

Basıldığında KONTROLSUZ KOPYA niteliğindedir.



# 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 bildirim 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. anthracis*'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](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 laboratuvarında 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 kuşkulandırmamışken veya başka ön tanılarla) 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya <%1 perasetik asit)

### Diğer gereç, donanım

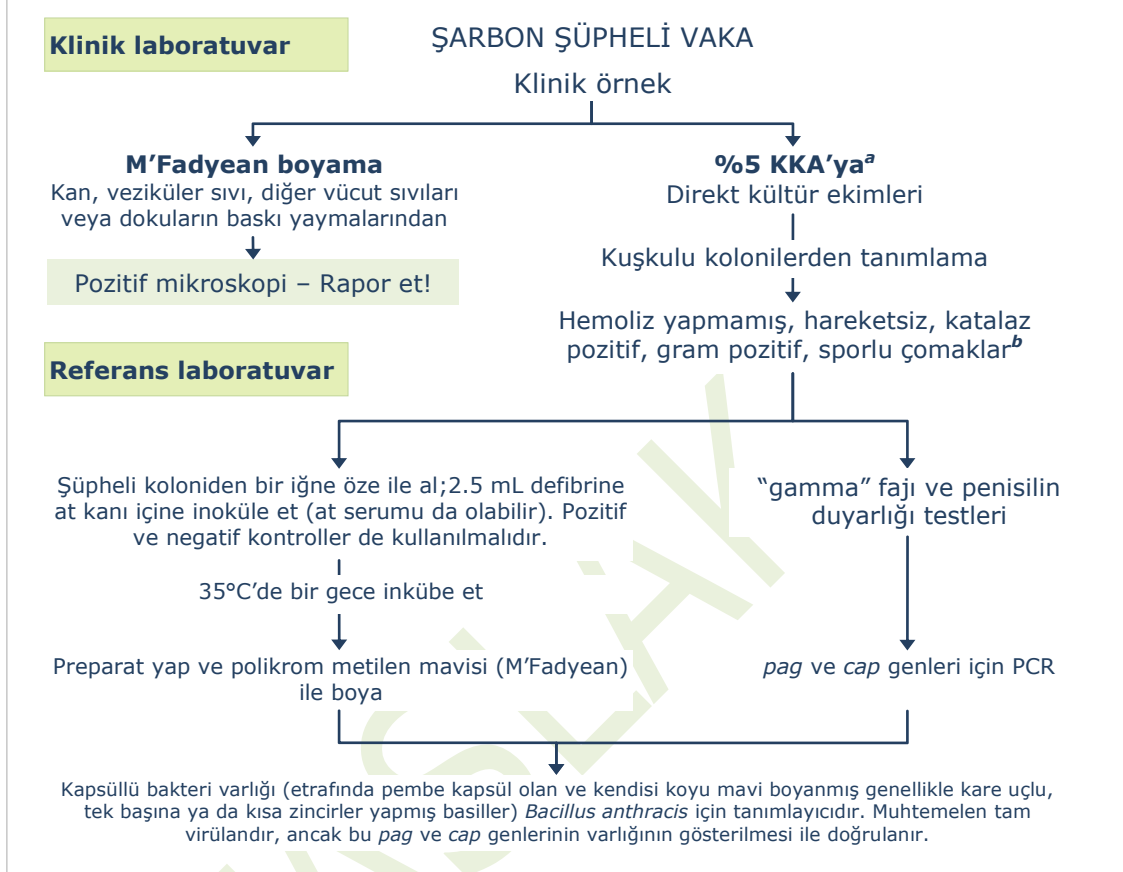
- Sınıf-IIA BGK, sertifikalı
- Mikroskop, binoküler (rutin) – 10× (düşük), 40× (yüksek kuru), 100× (immersiyon) objektifleri ve 10× oküleri olan tercih edilir.  
NOT: 5× oküler daha az büyütme sağlar ve inceleme duyarlılığını düşürür; bu nedenle 10× oküler kullanılması önerilmektedir (14).
- Önceden temizlenmiş lamlar (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.

<sup>a</sup> Deri lezyonu ve diğer doku örnekleri KKA, MacConkey ve TSB'ye; balgam bunlara ilave olarak çikolata agara; dışkı KKA, MacConkey ve PEA agara ekilmelidir.

<sup>b</sup> 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.

