

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SEPSİS ETKENLERİNİN SAPTANMASINDA, KÜLTÜR YÖNTEMİNE GÖRE  
REAL –TİME PZR ( POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON)’NİN TANI DEĞERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DR. ÖZLEM ÖĞÜÇ ŞANLI

UZMANLIK TEZİ

KONYA 2013



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SEPSİS ETKENLERİNİN SAPTANMASINDA, KÜLTÜR YÖNTEMİNE GÖRE  
REAL-TİME PZR ( POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON)'NİN TANI DEĞERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DR. ÖZLEM ÖĞÜÇ ŞANLI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF. DR. MAHMUT BAYKAN

KONYA 2013

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve tez danışmanım Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, tez çalışmamda ve her konuda yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız; Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Metin DOĞAN'a, meslek hayatıma katkılarından dolayı; Prof. Dr. İnci TUNCER'e, tezimin istatistiksel verilerinin oluşturulmasında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA ve Yrd. Doç. Dr. Zeliha FAZLIOĞULLARI'na, Nükleer Tıp rotasyonum sırasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Güngör TAŞTEKİN ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa SERDENGEÇTİ'ye, tezimi 121518004 no'lu proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline, hayatıma vesile ve şu andaki bilgi ve tecrübemin temel taşı olan, benden desteğini, şefkatini ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli annem Hatice ÖĞÜÇ ve babam Fikri ÖĞÜÇ'e, asistanlığım süresince yanımda olan kıymetli eşim Mehmet Ali ŞANLI ve çocuklarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özlem ÖĞÜÇ ŞANLI

## ÖZET

### SEPSİS ETKENLERİNİN SAPTANMASINDA, KÜLTÜR YÖNTEMİNE GÖRE REAL –TIME PZR( POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON)’NİN TANI

#### DEĞERİNİN ARAŞTIRILMASI

#### ÖZLEM ÖGÜÇ ŞANLI

#### UZMANLIK TEZİ

#### KONYA-2013

**Amaç:** Sepsis etkenlerinin saptanmasında, kültür yöntemine göre Real-time PZR (Polimeraz zincir reaksiyon)’nin tanı değerinin kıyaslanarak araştırılmasıdır.

**Yönetim:** Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na sepsis ön tanısıyla takip edilen hastaların gönderilen kan örnekleri ile prospektif olarak yapıldı. Kasım 2012-Mart 2013 tarihleri arasında kan kültürü istenen hastalardan eş zamanlı olarak sepsis paneli çalışılarak sonuçları değerlendirildi. Belirtilen süre içerisinde çalışmaya 100 hastaya ait örnek alındı. Kan kültürü BacT-Alert (Biomerieux) tam otomatik kan kültürü sistemine alındı. Bakterilerin tanımlanmasında Vitek2 (Biomerieux) tam otomatik bakteri tanımlama sistemi kullanıldı. Moleküler olarak bakteriyel DNA varlığı multiplex real-time PZR (LightCyler SeptiFast, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile hazır bir kit kullanarak araştırıldı.

**Bulgular:** Sonuçta çalışmamızda Real-time PZR yönteminin kan kültürüne göre duyarlılığı (sensivite) %44,7, özgüllüğü (spesifite) %77, pozitif prediktif değeri (PPV) %53,1 negatif prediktif değeri (NPV) %75 olarak tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Moleküler testler hızlı ve duyarlı sonuç alınabilen testler olmasına rağmen, antimikrobiyal direnç verilerinin sağlanamaması, PZR analizi kapsamında olan hedef patojen sayısının sınırlılığına bağlı olarak ve maliyetinin yüksek olmasından dolayı yöntemin kullanılabilirliği sınırlanmaktadır. Sonuç olarak, konvansiyonel ve moleküler yöntemler beraber uygulandığında, hızlı ve uygun antimikrobiyal tedavi sağlanarak, antibiyotik direncinde azalma ve daha iyi klinik yanıt elde edilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Sepsis, kan kültürü, real-time PCR, tanı

## ABSTRACT

### RESEARCH ON DIAGNOSTIC VALUE OF REAL-TIME PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) IN COMPARISON WITH CULTURE METHOD TO DETECT AGENTS FOR SEPSIS ÖZLEM ÖGÜÇ ŞANLI

KONYA-2013

**Objective:** To search diagnostic value of Real-time PCR (Polymerase chain reaction) in comparison with culture method to detect agents for sepsis.

