BOS	Serum Serum Serum Serum ve BOS*
<i>Evre III: Geç, devam eden Lyme - Kene temasından aylar-yıllar sonra</i>	Atrit ACA Kronik Nöroborrelioz	Sinoviyal sıvı/biyopsi Deri biyopsisi BOS	Serum Serum Serum ve BOS*

*Antikor indeksinin hesaplanması için serum ve BOS örneği aynı gün içinde alınmalıdır.

Besiyeri / Reaktif / Kit

- ELISA veya IFA, WB – serolojik tanı için kitler piyasada mevcuttur.

Diğer materyal, donanım

- ELISA okuyucu, yıkayıcı
- Mikropipetler, otomatik ve pipet uçları

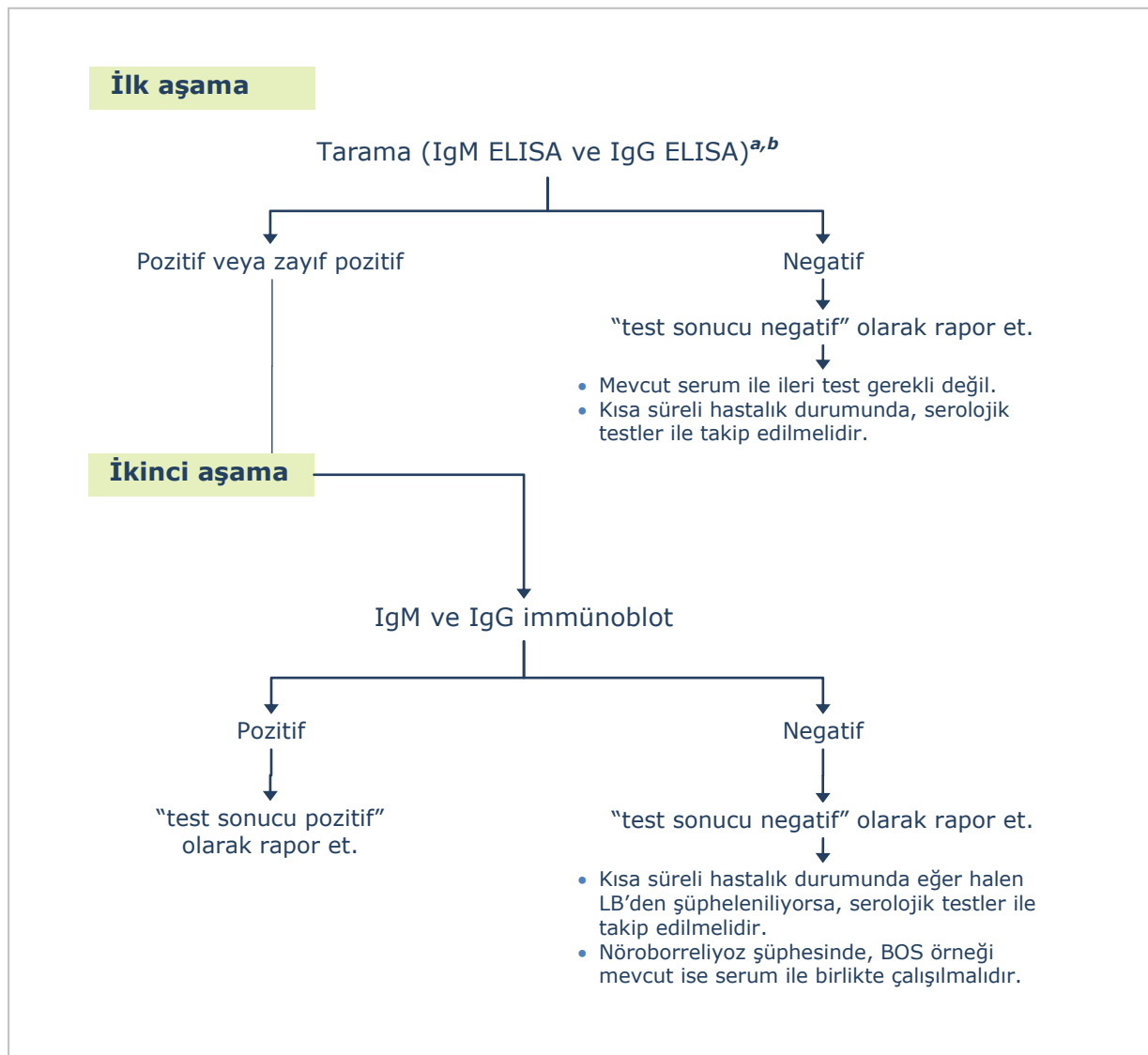
2.4. Kalite kontrol

- Her zaman kitlerin kontrol serumları kit talimatına göre teste dahil edilmelidir. Laboratuvar aynı zamanda kendi kalite kontrol serumlarına sahip olmalı ve testlere dahil etmelidir.
- Bütün donanımın bakım ve kalibrasyonları düzenli yapılmış olmalıdır.
- Bütün kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir

3 Lyme borrelioz tanısında kullanılan teknikler**3.1. Seroloji**

- Lyme hastalığının tanısı önemli ölçüde serolojiye dayanır. Klinik olarak LB'den şüphelenilen vakalarda iki-aşamalı test yaklaşımı uygulanır ve bu amaçla tarama testi olarak ELISA veya IFA ve doğrulama testi olarak WB kullanılır (bkz. Şekil 1) (1,4,5,8,10).
- Hastalarda IgM antikorları 2-4 haftada gelişir ve 4-6 ayda çok azalır. IgG antikorları ise 4-6 haftada gelişir ve tedaviye rağmen aylarca pozitif kalabilir.
- *B. burgdorferi* antijenlerinden hazırlanmış ticari ELISA kitleri çok geniş bir ürün yelpazesi oluşturmaktadır. Kitlerin hangi antijenler kullanılarak hazırlandığı önemli olabilir.
- Testler yapılırken üretici firmanın talimatları izlenmelidir. Test sonuçları da üretici firmanın belirttiği gibi; negatif, sınır değer (şüpheli) ve pozitif şeklinde değerlendirilir.
- Serum ve BOS örneklerinden ELISA ile *B. burgdorferi*'ye karşı oluşan IgM ve IgG antikorları tespit edilebilir.
- Tedavisiz LB vakalarının %15 kadarında nörolojik tutulum (menenjit, meningoensefalit vb.) olabilmektedir. Böyle vakalarda (nöroborrelioz) *B. burgdorferi*'ye karşı intratekal antikor üretimi gösterilmelidir.
- BOS'da antikor tayini için kullanılacak ELISA kitleri serum için üretilmiş olanlardan farklıdır ve laboratuvarın bu bilgi ile hareket etmesi gerekir.
- Ayrıca BOS antikorları incelenirken, kural olarak aynı anda alınmış serum örneği de incelenir ve antikor indeksi (AI) bakılır
(BOS antikor düzeyi / serum antikor düzeyi = AI).
- ELISA ile sınır değer veya pozitif test sonuçlarının referans yöntem olan WB ile doğrulanması gerekmektedir.

- Eğer laboratuvar tarama testi olarak IFA kullanmış ise, benzer şekilde sınırda pozitif veya pozitif bulunmuş sonuçlar WB ile doğrulanmalıdır.
- Western Blot (WB), ELISA veya IFA ile sınırda pozitif veya pozitif bulunmuş örneklerin doğrulanması amacıyla kullanılır.
- WB kitleri de geniş bir ürün yelpazesi oluşturmaktadır. Her bir kitte kullanılan antijenler farklıdır. Bu nedenle WB çalışması ve testin değerlendirilmesi üretici firma önerilerine göre yapılmalıdır.
- Genel olarak ticari kitlerde kullanılan bantlar Tablo 3’de verilmiştir.
- WB testlerinin değerlendirilmesinde kullanılabilecek akış diyagramları da Şekil 2’de verilmektedir.



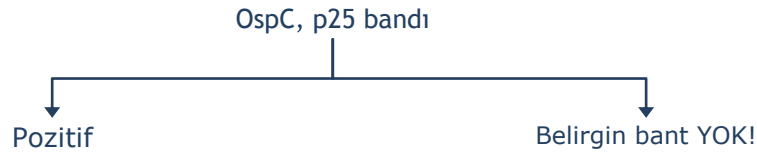
Şekil 1. LB tanısında iki-aşamalı seroloji stratejisinin uygulanışı (4).

^{a.} Nöroborreliyoş şüphesinde, intratekal antikor üretimi olup olmadığının gözlenmesi amacıyla hastadan aynı gün alınmış serum ve BOS örnekleri incelenmelidir (BOS antikor/serum antikor indeks [AI]).

^{b.} ELISA yerine IFA’da kullanılabilir.