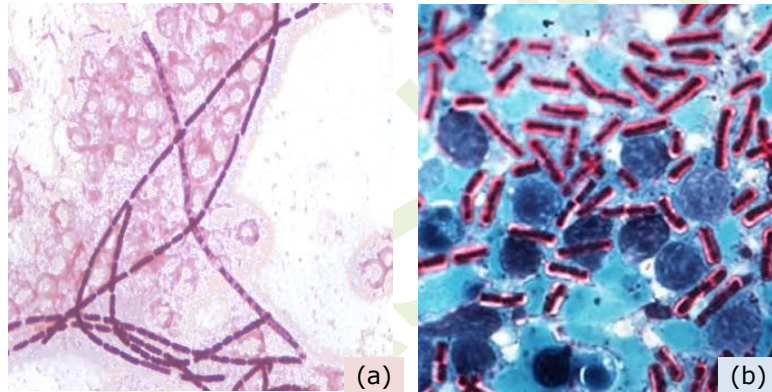


**ÖNEMLİ:** Şarbon şüpheli örneklerden yapılmış preparatlar boyanırken yıkama aşamasında lam içi 10.000 ppm sodyum hipoklorit solüsyonu içeren bir kabın üzerinde tutularak yıkanır.

**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 mikroskofta 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

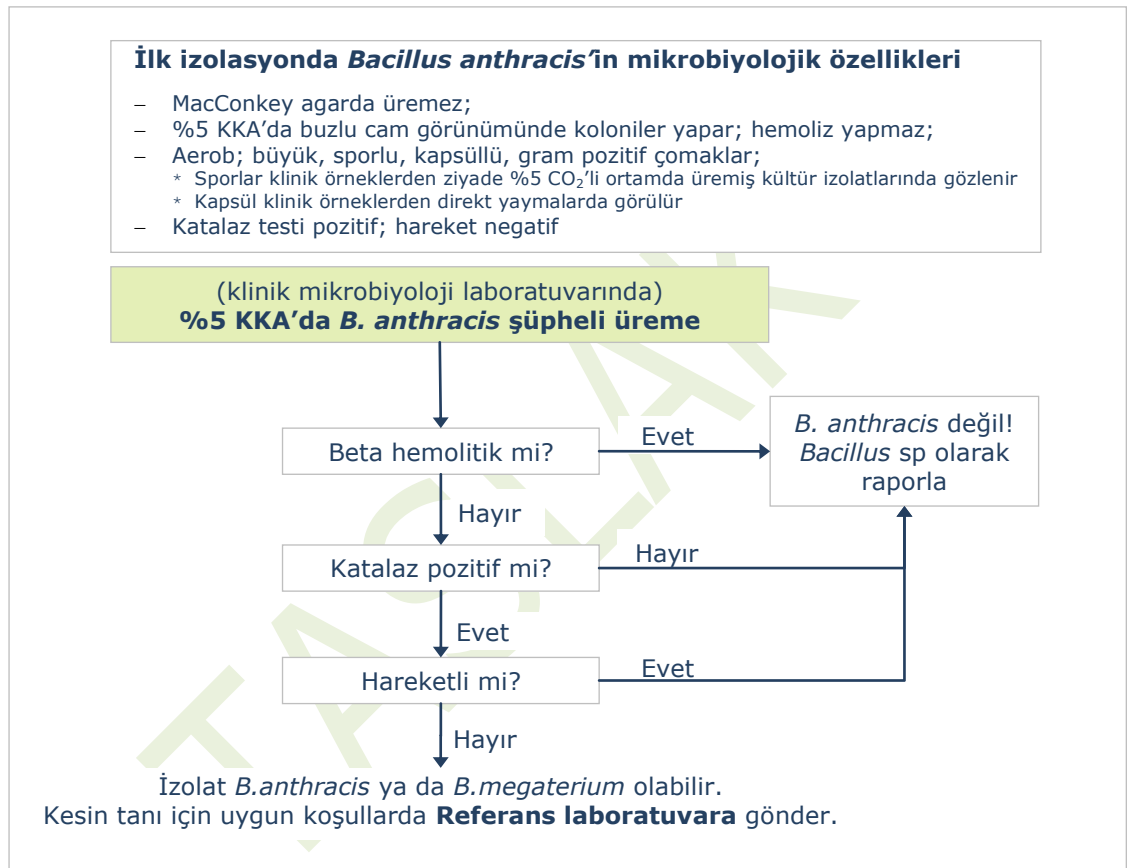
- Gram boyamada, büyük, 1-1.5 µm x 3-5 µm boyutlarında gram pozitif basiller görülür. Vejetatif hücrede şişkinlik yapmamış (hücrenin şeklini genişletmemiş) santral veya subterminal yerleşimli oval sporları vardır (bkz. Şekil 2).
- Ancak, klinik örneklerin direkt boyamalarında, eğer atmosferik seviyelerde CO<sub>2</sub>'e maruz kalmazlarsa, spor yapıları görülmez (vücuttaki CO<sub>2</sub> 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 laboratuvarında 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 kullanılabilmesi 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 gözlendi" 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* üredi" 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](http://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](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](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*. 2<sup>nd</sup> 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*, 10<sup>th</sup> 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](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*. 10<sup>th</sup> 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 Klietmann 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&Sped=256&Plugin=WMP&Error=> (son erişim tarihi: 16.02.2014)