**Method:** The study was carried out with samples which have been sent to Microbiology Laboratory of Necmettin Erbakan University, Meram Faculty of Medicine prospectively. Sepsis panel was studied from the patients whom blood culture has been ordered between November, 2012 and March, 2013 simultaneously and results were assessed. Samples belonging to 100 patients were included into the study within specified period. Blood culture was taken into BacT-Alert (Biomerieux) full automated blood culture system. Vitek2 (biomerieux) full automated bacteria identification system was used to identify the bacteria. Presence of bacterial DNA molecularly was analyzed by using a ready-to-use kit with multiplex real-time PCR (LightCycler SeptiFast, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

**Findings:** In our study, sensitivity of Real-time PCR method was detected as 44,7%, specificity was detected as 77%, positive predictive value (PPV) was detected as 53.1%, negative predictive value (NPV) was detected as 75% when compared with blood culture.

**Result:** Although molecular tests are rapid and sensitive results may be obtained by these, they would not replace with conventional blood culture due to lack of antimicrobial resistance data, limitation of number of target pathogens and high costs. Therefore, when combined with blood culture, molecular analysis will provide an urgent and appropriate antimicrobial treatment, decrease antibiotic resistance and cause better patient outcomes.

**Key Words:** Sepsis, blood culture, real-time PCR, diagnosis

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLO DİZİNİ.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	x
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1 Tanımlar.....	3
2.2 Epidemiyoloji.....	6
2.3 Etyoloji.....	6
2.4 Sepsis Patogenezi.....	9
2.4.1 Konağa ait faktörler ve infeksiyonun giriş kapısı .....	9
2.4.2 Anti-enflamatuar yanıt.....	12
2.5 Laboratuvar Tanısı.....	13
2.6 Tedavi.....	23
2.6.1 Antimikrobial tedavi.....	23
2.6.2 Hemodinamik destek tedavi.....	26
2.6.3 Solunumsal destek tedavi.....	26
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1 Kan Kültürü.....	27
3.2 Real-time PCR.....	33
3.3 İstatiksel analiz .....	40

<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>47</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>54</b>
<b>7.KAYNAKLAR.....</b>	<b>57</b>





## TABLolar

<b>Tablo 2.1:</b> Sepsiste sık rastlanılan etkenler.....	8
<b>Tablo 2.2:</b> Sepsis oluşumunda predispoze faktörler.....	9
<b>Tablo 2.3:</b> Sepsis patogenezinde rol oynayan yapılar.....	11
<b>Tablo 2.4:</b> Sepsis patogenezindeki mediatörler.....	12
<b>Tablo 2.5:</b> Sepsiste inflamatuvar medyatörler.....	13
<b>Tablo 2.6:</b> İnfeksiyon odaklarına göre önerilen antibiyotik tedavi.....	26
<b>Tablo 3.1</b> Septifast tanı paneli.....	35
<b>Tablo 4.1:</b> Çalışmaya alınan örneklerin kliniklere göre dağılımı.....	41
<b>Tablo 4.2:</b> Kan kültüründe saptanan mikroorganizmaların dağılımı.....	42
<b>Tablo 4.3:</b> Moleküler yöntemle saptanan mikroorganizmaların dağılımı.....	43
<b>Tablo 4.4:</b> Kan kültürü ve septifast ile aynı bulunan sonuçlar.....	44
<b>Tablo 4.5:</b> PZR ve kan kültürü analizleri ile patojen tespitinin karşılaştırılması.....	45
<b>Tablo 4.6:</b> PZR ve kan kültürü analizleri ile tespit edilen patojenler.....	45
<b>Tablo 4.7:</b> Kültür ve PZR da farklı bulunan sonuçlar.....	46
<b>Tablo 5.1:</b> Çeşitli çalışmalardan elde edilen PZR ve Kan kültürü sonuçları.....	54