Tablo 3. WB testi için piyasada bulunan ürünlerde genel olarak bulunan bantlar

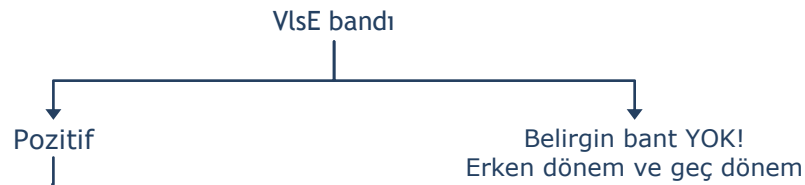
Bant	Antijen	Özgüllük
VlsE	Variable major protein-like sequence, expressed	Özgül
83kDa	Membran vezikal protein, p83	p100'un yıkım ürünü, özgül
41 kDa	Flagellin, p 41	Cinse özgül; diğer spiroketler ve flagellalı bakteriler ile çapraz reaksiyon
39 kDa	BmpA, p 39	Özgül
31 kDa	OspA, p 31	Dış membran protein A, özgül
30 kDa	P 30	Özgül
25 kDa	OspC, p 25	Dış membran protein C; "yeni-akut" enfeksiyon için gösterge
21 kDa	p 21	Özgül
19 kDa	p 19	Özgül
17 kDa	P 17	Özgül

IgM WB hızlı değerlendirme

IgM pozitif

Antikor sonuç**p83, p39, p31, p30, p21, p19 ve p17**

		TEK bant varlığı	Bant YOK
OspC	Bant (+)	Pozitif	Pozitif
	ZAYIF Bant	Pozitif	Sınır değer
	Bant (-)	Pozitif*	Negatif

IgG WB hızlı değerlendirme

IgG pozitif

Antikor sonuç**p83, p39, p31, p30, OspC (p25), p21, p19 ve p17**

		İki veya daha fazla BANT (+)	TEK Bant	Bant YOK
VlsE	Bant (+)	Pozitif	Pozitif	Pozitif
	ZAYIF Bant	Pozitif	Pozitif	Sınır değer
	Bant (-)	Pozitif*	Sınır değer	Negatif

Şekil 2. WB IgM ve IgG sonuçları için hızlı değerlendirme şemaları.

* Yeni enfeksiyon için karakteristik değil.

3.2. Kültür

- %5 tavşan kanlı BSK-H besiyeri kullanılır. Besiyerine neomisin, kanamisin, 5-fluorositozin, gentamisin, rifampisin eklenebilir. Steril tüplerde 5 mL besiyerine inokülasyon yapıldıktan sonra, tüpler mikroaerofil şartlarda 33°C'de inkübe edilir (1,3,4).
- Klinik örnekler, 30-34°C'de 10 gün-5 hafta süreyle inkübe edilir. Besi yerinin renginin kırmızıdan sarıya dönmesi üremenin olduğunu gösterir. Üreme gözlenen besiyerlerinden lam-lamel arası preparatlar karanlık alan mikroskobunda incelenir ve hareketli *Borrelia*ların varlığı gözlenir.

3.3. Moleküler (PCR)

- Erken lokalize evrede (evre 1, ilk bir ay) deri biyopsisi, erken yaygın enfeksiyonda (evre 2) kan ve BOS, ve persistan enfeksiyonda (evre 3) BOS ve eklem sıvısı örneklerinden çalışılabilir (1,3,7).
- En yüksek duyarlılık oranları Lyme artritli olguların eklem sıvılarının PCR'ında kaydedilmiş olmakla birlikte, bu tür olguların çok büyük bir kısmı aynı zamanda seropozitif oldukları -yani, serolojik olarak tanı konabildiği- için eklem sıvısından PCR öncelikli bir seçenek olmamaktadır (5).

3.4. Saklama, Referans merkeze gönderme

- Tanı uzmanlaşmış veya referans merkezlerde konulabilir. Lyme hastalığı şüpheli vaka söz konusu olduğunda bu merkezler ile bağlantı kurulmalı; örnekler bu merkezlere gönderilmelidir.
- Türkiye'de Lyme hastalığı referans merkezleri Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Etlik Veteriner Kontrol ve Merkez Araştırma Enstitüsü, Spiroket Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı ile THSK Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarıdır (bkz. sayfa 6).
- Örneklerin gönderilmesinde *paketlenme* ve *taşıma* biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (12) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

4.1. İki-aşamalı seroloji yorumu ve raporlanması (4)

- İlk test genellikle ELISA'dır ve test kitinin değerlendirme ölçütlerine göre ilk testten elde edilen sonuç "pozitif, negatif veya şüpheli (ara değer)" olarak raporlanır.
 - (a) "ara değer" bulunması halinde; 1-2 hafta sonra ikinci bir serum örneği istenmeli ve her iki serum örneği paralel çalışılmalıdır.
 - (b) "negatif" bulunması halinde, erken dönemde olduğu düşünülen ve LB şüphesi devam eden vakalar serolojik testler ile takip edilir.
 - (c) "pozitif" bulunan örneklerden WB çalışılır.

- WB testi sonucu da "pozitif" veya "negatif" olarak rapor edilir. WB sonuç raporunda ayrıca IgM ve IgG'lere karşı oluşan reaktif bantlar da rapor edilebilir.
- (a) WB'de oluşan bantların yorumlanması için akış şemaları Şekil 2'de verilmiştir.
- (b) WB sonuç raporunda eğer reaktif bantlar belirtilecekse, önemle vurgulamak gerekir ki; minimal reaktif bantların hatalı olarak pozitif yorumlanmasından ('overinterpretation') kaçınılmalıdır! Örneğin, Birleşik Devletlerde ve Avrupa'da sağlıklı bireylerin %50 kadarında p41'e karşı IgG reaktivitesi beklenir; bu nedenle Avrupa bu bant reaktivitesini skorlama ölçütleri arasından çıkarmıştır (4).
- İki-aşamalı yaklaşımın nihai sonucunun değerlendirmesi yapılır ve rapor edilir. Raporda, elde edilmiş bulguların tanısal anlamı da belirtilmelidir (4);
- (c) *örneğin* özgül antikorların saptanıp saptanmadığı, ve
- (d) test sonuçları izin verdiği ölçüde, bağışıklık yanıtının evresine göre serolojik bulguların yorumu yönünde ifadeler
- Ayrıca raporda, eğer gerekiyorsa, serolojik takip için veya diğer ileri incelemeler (PCR veya kültür) için önerilerde de bulunulmalıdır.

4.2. Diğer testlerin yorumu, raporlanması

- Genellikle öncelikle serolojik tanı kullanılır ve gerekiyorsa *Borrelia* kültürü veya PCR yapılır.
- Klinik örneklerden etkenin izolasyonu kesin tanı ölçütüdür.
- Negatif kültürler, "X günlük inkübasyonda *Borrelia* spp izole edilmemiştir" şeklinde raporlanır.
- Western Blot testinin sonuçları, üretici firmanın (test kitinin) değerlendirme ölçütlerine göre yorumlanır.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Lyme hastalığının tanısı az sayıda merkez tarafından yapılmaktadır.
- Hastalığın erken döneminde IgM ve IgG antikor yanıtının gecikebileceği göz önünde bulundurulmalı, uygun epidemiyolojik ve klinik bulguların varlığında ikinci deri biyopsisi ve ikinci serum örneği alınmalıdır.

6 Referans Laboratuvarlar

- 1) Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü,
 Spiroket Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı
 Ahmet Şefik Kolaylı Caddesi No:23
 06020 Esertepe, Keçiören - Ankara.
 Tel: 0312 326 0090

- 2) Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı
(Bakteriyel Zoonozlar P3 Laboratuvarı)
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok, Zemin kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA
Tel: 0312 565 5435 / 5562; Faks: 0312 565 5455; www.thsk.gov.tr

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Lyme Hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Pavia CS. Lyme Disease, *In: Goldman E, Green LH (eds). Practical Handbook of Microbiology*. 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, FL 2009, p. 252-256.
- 2 Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012;4:379(9814):461-73. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60103-7
- 3 Stanek S, Strle F, Gray JS, Wormser G. History and characteristics of Lyme borreliosis. *In: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G (eds). Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. 2002, p. 1-28.
- 4 Schriefer ME. *Borrelia*. *In: Versalovic J (ed in chief). Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed, ASM Press, Washington D.C 2011, p. 924-40.
- 5 Chomel B. Lyme disease. *In: Heymann DL (ed). Control of Communicable Diseases Manual*. 19th ed. American Public Health Association (APHA). United Book Press, Inc., Baltimore, Md. 2008, p. 364-369
- 6 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 7 Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:484-509.
- 8 Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis-European perspective. *Infect Dis Clin North Am* 2008;22: 327-339
- 9 Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP et al. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(1):69-79.doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03175.x
- 10 Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* 1977;86:685-698.
- 11 Maria E, Aquera-Rosenfeld. Detection of *Borrelia burgdorferi* antibodies. *In: Garcia LS (ed. in chief), Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. 2010, p. 11.6.1
- 12 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Epidemik tifüsün (*Rickettsia provazekii* enfeksiyonu) **Mikrobiyolojik Tanısı**

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-25
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
Mikroorganizmanın özellikleri.....	3
Hastalığın önemi.....	4
Klinik özellikleri	5
Laboratuvar tanısı.....	5
TEKNİK BİLGİLER	6
1 Hedef mikroorganizma	6
2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları	6
3 Epidemik tifüs tanısında kullanılan teknikler	8
4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim	9
5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	10
6 Referans Laboratuvar	10
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	11

Kapsam ve Amaç

Epidemik tifüs, *Rickettsia prowazekii*'nin neden olduğu bakteriyel bir hastalıktır (1). Asıl rezervuar insandır ve hastalık yalnız insanlarda görülür. Organizma enfekte bireylerden sağlıklı bireylere insan vücut bitleri ile (*Pediculus humanus corporis*) bulaşır (2,3). Hastalığın kesin tanısı mikrobiyolojik inceleme ile konur. Laboratuvarlarda kültür, seroloji ve PCR gibi yöntemlerden yararlanılabilir (2,4,5).

