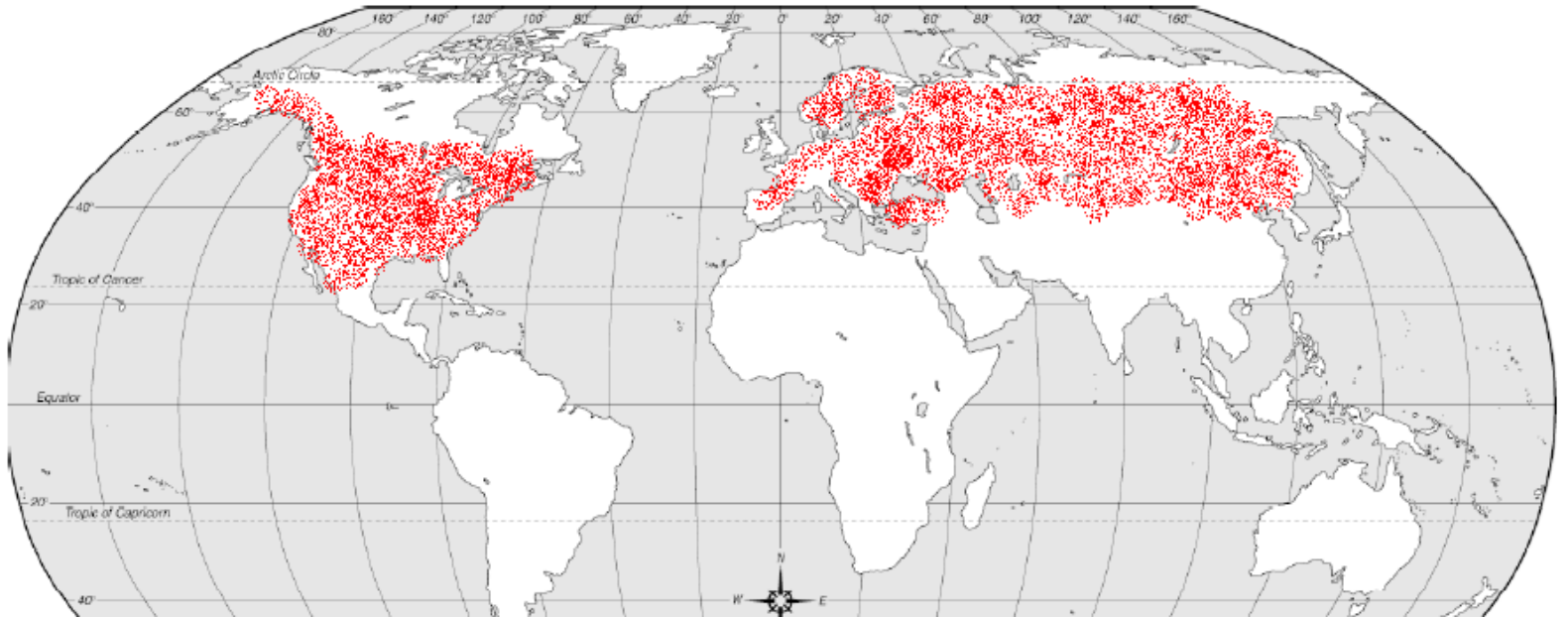


Tularemi: Tanı yöntemleri



Doç.Dr. Aynur Karadenizli
Kocaeli Üniversitesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Dünyada Tularemi



Francisella tularensis: Taksonomi

- *Bacterium tularensis*

Tulare kasabası, Kaliforniya,

Dr. Edward Francis, 1919

- 16SrRNA hibridizasyonu sonucunda;

- Sınıf: Proteobacteria-γ alt sınıfı

- Takım: Thiotrichales

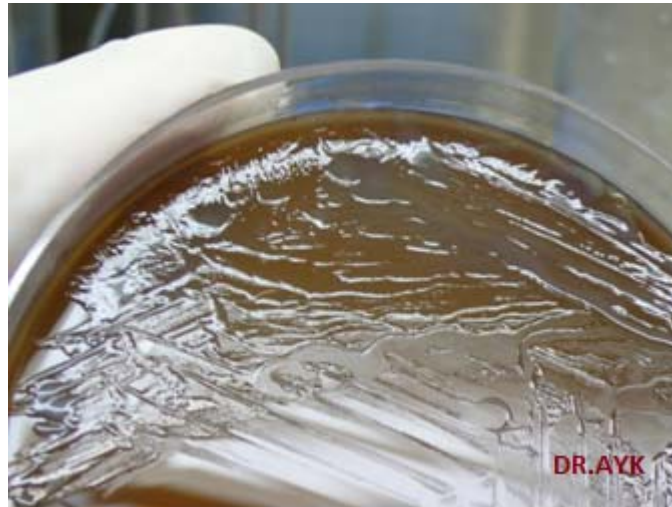
- Family: Francisellaceae

- Cins: Francisella

- Türler: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. novicida* (?)