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1: PZR basamakları.....	21
Şekil 3.1: Escherichia coli' nin Tm derecesi ve erime eğrisi .....	37
Şekil 3.2: Candida parapsilosis'in Tm derecesi ve erime eğrisi.....	37
Şekil 3.3: Koagülaz negatif stafilokok'un Tm derecesi ve erime eğrisi.....	38
Şekil 3.4: Septifast sonuç raporu.....	39
Şekil 4.5: Kan kültürü ve PZR'da üreyen mikroorganizmalar ve yüzdeleri.....	44

## **KISALTMALAR VE SİMGELER**

**ACCP:** American College of Chest Physicians

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid

**KNS:** Koagülaz Negatif Stafilokok

**MODS:** Multiple Organ Disfonksiyon Sendromu

**PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**SCCM:** Society of Critical Care Medicine

**SIRS:** Systemic Inflammatory Response Syndrome

**YBÜ:** Yoğun Bakım Ünitesi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis, enfeksiyona karşı gelişen sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde tıbbi teknoloji ve antimikrobiyal tedavideki gelişmelere rağmen özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) sepsis, hayatı tehdit edici önemli bir problem olmaya devam etmektedir.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ölüm nedenleri arasında onüçüncü sırada olup YBÜ'nde ise ikinci sıradadır. Ülkemizde de hastanede yatan hastalarda özellikle YBÜ'nde, sepsis önemli bir enfeksiyon problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. YBÜ'nde yatan hastaların önemli bir kısmı sepsis nedeniyle kaybedilmektedir. Yaşayan hastalarda ise yaşam kalitesinde azalma oluşmaktadır (Balk 2000). Toplumda ileri yaş grubunun artması, kronik hastalığı olanların yaşam sürelerinin uzaması, immüno-supresif ilaçların yaygın kullanılması, teşhis veya tedavi amacıyla invaziv girişimlerdeki artış, sepsis görülme sıklığını arttıran faktörlerdendir (Doğanay 1998).

Sepsise neden olan mikroorganizmaların spektrumu oldukça geniştir. *Staphylococcus aureus*, Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *Escherichia coli* ve diğer enterobacteriaceae ailesi üyeleri, *Pseudomonas aureginosa* ve *Candida albicans* en sık enfeksiyon etkenleridir.

Sepsislerde primer enfeksiyon odağını sıklıkla üriner sistem, genital sistem, solunum sistemi, deri ve yumuşak doku, karın ve damar içi kateterler oluşturur. Hastane dışında gelişen sepsislerde en sık giriş kapısı solunum sistemi ve üriner sistem iken, nazokomiyal sepsislerde damar içi kateter ve üriner sonda işlemleri ilk sıralarda gelmektedir. Yoğun bakım birimlerinde ise nazokomiyal pnömoniler primer enfeksiyon odağı olarak ön plana çıkmaktadır (Pittet 1997).

Bu nedenle sepsisin erken tanısı ve uygun tedavi edilmesi klinik açıdan önemlidir. Kan kültürleri şüpheli enfeksiyon vakalarında mikrobiyal etyolojiyi tanımladığı gibi tedavinin yönlendirilmesinde de rol oynamaktadır (Mylotte ve Tayara 2000, Tabriz 2004).