R. prowazekii yüksek enfeksiyöz potansiyeli nedeniyle biyotehdit ajanları arasında tanımlanır ve enfeksiyonlarının uluslararası bildirimi zorunludur (1,2,3). Dünya genelinde genellikle referans ya da yetkilendirilmiş laboratuvarlarda çalışılmasına izin verilen yüksek riskli bir organizmadır. Ülkemizde de bildirim sisteminde "ihbarı zorunlu hastalıklar" arasında sınıflandırılmıştır (6,7).

Bu özellikleri nedeniyle epidemik tifüs tanısı klinik mikrobiyolojinin 'rutin tanı' kapsamına girmemektedir. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol oynayacaktır. Ancak serolojik ve/veya moleküler tanı imkanlarına sahip klinik mikrobiyoloji laboratuvarları da ülkenin epidemik tifüs tanı kapasitesine destek olabilir. Dolayısı ile sahadaki laboratuvarlar için temel bir "hazırlıklılık" yaklaşımına gereksinim vardır.

Bu nedenle bu UMS belgesinde örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları, sorumluluklar ve tanıda kullanılan yöntemler ve tanı için izlenecek temel adımlar ile ilgili bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

buffy-coat	Santrifüj edilmiş antikoagülanlı kanın eritrosit tabakası ve plazması arasında kalan ve beyaz kan hücrelerini içeren (bulutsu) katmanı.
EDTA	Etilen daimin tetraasetik asit
FITC	Fluorescein isothiocyanate

Genel Bilgi

Epidemik tifüs aynı zamanda klasik tifüs, Avrupa tifüsü ya da bit kaynaklı ('louseborne') tifüs olarak da bilinmektedir. Etken *Rickettsia prowazekii* sadece insanda enfeksiyon yapan bir bakteridir; bireyler arasında insan vücut bitleri ile yayılır. Hastalığın baş biti ile de bulaşabileceğine dair laboratuvar kanıtları vardır. Tedavisiz olgularda mortalite hızı %30'a ulaşabilmektedir (2,3,8).

Mikroorganizmanın özellikleri

Riketsiyalar küçük ($0.3-0.5 \times 0.8-2\mu\text{m}$), pleomorfik, hareketsiz, gram negatif kokobasillerdir ve zorunlu hücre içi parazitidirler (1,2).

Rickettsia cinsi içinde yer alan türler antijenik olarak ilişkili organizmaları içeren üç alt gruba ayrılırlar: benekli ateş, tifüs ve maki-tifüs ('scrub typhus') grupları. Bunlardan tifüs ateşine neden olanlar enfekte hücrelerin sitoplazmalarında ürerken, benekli ateş grubunda olanlar hem sitoplazmada hem de nükleusta ürerler (9,10).

Riketsiyalar ancak hücre kültürlerinde üretilebilirler. Bu özelliği nedeniyle kültürleri sadece uygun donanıma sahip uzmanlaşmış laboratuvarlarda yapılabilmektedir. Yeni kültür izolasyon teknikleri ('shell vials' kültür) son yıllarda artan sayıda yeni kökenlerin bulunmasına yol açmıştır. 1984'te sadece 8 riketsiyal hastalık bilinirken takip eden yıllar içinde 12 yeni riketsiyal hastalık keşfedilmiştir ve keşfedilmeye de devam etmektedir (11). Bu da riketsiyaların halk sağlığı önemini gündemde tutmaktadır.

Riketsiyal hastalıklar ortak özelliklere sahiptirler: organizmalar dolaşım sistemini tutar, damar endotelini invaze eder ve endotel hasarına neden olurlar. Kanın dolaşım dışına kaçışı peteşiler, özellikle derinin kat yerlerinde gözlenen mikrohemorajiler ile sonuçlanır. Aynı zamanda kalp, beyin gibi hayati organlarda da nekroz meydana gelir (9).

Benzer şekilde *R. prowazekii* de periferik ince kan damarlarının endotelial hücrelerini enfekte ederek yaygın bir vaskülit gelişmesine neden olmaktadır (9).

İnsan vücut biti enfekte bireyin vücudundan organizmayı aldığı anda riketsiyalar bitin sindirim sisteminde çoğalır ve dışkı ile atılırlar. Enfekte bitler yeni konaklara geçtiklerinde dışkıları ile deriyi kontamine ederler. Riketsiyalar kaşıntı sonucu hasarlanan deriden girer; kontamine ellerle konjonktiva veya mukoz membranlar yoluyla da alınabilir. Enfeksiyon ayrıca kontamine toz veya aerosol solunması ile de yayılabilir (2,3,9,10)

Hastalığın önemi

Aerosol yoldan alınabilmesi ve ciddi klinik sonuçlar doğuran bir hastalığa neden olması nedeniyle *R. prowazekii* biyoterror ajanları arasında tanımlanmıştır. Eski Sovyetler Birliği ve Japonya'nın *R. prowazekii*'den savaş silahları geliştirdikleri bilinmektedir (9,10,12).

Epidemik tifüs en çok savaşlarda ve aşırı kalabalık ve kötü sanitasyon koşullarına neden olan şartlarda görülmektedir. 1812'de epidemik tifüs salgını Rusya'dan Napolyon'un sürülmesine yardım etmiştir. Daha yakınlarda, 1. Dünya Savaşında 30 milyon kişinin epidemik tifüs olduğu, 3 milyonunun da öldüğü tahmin edilmektedir. Bugün insidens hayli düşük olmakla birlikte Burundi, Rusya ve Cezayir'de görülen salgınlarla epidemik formun görüldüğü yeniden ortaya çıktığı kaydedilmektedir (3,4,9,10). Epidemik tifüs dünyanın bazı bölgelerinde (Meksika, Orta ve Güney Amerika ve çok sayıda Asya ülkesi) halen endemiktir.

Gelişmiş ülkelerde *R. prowazekii* enfeksiyonları nadiren kaydedilmektedir. Örneğin ABD'de 1976'dan 2001'e kadar toplam 39 vaka bildirilmiştir. Vakaların vücut biti öyküsü bulunmamaktadır, ancak ortak öyküleri, uçan sincaplarla temastır (9).

Laboratuvarların tasarımı ve tekniklerde büyük gelişmelere ve aşısının varlığına rağmen riketsiyal laboratuvar enfeksiyonları halen yaygındır ve sıklıkla fatal seyirlidir (9).

Klinik özellikleri

İnsanlarda *R. prowazekii* enfeksiyonu ani genel enfeksiyon bulguları ve şiddetli baş ağrısı ile başlar; üçüncü günde 40-41°C ye ulaşan ateşi takiben 4-7. günlerde makülopapüler döküntüler (yüz, avuç içi ve ayak tabanları hariç) ortaya çıkar. Döküntüler gövdenin üst kısmından başlayıp tüm vücuda yayılan bir karakter gösterir. Hastalarda bilinç bulanıklığı, dalgınlık, hezeyan, ajitasyon gibi nörolojik semptomların eşlik ettiği genel toksemi tablosu vardır (2,3,4,5). BOS'un normal olduğu bir menenjit tablosu gelişebilir. Rengi koyulaşan ve basmakla solmayan deri altı kanamaları görülebilir.

R. prowazekii, ilk enfeksiyonundan yıllar sonra nükseden, daha hafif ve daha kısa süreli Brill-Zinsser hastalığına da neden olabilmektedir. Bit salgınının olmamasına rağmen tifüsün görülmesi, etkenin insanlarda yıllarca canlı kalabileceğini göstermiştir. Tedavisiz olgularda yakınmalar 3-4 hafta sürer (2,4,13,14).

Bir salgın dönemi içinde vakaların klinik bulgulara dayanarak tanımlanmaları genellikle kolaydır. Ancak bir salgının başlangıcında henüz yeterince vaka tanımlanmamışken hastalığın akla getirilmesi güçtür. Epidemik tifüsün kliniği, başta tifo olmak üzere çok sayıda hastalık ve klinik durumu taklit edebilmektedir: pnömoni, meningoensefalitler, viral hepatitler, viral hemorajik ateşler, döküntülü viral enfeksiyonlar, meningokoksemi, sekonder sifiliz, leptospiroz, sıtma, viral veya bakteriyel gastroenteritler, akut abdomen, toksik şok sendromu, vb. (15).