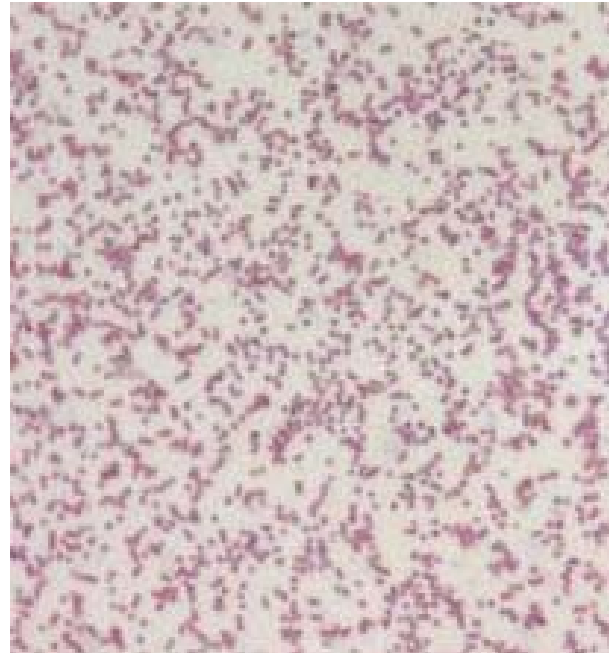
Francisella tularensis

- Küçük ($0,2-0,5 \times 0,7-1 \mu\text{m}$),
- Aerob, pleomorfik, hareketsiz
- Hücreiçi ve hücre dışında yerleşebilen gram negatif bir kokobasildir.



Tanı Yöntemleri: **Gram boyama**

- *Francisella tularensis* Gramla çok zayıf boyanır.
- Gram negatif kısa basiller ve kokoid formlar şeklinde görülür.



Tanı Yöntemleri: **Kültür**

- Bu amaçla sistein/sistin gibi sulfidril bileşikleri, glukoz ve ferrik pirofosfat yada IsoVitalex içeren besiyerleri kullanılır.
 - *Sistein-glukoz içeren kanlı agar (Francis besiyeri)*
 - *Sistein'li kalp agar (CHAB)+%9 ısıtılmış koyun kanı eklenmiş*
 - *Sisteinle zenginleştirilmiş çukulatamsı agar,*
 - *GC agar base II +%I hemoglobin - %I IsoVitaleX*
 - *Thioglycollate - glucose blood agar (TGBA)..*