Göçmen kamplarında yaşayan ve endemik bölgelerden geldiği bilinen bireyler, uçan sincaplara maruz kalma öyküsü ve evsizler de *R. prowazekii* enfeksiyonunun düşünülmesi gereken diğer şartları oluşturur. Bir biyoterör saldırısında bile döküntü başlamadıkça aerosol yoldan bulaşmış *R. prowazekii* enfeksiyonunun akla getirilmesi olasılığı hayli düşüktür (3,15).

Laboratuvar tanısı

Tifüs grubu riketsiyozların tanısında hücre kültürleri ve moleküler tekniklerde yakın dönemde önemli gelişmeler olmasına rağmen halen **seroloji** en kolay tanı yöntemi olarak önemini korumaktadır. Serolojik yöntemler arasında da IFA referans metottur.

Serolojinin en önemli dezavantajı tifüs grubu riketsiyozlar arasında çapraz reaksiyon veren antikorlar nedeniyle özgüllüğün düşük olmasıdır. Tanının doğrulanması için ileri bir serolojik teknik olarak Western Blot kullanılmaktadır. Bu testi sınırlayan faktör ise maliyetinin yüksekliğidir (16).

Etkenin HEL ('human embryonic lung' fibroblast) hücre kültürlerinden izolasyonu ile kesin tanı koymak mümkündür. En önemli avantajı, erken dönemde serokonversiyonu beklemeye gerek olmadan tanının doğrulanması ve uygun tedavi başlanmasına imkan sağlamasıdır. Ancak kültür yöntemleri sadece BGD3 laboratuvarlar ile sınırlıdır (3,4,5,16).

Kan örnekleri ve deri biyopsilerinden tifüs grubu riketsiyaların saptanmasında PCR ve nükleik asit dizileme teknikleri hızlı ve kullanışlı araçlardır. Son çalışmalar bit ilişkili hastalık sürveyansında ve özellikle de epidemik tifüs salgınlarında vücut bitlerine PCR uygulamasının da çok kullanışlı olduğunu göstermiştir (16).

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Rickettsia prowazekii

2 Tanı için asgari laboratuvar koşulları

2.1. Laboratuvar güvenliği

R. prowazekii Risk Grubu 3 mikroorganizmadır ve yüksek aerosol bulaş potansiyeli taşır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyona neden olabilir. Epidemik tifüs şüpheli klinik örneklerin kültür ve tanımlama işlemleri BGD3 standardına sahip bir laboratuvar ve sertifikalı bir sınıf-IIA BGK içinde yapılır. Serolojik ve moleküler tanı BGD2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir. Serum veya plazma örneklerinden çalışılırken en ciddi risk personele kan-kaynaklı patojenlerin (özellikle HIV ve hepatit etkenleri) bulaşma riskidir. Bütün düzeylerde daima standart güvenlik önlemleri uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi").

Serum ayırma ve testlerin yapılması sırasında **daima** eldiven giyilmelidir.

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Eğer klinisyen epidemik tifüsten şüpheleniyorsa, örnekler laboratuvara gönderilmeden önce hekim laboratuvar ile iletişim kurmalıdır.

Epidemik tifüs şüpheli örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda (özellikle kültür çalışan laboratuvarlarda) görev alan tüm personel; (i) tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı; (ii) kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; (iii) daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır.

Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir. Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.

Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

2.3. Örnek, Reaktif, Kit, Donanım

İnceleme örnekleri

Alınacak örnekler hastalığın klinik formuna göre belirlenir. Örneklerin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir.

Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir:

- Serum - Serolojik tanı için kullanılır. Epidemik tifüste en kolay ve hazır tanı yöntemi serolojidir. Kesin tanı için çift serum örneğinde sero-konversiyon veya titre artışının gösterilmesi önemli olduğundan hastadan akut faz örneği alındıktan 10-21 gün sonra ikinci serum örneği de gönderilmelidir. Eğer titre artışı yoksa 3-4 hafta sonra bir örnek daha gönderilir.
 - Tam kan - Kültür için heparinli tüpe alınır; en az 5 mL kan alınmalıdır. PCR için ise EDTA veya sodyum sitrat içeren tüp kullanılır; en az 2 mL kan alınmalıdır. Pıhtı oluşmaması için kan alınır alınmaz tüpler 5-6 kez yavaşça alt üst edilerek karıştırılmalıdır.
 - Doku biyopsi örnekleri – Kültür veya PCR için kullanılır. Doku SF içeren steril bir tüpte gönderilebilir. Kesinlikle formol içermemelidir.
- NOT: İnvaziv girişim gerektiren bütün örnekler aseptik şartlarda hekim tarafından alınmalıdır.

Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi

- Epidemik tifüs şüphesinde örnekler İl Halk Sağlığı Müdürlüğü kanalıyla Referans laboratuvarına gönderilir. Bu nedenle en kısa sürede İl Halk Sağlığı Müdürlüğü ile bağlantı kurulmalıdır. Örnekleri göndermeden önce laboratuvar ile de telefon bağlantısı kurulmalıdır.
- Serum 2 saat içinde oda sıcaklığında veya 48 saate kadar +4°C'de transfer edilebilir. Serumun laboratuvara ulaşması 48 saatten uzun sürecek ise dondurulmalı ve kuru buz içinde gönderilmelidir.
- Plazma, 'buffy-coat', tam kan ya da doku biyopsileri gibi örneklerin hücre kültürü ya da hayvanlara ekimleri 24 saatten fazla gecikecekse hemen -70°C'ye ya da sıvı azota konmaları gerekir. PCR testi birkaç gün içinde yapılmayacaksa örnek $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır.
- Örneklerin gönderilmesinde *paketlenme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (17,18) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

Reaktif / Kit

- IFA kiti - ticari olarak piyasada mevcuttur. Kit şunları içeriyor olmalıdır:
 - (a) IFA lamları – çukurlarında *R. prowazekii* dahil riketsiyal antijenler kaplı, çukurları teflonla çevrelenmiş; 4°C'de ya da -20°C'de saklanır.
 - (b) Konjugat – FITC işaretli keçi anti-human IgM veya IgG konjugat. Üreticinin talimatına göre sulandırılarak kullanılır.
 - (c) Pozitif ve negatif kontrol serumları
 - (d) Serum diluenti (%10 yumurta sarısı kesesi, PBS vb.) - kit içinde mevcut değilse laboratuvar ayrıca temin etmelidir.

NOT: Eğer bakteri, sarı kesesi kültürlerinden pürifiye edilmiş ise, -sarı kesesi antijenleri ile *özgül olmayan* reaksiyona girebilecek antikörlerin absorpsiyonu için- %10'luk sarı kesesi dilüent tampon tercih edilmelidir.
- PBS, pH 7.4
- İmmersion yağı – çok düşük floresan

- Lam kaplama solüsyonu ('mounting medium') – tamponlu gliserindir (%75'lik gliserol-PBS). Ticari olarak temin edilebilir veya laboratuvarında hazırlanabilir. Bunun için; 7.5 mL gliserole 2.5 mL PBS eklenir, pH 8.5.
- ELISA – serolojik tanı için ELISA da kullanılabilir.

Diğer gereç, donanım

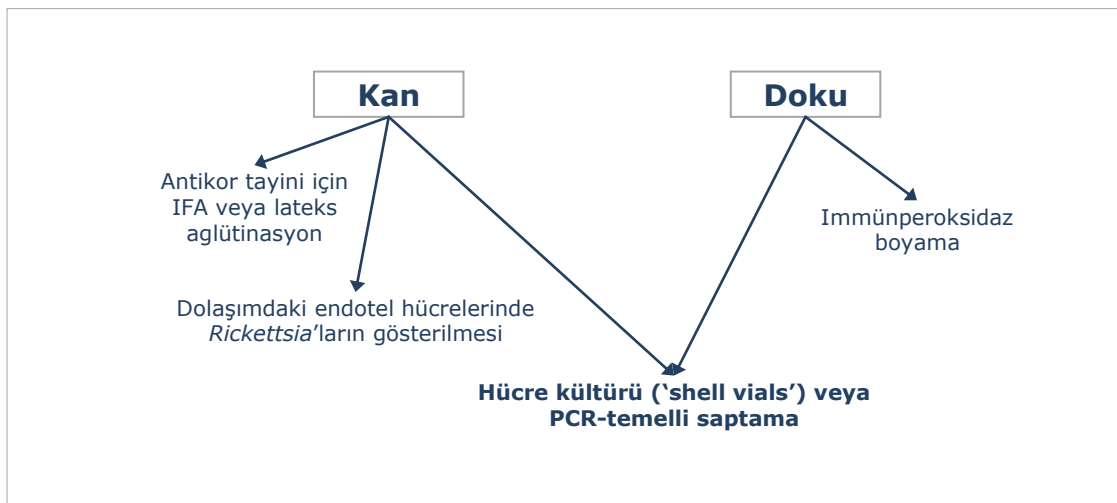
- Floresan mikroskop - objektifler 40× ve 100× immersiyon; oküler 10×; BG38, K480, KP490 (iki), TK510, K515 *FITC filtreleri* ile.
- İnkübatör (36 ±1°C)
- Mikropipetler (10-200 µL) ve pipet uçları
- Santrifüj
- Su banyosu, 56°C
- Mikroplaklar, 96-çukurlu – serum dilüsyonu için
- ELISA okuyucu, yıkayıcı – ELISA çalışması yapılacaksa

2.4. Kalite kontrol

- Kullanılan kitlerin son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir.
- Her testte pozitif ve negatif kontrollerin kullanılması esastır.
- Tüm ekipmanın bakım ve kalibrasyonu yapılmış olmalıdır.
- Tüm kalite kontrol sonuçları kaydedilmelidir.

3 Epidemik tifüs tanısında kullanılan teknikler

3.1. Örneklerin işlenmesinde tanı yaklaşımı şeması



Şekil 1. Riketsiyozların laboratuvar tanısında incelenebilecek örnekler ve genel tanı yaklaşımı şeması (16)

3.2. Seroloji

- *R. prowazekii*'nin tanısında serolojik testler öncelikle tercih edilir. Serumda IgM ve IgG varlığının araştırılması amacıyla ticari IFA ve ELISA kitleri geliştirilmiştir (1,2,5,19,20).
- IFA günümüzde epidemik tifüsün serolojik tanısında referans yöntem olarak kabul edilmektedir (1,2,19).
- IFA kolayca uygulanabilen, hızlı, test için çok az miktarda antijene gereksinim gösteren ve her iki faza karşı gelişen IgM ve IgG sınıfı antikorları saptayarak hastalığın evresinin belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir.
- IFA ile 10-14 gün ara ile alınan çift serum örneğinde negatiften pozitif değişim (serokonversiyon) veya antikor titresinin dört kat artışı epidemik tifüs tanısını koydurur.
- Serokonversiyonun beklenmesi tanıda gecikmeye neden olur. Öte yandan, genellikle hastalardan tek bir serum örneği alınmakta ya da alınabilmektedir. Bu durumda tek serum örneğinde gözlenen titreler üzerinden değerlendirme yapılması gerekir.
- ELISA ise, yüksek duyarlılığı, otomatize çalışma potansiyeli ve sero-epidemiolojik saha araştırmalarına kolay uygulanabilmesi nedeniyle avantajlı bir yöntemdir. Son yıllarda ELISA'nın ticari olarak üretilmesi epidemik tifüs tanısında standardizasyonunu sağlamıştır (2,14,19,20).

3.3. Kültür

- Riketsiyaların izolasyonu için kan, kemik iliği, BOS ve homojenize doku örneklerinden hücre kültürü sistemlerine ve embriyolu tavuk yumurtalarına ekim yapılır.
- Kültür uzmanlaşmış laboratuvar gerektiren bir yöntemdir. Referans merkezlerde BGD3 laboratuvar şartlarında gerçekleştirilir (13,19,20).

3.3. Moleküler

- Epidemik tifüs tanısında PCR kullanılmaktadır. *R. prowazekii* özgül gen bölgesinin gösterilmesi (pozitif PCR sonucu) "kesin tanı" bulgusudur (2,14,19,20).

4 Test sonuçlarının yorumu, raporlama, bildirim

- IFA ile tek serum örneğinde IgG titresinin $\geq 1/64$ ve aynı zamanda IgM titresinin $\geq 1/64$ olması akut epidemik tifüs olarak değerlendirilir ve "kesin tanı" bulgusudur.
- Tek serum örneğinde IgM negatif, ancak IgG titresinin $\geq 1/256$ olması yeni geçirilmiş enfeksiyon lehine yorumlanır (14,19).
- Hastadan 10-14 gün ara ile alınan ikinci serum örneğinde IFA testi ile, ilk serum örneğine göre 4 kat titre artışı saptanması "kesin tanı" bulgusudur.

- IFA sonuçları rapor edilirken testte saptanan titreler yazılmalı, tanısal değerler belirtilmelidir.
- ELISA'da sonuçlar "pozitif", "negatif" veya "sınır değer" olarak rapor edilir. Sınır değer durumunda ilk örnek ve 10-14 gün sonra alınan ikinci örneğin her ikisi birden aynı anda tekrar çalışılır.
- Epidemik tifüs ülkemizde ihbarı zorunlu bir hastalıktır (6,7). Hastanın raporu hekime gönderilirken hemen harekete geçebilmeleri için ilgili birimler de sonuç hakkında bilgilendirilmelidir.

5 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Riketsiyal hastalıkların tanısı sınırlı sayıda merkez tarafından konulabilmektedir.
- Serolojik testlerde *R. prowazekii* diğer riketsiya türleri, *Proteus* ve *Legionella*'lar ile çapraz reaksiyon verebilir (2,14,19,20).
- *R. prowazekii* Risk Grubu 3 organizmadır. Kültürleri kesinlikle asgari BGD3 standartlarına sahip laboratuvarlarda yapılmalıdır (1,2,13).

6 Referans Laboratuvar

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı
(Bakteriyel Zoonozlar P3 Laboratuvarı)
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok, Zemin kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5435 / 5562 Faks: 0312 565 5455
www.thsk.gov.tr

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Epidemik Tifüsün Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, SY-02	Akut kanamalı ateş sendromu
UMS, V-MT-11	Viral hemorajik ateş sendromunda mikrobiyolojik tanı
UMS, V-MT-12	Kırım-Kongo kanamalı ateşinin mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-13	Hantavirus enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-14	Sarı hummanın mikrobiyolojik tanısı
UMS, V-MT-16	Chikungunya ateşinin mikrobiyolojik tanısı
UMS, B-MT-23	Leptospirozun mikrobiyolojik tanısı
UMS, GEN-OY-01	Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 Azad AF, Beier-Sexton M. Gillespie JJ. The Family *Rickettsiaceae*. In: Goldman E, Green LH (eds). *Practical Handbook of Microbiology*. 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, FL. 2009, p. 445-7.
- 2 Walker DH, Bouyer DH. *Rickettsia* and *Orientia*, In: Versalovic J (editor in chief). *Manual of Clinical Microbiology*. 10nd ed, ASM Press, Washington D.C. 2011, p. 1001-13.
- 3 Walker DH. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clin Infect Dis* 2007;45 Suppl 1:S39-44
- 4 Bechah Y, Capo C, Mege JL, Raoult D. Epidemic typhus. *Lancet Infect Dis* 2008; 8(7): 417-26
- 5 Badiaga S, Brouqui P. Human louse-transmitted infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(4):332-7
- 6 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 7 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 8 Svraka S, Rolain JM, Bechah Y, Gatabazi J, Raoult D. *Rickettsia prowazekii* and real-time polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12(3): 428-32
- 9 Black JG, ed. Rickettsial and Related Systemic Diseases. In: Microbiology: principles and explorations. 7th ed. ISBN 978-0-470-10748-5, John Wiley & Sons, Inc., USA. 2008, p.735.
- 10 Kelly P, Angelakis E, Raoult D. Rickettsia and rickettsia-like organisms. In: Cohen J, Opal SM, Powderly WG, et al, eds. *Infectious diseases*. 3rd ed. Elsevier Ltd, 2010; p.1806
- 11 Dobler G, Wölfel R. Typhus and other rickettsioses. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(20): 348-54.
- 12 Sharp S. Plaque. Bioterrorism. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington, DC, 2007, p.16.7.1
- 13 Agent Summary Statements: Rickettsial Agents. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. CDC, Atlanta, Georgia, USA. 2009 p. 196-9,
- 14 Jensenius M, Fournier P, Raoult D. Rickettsioses and the international traveler. *Clin Infect Dis*. 2004;10:1493-9.
- 15 Raoult D, Walker DH. *Rickettsia prowazekii* (Epidemic or Louse-Borne Typhus) Chapter 187. In: Mandell, Bennett, & Dolin: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Churchill Livingstone, Elsevier. 2005.
- 16 La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2715-27
- 17 WHO. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013–2014. World Health Organisation. WHO/HSE/GCR/2012.12, 2012.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78075/1/WHO_HSE_GCR_2012.12_eng.pdf
- 18 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.
- 19 CDC. Eremeeva ME, Dasch GA. Rickettsial (Spotted and Typhus Fevers) and related infections (Anaplasmosis and Ehrlichiosis). Travelers' Health: Chapter 3 - *Infectious Diseases Related to Travel*. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/rickettsial-spotted-and-typhus-fevers-and-related-infections-anaplasmosis-and-ehrlichiosis.htm> (son erişim tarihi: 04.02.2014)
- 20 Kováčová E, Kazár J. Rickettsial diseases and their serological diagnosis. *Clin Lab* 2000;46(5-6):239-45