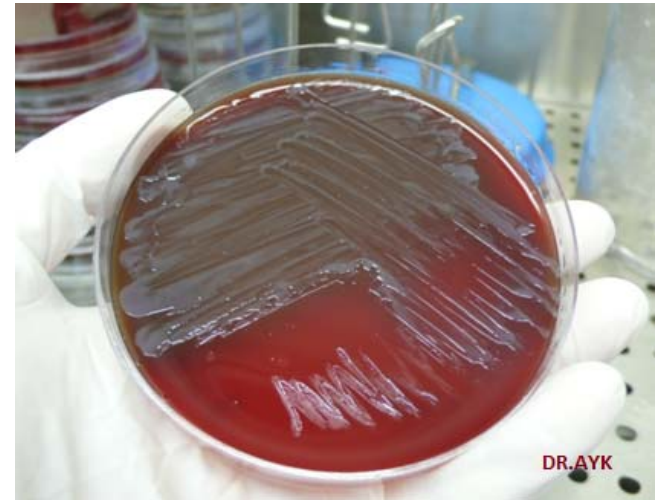
Francisella tularensis: Kültür



P3 Lab yada glove-box kullanımı



•Sisteinli kalp agar (CHAB)+%9 ısıtılmış koyun kanı



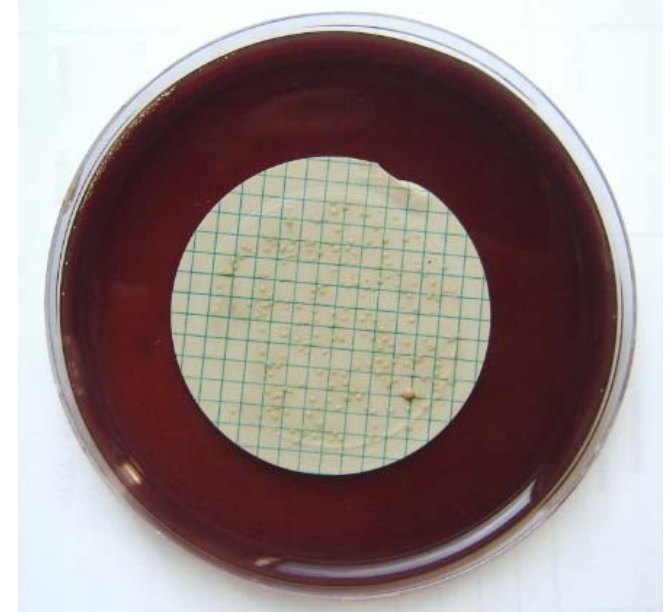
•Sistein-glukoz içeren kanlı agar (Francis besiyeri)

Francisella tularensis: Kültür

- Sık kullanılan örnekler;
 - Boğaz sürüntüsü (Orofaringeal form)
 - Lezyondan sürüntü, aspirat yada biyopsi
 - Çevresel örnekler
 - Su
 - Toprak
 - Çamur
 - Hayvan dışkıları ya da leşleri

Francisella tularensis: Kültür

- Su rnekleri 0,20µm çapında sellüloz asetat membranlardan filtre edilir.
- Membranlar antibiyotikli sistein kalp agara membran ekimi yapılır. 37°C, %5 CO₂, 4-10 gün inkube edilir.



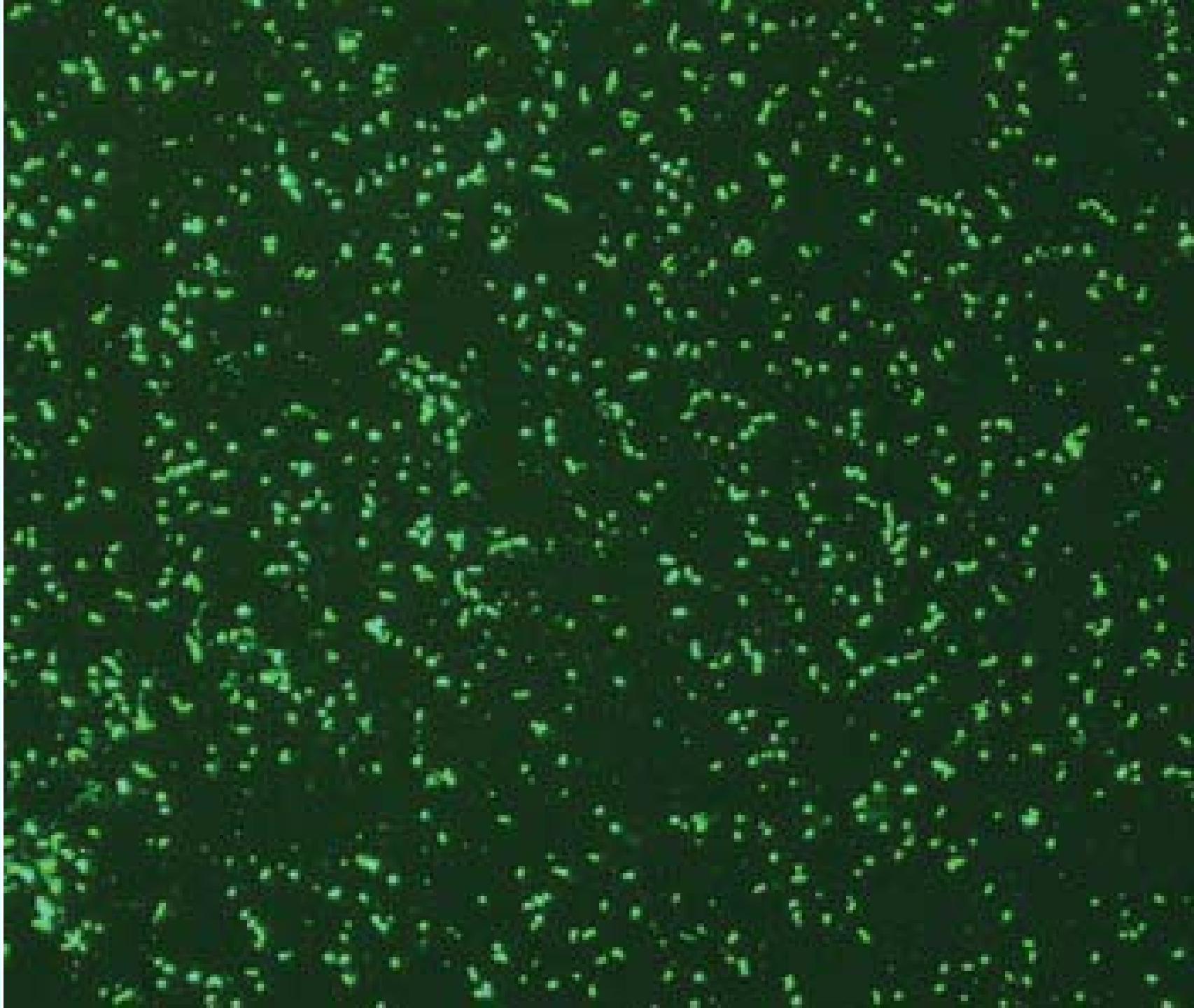
Tanı Yöntemleri:

Fare inokulasyonu

- Kontamine örneklerden *F. tularensis*'in izolasyonunda kullanışlı bir metoddur.
- Örnek SF ile homojenize edilir ve 0,1-0,5 ml alt abdomenden subkutan olarak uygulanır.
- 3-5 gün içinde hastalanır.
- KC ve dalak dokusundan yapılan kültürler ile bakteri izolasyonu sağlanır.

Tanı Yöntemleri: **Antijen saptanmasına yönelik testler**

- DFA (Direk floresan antikor testi)
FITC ile işaretli, tavşan poliklonal *F. tularensis* antikorları kullanılır.
- Örneklerden yada kültürden ince bir preparat hazırlanır. Kurutulur ve üzerini kaplayacak kadar konjugat eklenir.
 - DFA testi hızlı ve özgün bir testtir (duyarlılık sınırı $\sim 10^6$ hücre/ml).



Tanı Yöntemleri:

capture ELISA (cELISA)

- Solid bir faz üzerine monoklonal antikorlar kaplanır
- Antijen (*F. tularensis* LPS'i yada tüm hücre) ile bağlanır.
- Bağlı antijenin peroksidaz ile işaretli antikorun kullanılarak saptanması işlemidir.
- Bu işlem şüpheli kültürlerin ve hayvan dokularında etken varlığının araştırılmasında kullanılır.

- Grunow et al. 2000

TULAREMİ: Serolojik Tanı

- Tanıda en yaygın kullanılan yöntem mikroagglütinasyon yada tüp agglütinasyonudur. ELISA yöntemi de kullanılabilir.
- Antijen olarak *FopA*, LPS, dış membran karbohidrat fraksiyonu (OMP) ve ölü bakteri hücresi kullanılır.
- Dezavantajı antikorların genellikle hastalığın 2. haftasına kadar saptanamaması ve bazı bakterilerle çapraz reaksiyonlar göstermesidir.

TULAREMİ:

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- Duyarlı, özgün ve personel için güvenli bir yöntemdir.
- Son yıllarda Real-Time PCR teknikleri tercih edilmektedir.
- *F. tularensis*'e ait hedeflenen başlıca genler:
 - *Tul4*, *fopA* (Dış membran proteinlerini kodlar),
 - *ISFtu2*
 - *23kDa* gen (Makrofaj infeksiyonunda eksprese edilen bir proteini kodlar)

TULAREMİ:

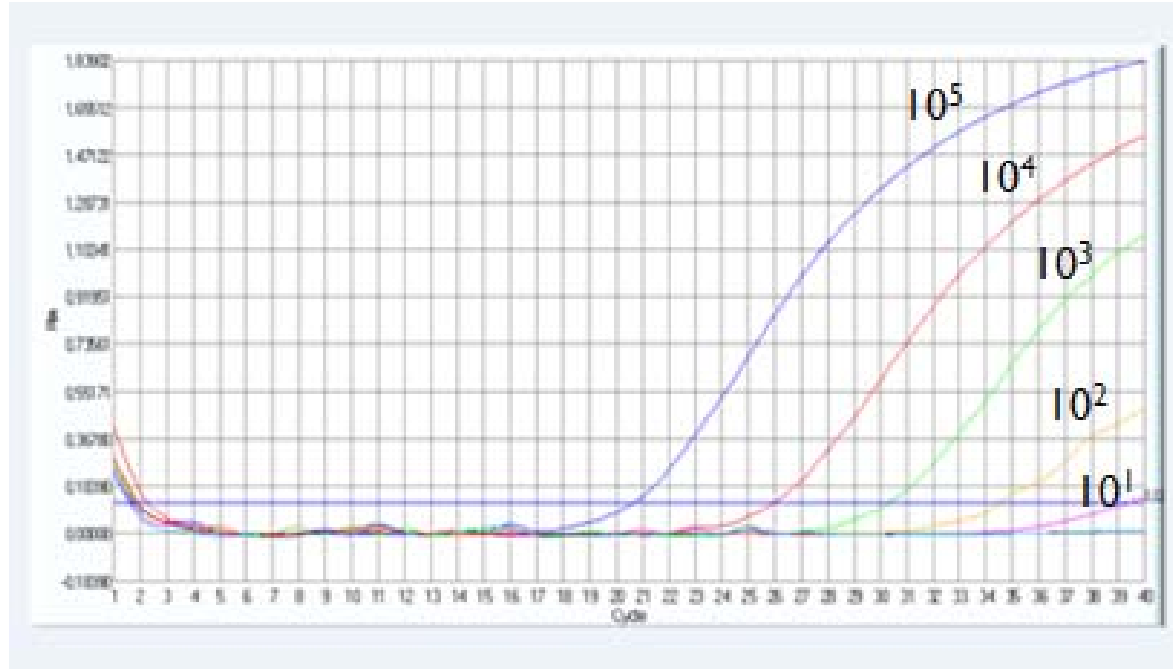
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- Üç farklı genomik lokusu (*ISFtu2*, *23kDa*, *tu/4*) hedefleyen multitarget TaqMan assay sayesinde bir adet *F. tularensis*'i dahi saptamak mümkündür.
- J Versage et al. 2003