ULUSAL MİKROBİYOLOJİ STANDARTLARI (UMS)

Vebanın (*Yersinia Pestis* enfeksiyonunun) Mikrobiyolojik Tanısı

Hazırlayan Birim	Klinik Bakteriyoloji Tanı Standartları Çalışma Grubu
Onaylayan Birim	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Kategori	Bakteriyoloji
Bölüm	Mikrobiyolojik Tanımlama
Standart No	B-MT-26
Sürüm No	1.1
Onay tarihi	01.01.2015
Geçerlilik tarihi	01.01.2018

Sürüm no	Tarih	Değişiklik

İÇİNDEKİLER

KAPSAM VE AMAÇ.....	3
KISALTMALAR VE TANIMLAR	3
GENEL BİLGİ	3
TEKNİK BİLGİLER	5
1 Hedef mikroorganizma	5
2 Tanı için asgari gerekler.....	5
3 İnceleme örneklerinin alınması, gönderilmesi	6
4 Vebanın tanısında kullanılan teknikler	7
5 Değerlendirme, yorum.....	8
6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar.....	9
7 Referans Laboratuvar	9
İLGİLİ DİĞER UMS BELGELERİ.....	10
KAYNAKLAR.....	10

Kapsam ve Amaç

Veba, *Yersinia pestis*'in oluşturduğu, bubonik veba (hiyarcık vebası), pnömoni (akciğer vebası), sepsis, menenjit gibi akut ve fatal seyirli tablolarla ortaya çıkabilen zoonotik bir enfeksiyondur. Ana rezervuarları sıçan, sincap, bayır sıçanları, yabani tavşanlar ile bu hayvanlardaki bit, pire gibi ektoparazitlerdir.

Y. pestis yüksek enfeksiyöz potansiyeli nedeniyle biyotehdit ajanları arasında tanımlanır ve enfeksiyonlarının uluslararası bildirimi zorunludur (1). Dünya genelinde genellikle referans ya da yetkilendirilmiş laboratuvarlarda çalışılmasına izin verilen yüksek riskli bir organizmadır. Ülkemizde de bildirim sisteminde "ihbarı zorunlu hastalıklar" arasında sınıflandırılmıştır (2,3).

Bu özellikleri nedeniyle veba tanısı klinik mikrobiyolojinin rutin tanı kapsamına girmemektedir. Şüpheli durumlarda bir klinik laboratuvar büyük olasılıkla yatan hastadan örneklerin alınması ve Referans laboratuvara gönderilmesinde rol oynayacaktır. Ancak düşük de olsa vebadan şüphelenilmeksizin örneklerin klinik laboratuvara gelmiş olması ve bir *Enterobacteriaceae* üyesi olan organizmanın rutin kültürlerden izole edilmesi olasılığı vardır. Dolayısı ile sahadaki laboratuvarları da göz önüne alan temel bir "hazırlıklılık" stratejisine gereksinim duyulur. Bu nedenle, bu UMS belgesinde örnek yönetimi, asgari laboratuvar şartları, sorumluluklar, ilgili birimlerle işbirliği ve tanı süreçleri içinde izlenecek temel adımlar hakkında bilgi verilmesi hedeflenmiştir.

Kısaltmalar ve Tanımlar

BGK Biyolojik güvenlik kabini

KKD Kişisel koruyucu donanım

Genel Bilgi

Veba dünyada bilinen en eski ve en tehlikeli zoonozlardan birisidir. Kaynağı vahşi doğada yaşayan kemiricilerdir (1,4). Güney Amerika ve Kuzey Amerika'nın batı bölgeleri, Orta Doğu ve Güney Afrika, Kuzey Afrika ile Hazar denizini çevreleyen bölgelerde vahşi kemiricilerde varlığını sürdürmekte; enzootik alanlarda evcil kemiricilerle karşılaşma riski ve halk sağlığı tehdidi devam etmektedir. 1990'lara kadar dünyanın pek çok yerinde kentsel alanlarda kontrol altına alınmışken bazı Afrika kentlerinde yeniden görülmeye başlaması dikkatle izlenmektedir. Çin, Hindistan, bazı diğer Orta ve Güneydoğu Asya ülkelerinde ise veba halen endemik bir enfeksiyondur ve sıklıkla epidemik potansiyeli taşır.

Veba uluslararası bildirimi zorunlu enfeksiyonlar arasındadır.

Y.pestis, *Enterobacteriaceae* ailesi içinde yer alan gram negatif, hareketsiz, fakültatif anaerop, sporsuz, 1.5×0.7 µm boyutunda, kısa, oval kokobasil morfolojisinde bir bakteridir (1,4,5). Spor oluşturmadığı için dış ortam koşullarına çok dayanıklı değildir. Güneş ışığına ve ısıya karşı oldukça duyarlı olduğu için konak dışında uzun süre varlığını devam ettiremez (1). Ancak su, nemli toprak ve

hububat içerisinde haftalarca canlı kalabilir. Donma noktasına yakın sıcaklıklarda aylarca hatta yıllarca canlılığını sürdürebilir. Kurumuş balgam, pire dışkısı ve ölü vücudunda da bir süre canlılığını devam ettirebilir. Isı etkisi ile (55°C'de) 15 dakikada ve kimyasal dezenfektanlardan %0.5 fenolde 10-15 dakika ölür (1,6,7).

Y.pestis genellikle fare piresi (*Xenopsylla cheopis*) ısırığı ile insanlara bulaşırsa da, enfekte doku ile direkt temas veya akciğer tutulumu olan insan veya hayvanların solunum yollarından yayılan aerosoller ile de bulaşabilir (4,8). Deve piresi, bit, kene, mite ve kan emen diğer ektoparazitler de bakterinin insanlara yayılmasında rol oynayabilirler (1,6). Enfeksiyon insandan insana nadir olarak insan pireleriyle de bulaşabilir; bu döngüye şehir vebasası adı verilir (1,4).

Etkenin konağa giriş yoluna göre hastalık bubonik veba, veba sepsisi ve akciğer vebasası olmak üzere üç ana klinik formda ortaya çıkabilir. Bu formların dışında, daha nadir olarak menenjit, farenjit veya deri bulguları ile seyreden klinik formlar da görülebilir.

Bubonik veba enfekte pire ısırığı veya ciltteki hasarlı bölgelerin enfekte hayvanların doku ve vücut sıvıları ile teması sonucu meydana gelir. En sık rastlanan (%75) klinik tablodur. İki ile on gün arasındaki kuluçka süresini takiben ateş, titreme, baş ağrısı, eklem ağrısı, miyalji, halsizlik, bir veya birden fazla bölgede lenf bezlerinde büyüme (bubonlar) ve ağrı gibi semptomlar ortaya çıkar. Bunlara bulantı, kusma, karın ağrısı sıklıkla eşlik eder (4,5,6). Bubonlar ısırik bölgesine (ya da bakterinin vücuda girdiği yere) en yakın lenf bezlerinde organizmanın çoğalmasının bir sonucudur; palpasyon ile tipik -ve tularemik bubonlardan farklı- olarak sabittir; etkilenmiş lenf nodlarının ayrı ayrı tespit edilemez olması ile tanımlanabilir. Ayrıca bubon üzerindeki deride yerel olarak sıcaklık artışı ve eritem olabilir. Uygun antibiyotik tedavisi başlanmaz ise bubonlardan sistemik yayılım gerçekleşebilir. Örneğin, veba menenjiti bubonik vebanın yetersiz tedavi edilmesine bağlı bir komplikasyon olarak gelişir (4,6,8).

Akciğer vebasası, doğrudan enfeksiyöz damlacıkların solunması ile (primer) ya da bubonik veba sırasında bakterilerin hematogen yoldan akciğere yayılması ile (sekonder) gelişebilir. Akciğer vebasında, birkaç saat ile 1-2 gün arasında değişen bir kuluçka süresini takiben yüksek ateş, baş ağrısı, miyalji, güçsüzlük ve akciğer belirtileri (göğüs ağrısı, prodüktif bir öksürük, takipne, dispne, hipotansiyon ve solunum güçlüğü) gelişir (4,6). Plevral göğüs ağrısı, kanlı balgam çıkarma, pulmoner ödem, subkutan amfizem gelişebilir. Hastaların çoğunda ajitasyon, agresif davranışlar gibi mental durum değişiklikleri görülebilir. Akciğer vebasası hastalığın en ciddi formudur ve aynı zamanda enfeksiyöz solunum yolu damlacıklarıyla insandan insana bulaşabilen formdur (4,6,8). Erken tedaviyle bile ölüm oranı yaklaşık %10-20'dir, tedavi verilmezse ölüm oranı %90'a kadar çıkabilmektedir.

Septisemik veba tedavi edilmemiş bubonik veya akciğer vebasının bir komplikasyonu olarak gelişebilir. Belirgin lenfadenopati olmayabilir. Tedavi edilmezse %100 fataldir (1,4).

Veba klinik özellikleri bakımından tularemi ile büyük benzerlik gösterir ve bazen sadece epidemiyolojik risk faktörleri temelinde ayırım mümkün olabilir. Ancak önemli bir fark olarak, akciğer vebasında seyir tularemiye nazaran daha fulminandır.

Şüpheli vakalarda endemik bölgede yaşama veya endemik bölgeye seyahat öyküsü ön tanıyı güçlendiren önemli bir bilgidir.

Teknik Bilgiler

1 Hedef mikroorganizma

Yersinia pestis

2 Tanı için asgari gerekler

2.1. Laboratuvar güvenliği

Y. pestis Risk Grubu 3 mikroorganizmadır ve yüksek aerosol bulaş potansiyeli taşır. Laboratuvar kaynaklı enfeksiyona neden olabilir. Veba kuşkulu klinik örneklerin kültür ve tanımlama işlemleri BGD3 standardına sahip bir laboratuvar ve sınıf-IIA BGK içinde yapılır. Ayrıca standart güvenlik önlemleri daima uygulanmalıdır (bkz. "Ulusal Laboratuvar Güvenliği Rehberi") (7,9,10).

2.2. Sorumluluklar ve asgari personel gerekleri

Veba şüpheli bir vakanın tanısında klinik örneklerin Referans laboratuvara gelmesinden *önce* ve *sonra* olmak üzere iki temel süreç vardır.

Laboratuvar öncesi süreçte, hastanın yatırıldığı hastanenin klinik ve laboratuvar personeli ilgili ve sorumludur. Sorumluluklar başlıca hastanın izolasyonunu, örnek alınırken uyulması gereken önlemleri ve örneklerin güvenli bir şekilde referans laboratuvara nakledilmesini içerir. Buna göre;

- Veba şüpheli hastalar (özellikle akciğer vebası) hemen izole edilmeli ve bulaşma riski açısından yüksek koruma kontrol önlemleri alınmalıdır. Enfekte hasta çıkartılarının güvenli imhası temin edilmelidir. Hasta izolasyonu antibiyotik tedavisi başladıktan sonra en az 48 saat veya balgam kültürü negatif oluncaya devam etmelidir.
- Solunum yolu örneklerini alırken hem örnek alan hem de eşlik eden sağlık personeli mutlaka uygun KKD (en azından; FFP3 ventilli maske, gözlük ya da yüz kalkanı ve çift eldiven) kullanmalıdır.
- Hasta ile temas etmiş bütün personel muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli, herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.
- Hastanenin laboratuvarı hastadan alınan bütün örnekleri (varsa, veba düşünülmeden önce *non-spesifik* tanı için kendisine gönderilmiş örnekler ve şüpheli izolatlar dahil) güvenli bir şekilde paketlenerek Referans laboratuvara gönderilmesini sağlamalıdır (bkz. 3.2).

Laboratuvar sürecinde ise;

- Veba şüpheli örneklerin kabul edilmesinden sonucun raporlanmasına kadarki adımlarda görev alan tüm personel, hem BGD3'de çalışmaya başlamadan önce, hem de tekniklerin uygulanmasından önce amaçlanan bütün kullanımlar ile ilgili tam bir eğitim almış olmalı;

kullanılan tekniklere tüm yönleriyle aşina olmalı; daima tüm laboratuvar güvenlik kurallarına uymalıdır. Bu kurallar örnek kabulü dahil bütün tanımlama aşamalarında **aerosol önlemlerine** yüksek uyumu gerektirir.

- (b) Laboratuvar personeli, muhtemel klinik semptomlarla ilgili bilgilendirilmeli, herhangi bir semptom gelişimi halinde haber verilmesi zorunlu tutulmalıdır.
- (c) Hem güvenlik önlemlerine uyumun sağlanmasından hem de tekniklerin standart prosedürlere uygun gerçekleştirilmesinden ve tanının doğruluğu ve güvenilirliğinden Mikrobiyoloji Uzmanı sorumludur.

3 İnceleme örneklerinin alınması, gönderilmesi

3.1. İnceleme örnekleri

Veba tanısı için mikrobiyolojik incelemeler Referans Laboratuvar'da yapılır ve örnekler Referans Laboratuvar'a gönderilir. Örnek alınacak vücut bölgesi veya alınacak örnekler hastalığın klinik formuna göre belirlenir:

Kültür, mikroskopiler ve PCR için uygun örnekler; bubonlardan aspirasyon materyali, kan, kemik iliği, solunum yolu örnekleri (balgam, BAL, bronşial yıkama, endotrakeal veya akciğer aspirat örnekleri, akciğer doku biyopsi örneği) ve BOS'dur.

Serolojik tanı için serum örneği alınabilir. Akut ve konvalesan faz için olmak üzere, hastadan 2-3 hafta ara ile 2 kez serum gönderilmelidir.

Örneklerinin alınması ve gönderilmesine ilişkin detaylı bilgi "Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısı için Saha Rehberi"nden edinilebilir. Aşağıda bazı önemli noktalara tekrar dikkat çekilmektedir. Buna göre:

- Hemen bütün örnekler invaziv örneklerdir. Aseptik şartlarda hekim tarafından alınmalıdır.
- Lenf nodu (bubo) aspiratı muhtemelen en sık alınacak örnektir. Örnek bir enjektör aracılığıyla aspire edilerek; eğer lenf bezinde süpürasyon yoksa doku içine 0.5-1 mL steril SF enjekte ettikten sonra aspirasyon yapılarak alınır. Aspire edilen materyal steril vida kapaklı tüpe aktarılır.

NOT: Aspirat alındığı enjektör içinde laboratuvar'a gönderilmez.

Enjektör ile gönderilmesi kaçınılmaz ise iğne atılır ve bir 'Luer-Lok' (enjektör ucu için sızdırmaz kapak) takılır.

Enjektör **asla** üzerinde bir iğne ile laboratuvar'a gönderilmemelidir!

- Kan kültürü için vakadan 30 dk aralıklarla 4 örnek alınması önerilir (9).
- Kan, kemik iliği ve BOS örnekleri kesinlikle buzdolabına konmamalıdır. Kemik iliği örneği pıhtılaşmasını önlemek için EDTA'lı veya sodyum sitratlı bir kan tüpüne konur.
- Akciğer vebası klinik olarak ağır bir tablodur ve hasta balgam örneği vermek için işbirliği yapamayabilir. Diğer solunum yolu örneklerini (BAL, trakeal aspirat vb.) almak gerekebilir.

3.2. Referans merkeze gönderme

- Örneklerin Referans merkeze gönderilmesi ile ilgili olarak 2 olasılık söz konusudur:
 - (a) Birincisi, klinik ve epidemiyolojik (endemik bölgeye seyahat, biyoterör olasılığı vb.) bulgular ile sağlık kurumuna başvuran bir vakada vebadan şüphelenilmesi durumu – Bu durumda örnekler doğrudan Referans laboratuvarına gönderilir.
 - (b) İkincisi, vebadan şüphe edilmeden örneklerin (ör., rutin inceleme için lenf nodu aspirasyon örneği) klinik laboratuvarına gönderilmiş olduğu, ancak incelemeler sürerken etkenin *Y.pestis* olabileceğinin düşünüldüğü durum – Böyle bir durumda o ana kadar elde edilmiş izolatlar ve saklanmış örneklerin hepsi hemen Referans laboratuvarına gönderilir (ayrıca bkz. "4.1 Ön hazırlık ve gerekler").
- Şüpheli örnekler İl Halk Sağlığı Müdürlüğü kanalıyla Referans laboratuvarına gönderilir. Bu nedenle en kısa sürede İl Halk Sağlığı Müdürlüğü ile bağlantı kurulmalıdır. Örnekleri göndermeden önce laboratuvarla da telefon bağlantısı kurulmalıdır.
- Kan, kemik iliği ve BOS örnekleri oda sıcaklığında ve 18 saat içinde laboratuvarına ulaşmalıdır. Solunum yolu örnekleri, doku aspiratları ile biyopsi örnekleri 2 saat içinde oda sıcaklığında veya 24 saate kadar +4°C'de gönderilebilir. Serum 2 saat içinde oda sıcaklığında veya 48 saate kadar +4°C'de taşınabilir; laboratuvarına ulaşması 48 saatten uzun sürecek ise dondurulmalı ve kuru buz içinde gönderilmelidir.
- Örneklerin/izolatların gönderilmesinde *paketleme* ve *taşıma* kesinlikle biyolojik materyal taşıma kurallarına uygun olmalıdır (11,12) (ayrıca bkz. UMS GEN-OY-01 Enfeksiyöz Maddelerin Taşınması Rehberi).

4 Vebanın tanısında kullanılan teknikler

4.1. Ön hazırlık ve gerekler

- Klinik materyal mutlaka bir **biyolojik güvenlik kabini** içinde, normal laboratuvar protokolleri çerçevesinde işlenir; boyamalar için preparatlar hazırlanır ve rutin kültür besiyerlerine ekimler yapılır.