TUBİTAK KAMAG (107G255) projesi: Kocaeli Üniversitesi ve RSHM



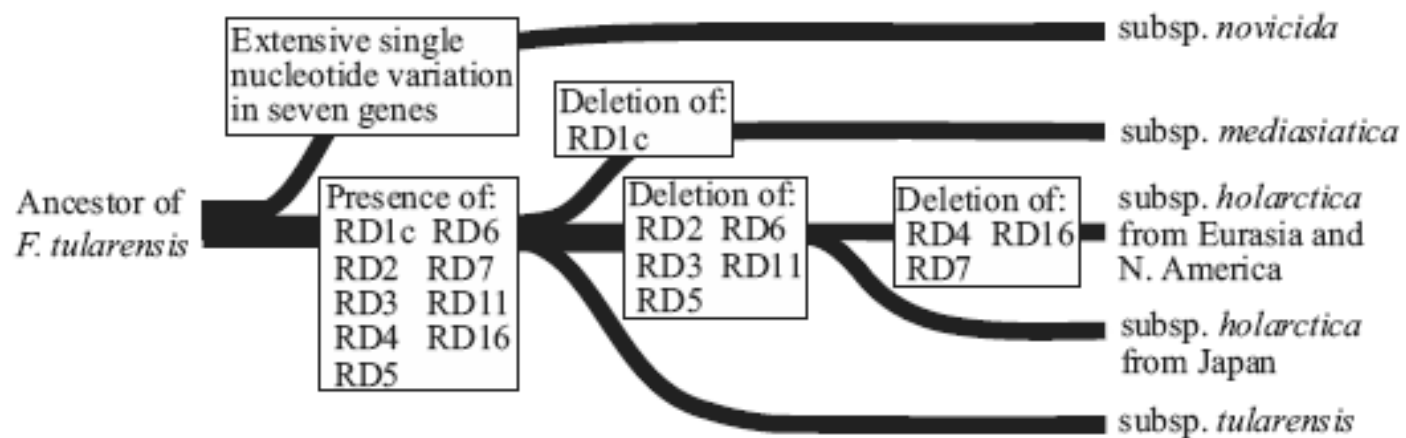
Kitin çalışma sonuçları



Kitin Deneme Sonuçları
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

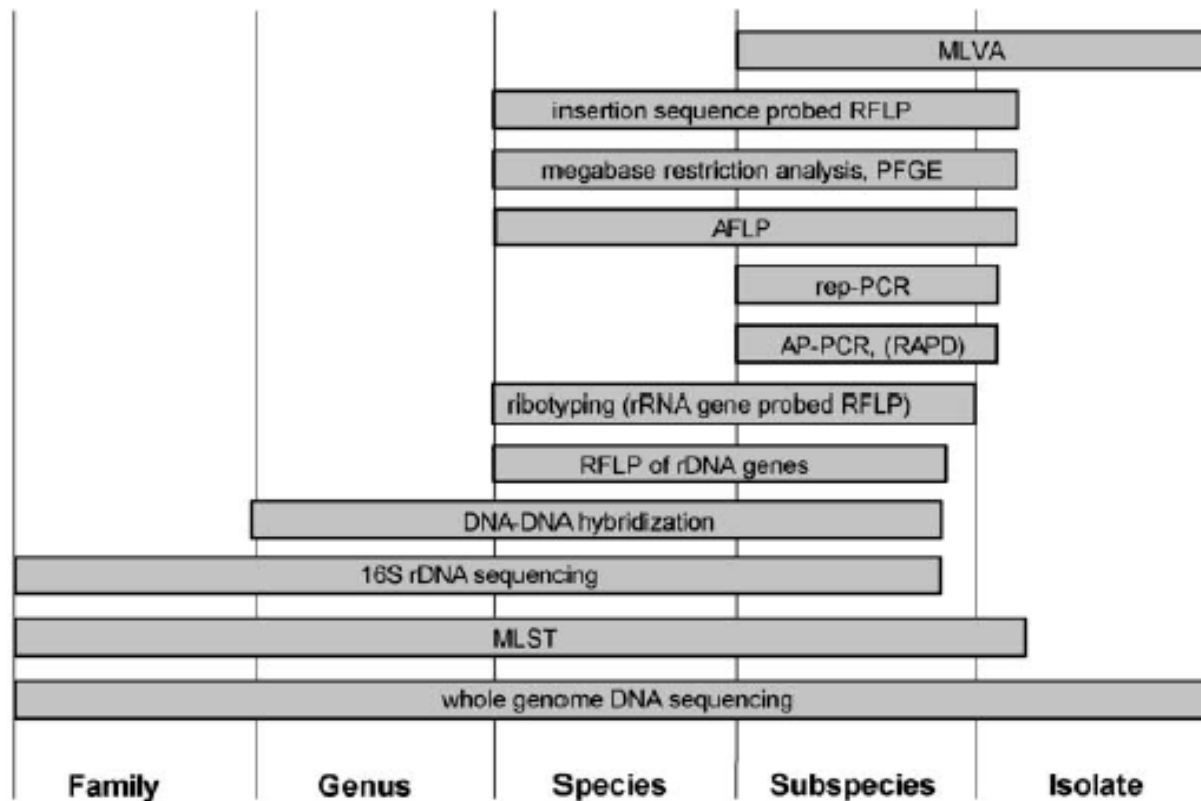
***F. tularensis* suşlarının tiplendirilmesi**

- Klinik özellikleri ve mortalite oranları farklı olması, biyoterror etkeni olma potansiyeli nedeniyle alttür ayırımı önemlidir.
- Alttür ayırımında kullanılan yöntemler
 - RNA helikazı kodlayan gen
 - İnsersiyon sekans (ISFtu2);
 - alttür *holarctica* 1248bp,
 - alttür *tularensis* 390bp
 - pdpD gen varlığı (alttür *tularensis*)