ÖNEMLİ NOT: Bir vakada, veba akla gelmeksizin örnekleri alınmış ve rutin klinik laboratuvarına gönderilmiş olabilir. Bir klinik laboratuvar kendisine "veba ön-tanısı" almadan gönderilmiş böyle örnekleri incelemeye almış olabilir. Laboratuvar, eğer kural olarak solunum yolu örneklerini ve invaziv yöntemlerle alınmış bütün klinik örnekleri bir biyolojik güvenlik kabininin içinde işleme alıyorsa (yayma hazırlanması, pasajların yapılması vb.) ve genel olarak asgari BGD2 gereklerini karşılıyor, standart güvenlik önlemlerini sistematik olarak uyguluyorsa, bu örneklerle çalışma bir sorun teşkil etmez. Ancak, kültürlerden ilk izolasyonları takiben *Y.pestis* şüphesi doğduğu andan itibaren izolatlar ve saklanmış klinik örnekler Referans laboratuvarına nakledilmelidir.

- Kültür ekimleri için besiyeri seti içinde mutlaka **MacConkey Agar** ve ** ikolata agar** plakları bulunmalıdır.
- Kan kültürleri de normal laboratuvar protokolleri çerçevesinde işlenir. Hastadan 30 dk aralıklarla 4 örnek alınmış olmalıdır. Eğer kan kültürü üreme sinyali verirse, yukarıda tarif edildiği gibi, preparatlar hazırlanır ve agar plaklara pasajları yapılır.
- Serum test gününe kadar derin dondurucuda saklanır.

4.2. Mikroskopi

- Preparatlar havada kurutulup ve saf metanol ile sabitlendikten sonra Gram veya Wright-Giemsa boyamalar yapılır. Mikroorganizmanın Gram reaksiyonunu ve morfolojik özelliklerini değerlendirebilmek için Gram boyama mutlaka yapılmalıdır.
- *Y.pestis* F1 kapsül antijenine özgül floresan konjugat ile DFA yapılabilir. NOT: DFA için örnekler en fazla 30 saate kadar buzdolabı şartlarında bekletilebilir; daha uzun beklemiş örneklerde yanlış negatif sonuç olasılığı yükselmektedir.

4.3. Kültür

- Normalde steril vücut bölgelerinden örneklerin kültürü için kanlı agar veya beyin-kalp infüzyon agarı gibi besiyerleri ve kontamine örnekler için MacConkey agar, sefsulodin-irgasan-novobiyosin agar (CIN) gibi besiyerleri kullanılabilir. Ancak pratik olarak MacConkey Agar ve çikolata agar plaklarını içeren bir besiyeri seti idealdir.
- Plaklar 28-35 C'de, CO  oranı hafif artırılmış atmosferde aerobik olarak birkaç gün inkübe edilirler. *Y.pestis*'in optimal üreme sıcaklığı 28 C'dir.

4.4. Seroloji

- Veba tanısında klasik olarak kullanılan serolojik teknik pasif hemaglutinasyon (PHA) testidir ve referans laboratuvarında yapılabilir.
- ELISA, lateks aglutinasyon ve solid faz radyoimmünoassay teknikleri de geliştirilmiştir.

5 Değerlendirme, yorum

- Boyalı mikroskopik incelemelerde Gram yaymalarında gram negatif küçük, narin, tek veya çiftler halinde çomaklar gözlenir. *Y.pestis* -uçlar koyu, merkezi daha açık renkli olmak üzere- bipolar boyanma özelliğindedir ve özellikle Wright-Giemsa boyanmada gözlenir. Rutin kan veya 'buffy-coat' yaymalarında gram negatif, bipolar boyanmış bakterilerin gözlenmesi *Y.pestis* olasılığı bakımından uyarıcı olmalıdır.
- *Y.pestis* bir *Enterobacteriaceae*  yesidir. Kültür plaklarında biraz nazlı  rerse de 24-48 saat içinde görünür koloniler meydana getirir. Koloniler küçük, gri-beyaz, düz, opak görünümlüdür ve bazen

“dövülmüş bakır” ya da “çekiçlenmiş metal” gibi görünür.

- Biyokimyasal testlerle kolayca tanımlanabilir ve eğer, ön tanı almaksızın laboratuvara gelmiş bir örneğin biyokimyasal özellikleri *Y.pestis*’i düşündürüyorsa izolatlar **hemen** Referans laboratuvara gönderilmelidir. Bu temel biyokimyasal özellikler şöyledir (9):
 - (c) Pozitif: katalaz, glikoz, trehaloz
 - (d) Negatif: oksidaz, laktoz, indol, sitrat, üre, hareket (25 ve 37°C’de)
- Kliniği uygun hastada; tek serum örneğinde *Y.pestis* F1 antijenlerine karşı özgül antikor titresinde PHA ile gösterilen 1/10 titrede pozitiflik, HI testi ile teyit edildiğinde “olası tanı” bulgusudur. 1-2 hafta ara ile alınan akut ve konvelasan serum örneklerinde *Y.pestis* F1 antijenlerine karşı özgül antikor titresinde PHA ile gösterilen ≥ 4 kat titre artışı HI testi ile teyit edildiğinde “kesin tanı” bulgusudur.

6 Olası sorunlar/kısıtlılıklar

- Boyamalar ile elde edilen bulgular sadece etkenin akla getirilmesine yardımcı olabilir; tanı koydurucu değildir. Direkt yaymaların DFA boyanması ile elde edilen pozitif sonuçlar da olası tanı bulgusudur.
- Kültürler için; otomatize sistemlerin çoğu *Y.pestis*’i tanımlayabilecek bir veritabanına sahip olmayabilir ve yanlış tanımlayabilirler. Bakteri görece yavaş ürettiği için rutin biyokimyasal testler de erken dönemde hatalı olarak negatif değerlendirilebilir.
- *Y. pestis* biyokimyasal özellikleri benzeyen diğer bakterilerle -*Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella* spp, H₂S-negatif *Salmonella* ve *Acinetobacter* türleri ile- karıştırılabilir.
- Seroloji erken dönemde hastalığın tanısında kullanışlı değildir.
- *Y.pestis*’in kesin tanımlanması için laboratuvarın en az BGD3 ve üzerinde imkanlara sahip olması gereklidir. Bütün çalışmalar BGD3 laboratuvarında yapılır.
- *Y.pestis* enfektif dozunun düşük olması ve yüksek mortalitesi nedeniyle ideal bir biyoterörizm etkenidir. Klinik örnekler direk referans laboratuvara gönderilir.

7 Referans Laboratuvar

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu,
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı
Ulusal Yüksek Riskli Patojenler Referans Laboratuvarı
(Bakteriyel Zoonozlar P3 Laboratuvarı)
Sağlık Mahallesi, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, F Blok, Zemin kat
06100 – Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0312 565 5435 / 5562; Faks: 0312 565 5455;
www.thsk.gov.tr

İlgili diğer UMS belgeleri

Bu prosedür belgesi (Vebanın Mikrobiyolojik Tanısı) aşağıda listelenen UMS belgeleriyle de ilgilidir ve bilgi için bu belgelere de bakılması önerilir:

UMS, GEN-ÖY-01 Enfeksiyöz maddelerin taşınması rehberi

Kaynaklar

- 1 WHO. Plaque manual. Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. 3rd ed. WHO. 1998
- 2 Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. Resmi Gazete; 02.04.2011 – 27893.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/04/20110402-3.htm> (son erişim tarihi: 06.01.2014)
- 3 Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı Ankara. 2004.
<http://www.shsm.gov.tr/public/documents/legislation/bhkp/asi/bhibs/BulHastBilSistStanSurvelabReh.pdf> (son erişim tarihi: 18.12.2013)
- 4 Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(1):35-66
- 5 Titball RW, Hill J, Lawton DG, Brown KA. *Yersinia pestis* and plague. *Biochem Soc Trans* 2003;31 (Pt 1):104-7
- 6 Rollins SE, Rollins SM, Ryan ET. *Yersinia pestis* and the plague. *Am J Clin Pathol* 2003;119(Suppl):78-85
- 7 Plaque (*Yersinia pestis*). Sentinel Level Clinical Laboratory Guidelines For Suspected Agents Of Bioterrorism and Emerging Infectious Diseases. American Society for Microbiology (ASM)
http://www.asm.org/images/PSAB/Plaque_July_23_2013.pdf (son erişim tarihi:12.12.2013)
- 8 Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, et al. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA* 2000;283:2281-2290
- 9 Sharp S. Plaque. Bioterrorism. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C, 2007, p.16.7.1
- 10 Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (ed). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th ed., Mosby, St. Louis, MO. 1998, p. 509-526.
- 11 WHO. Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances, 2013-2014. World Health Organisation. WHO/HSE/GCR/2012.12, 2012.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78075/1/WHO_HSE_GCR_2012.12_eng.pdf
- 12 Enfeksiyöz madde ile enfeksiyöz tanı ve klinik örneği taşıma yönetmeliği. Sağlık Bakanlığı, Ankara. Resmi Gazete 25.09.2010 – 27710.