- Svensson et al. J Bacteriol 2005;187(11):3903-8

Suşların tanımlanmasında kullanılan yöntemler



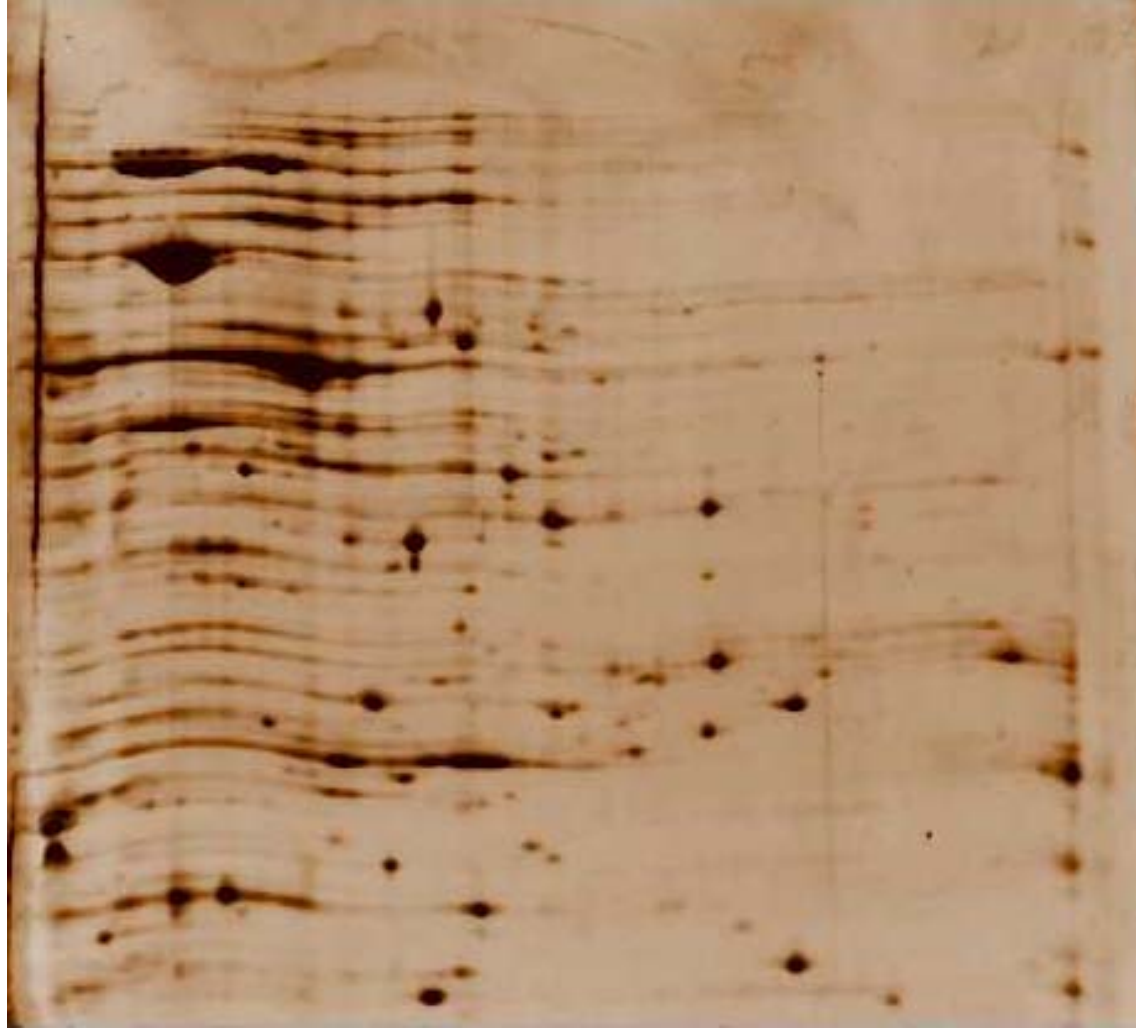
Multi locus variable number tandem repeats

- *F. tularensis* genomundaki 25-50 sayıda farklı tekrarlar arasındaki farklılığı araştırır.
- Bu lokusların PCR ile amplifikasyonu yapılır.
- Herbir VNTR lokusunda tüm izolatlardan elde edilen ampikon büyüklüğü ile ilgili skorlamalar yapılır.
- VNTR'lerdeki allelik farklılıklara göre izolatlar genetik olarak gruplandırılır (dendogram).

F. tularensis: Proteomiks çalışmaları

- Proteomik analiz sayesinde bakterinin virulansı ve patojenisitesi anlamak amaçlanmaktadır.
- Bu yöntemle membran proteinlerinin düşük yoğunlukta bulunması tam anlaşılamamıştır.
- Membran proteinlerinin konak parazit ilişkisinde, virulans ve invazyonda önemli rolleri olduğu bilinmektedir.

F. tularensis: Proteomiks alışmaları



PH: 5-8, *F. tularensis* alttür *holarctica*, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi Araştırma laboratuvarı



Boncuk Karadenizli, 7 yaş