Ancak dolaşım sistemi enfeksiyonlarının yorumlanması ve tedavisinde bazen güçlüklerle karşılaşmaktadır. Deride bulunan mikroorganizmaların yanlış yorumlanmalarından sakınmak için kan alma yöntemi önemlidir. Yalancı pozitif kan kültürleri klinik olarak yorumlamada hatalara yol açmakta, uygunsuz antibiyotik

kullanımına, ilave laboratuvar testlerine, uzun süreli hastanede kalma ve maliyet artışına sebep olmaktadır (Trautner 2002).

Sepsiste patojenlerin hızlı tespiti ve uygun antibiyotik tedavisinin başlanması mortalite hızını etkilemektedir. Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile etkenler 7-15 saatte identifiye edilirken, bakteriyel kültür de 24-72 saatte sonuç alınmaktadır (Wallet 2010).

PZR'da kontaminasyon daha düşük orandadır ve kültürden bağımsız olarak etkenlerin tespitine izin vermektedir. Öte yandan, moleküler testler antibiyotik kullanımına bağlı veya mikroorganizmanın canlılığını etkileyen bir durum olduğunda bundan etkilenmeyip mikrobiyal DNA varlığını tespit ederken, geleneksel kültür yöntemleri olumsuz etkilenir ve mikroorganizmayı saptama şansı azalmaktadır ( Lucignano 2011).

Bu çalışmadaki amacımız, hastanemizde yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan sepsis şüpheli hastaların kan örneklerinde etken mikroorganizmaları kültür yöntemi ve Real-time PZR yöntemiyle belirlemek ve sepsis oranlarını ortaya koymaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Sepsis, birçok sistemi etkileyen, hemodinamik değişikliklere yol açan; şok, çoklu organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar gidebilen ölümcül bir infeksiyon hastalığıdır. Hastaların hastaneye yatışlarından 48–72 saat sonra ortaya çıkan sepsis klinik tablosu ise nozokomiyal sepsis olarak tanımlanır. Sepsis kliniği; hafif sepsis bulgularından, septik şok, multiorgan yetmezliği ve ölüme kadar giden geniş bir klinik tabloyu kapsamaktadır ( Doğanay 2002).

Sepsis, infeksiyona sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanır. Geçmiş yıllarda sepsis ve ilgili klinik tabloların tanımlanmasında bakteremi, septisemi, sepsis, sepsis sendromu ve septik şok gibi farklı terimler kullanılmıştır. Bu hastalığın tanımında görüş birliğinin olmaması, sepsis ile ilgili araştırmalarda; sepsis insidansı, prevalansı ve tedavi sonuçlarının karşılaştırılmasında önemli farklılıklar doğurmuştur ( Balk 2000, Matot ve Sprung 2001). American College of Chest Physicians (ACCP) ve The Society of Critical Care Medicine (SCCM) 1991 yılında sepsisle ilgili tanımları güncellemişler ve bu tanımlar 1992 yılında yayınlanmıştır ( Bone 1992).

### 2.1. Tanımlar (Bone 1992)

#### İnfeksiyon

Mikroorganizmaların, normalde steril konak dokularında bulunması veya invazyonu sonucu gelişen inflamatuvar yanıttır.

#### Bakteriyemi

Canlı bakterilerin dolaşımında bulunmasıdır. Bakteremi tanısı kültür pozitifliği ile konur.

#### Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS)

Aşağıdaki durumlardan iki veya daha fazlasının bulunmasıdır:

1. Vücut ısısının  $> 38^{\circ}\text{C}$  veya  $< 36^{\circ}\text{C}$  olması,
2. Kalp atım hızının  $> 90/\text{dakika}$  olması,
3. Solunum hızının  $> 20/\text{dakika}$  veya  $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$  olması,
4. Lökosit sayısının  $> 12000/\text{mm}^3$  veya  $< 4000/\text{mm}^3$  veya periferik

yaymada % 10'un üzerinde band formunun bulunmasıdır.

## **Sepsis**

Sepsis, sistemik inflamatuvar yanıt ile infeksiyonun bir arada görülmesidir. İnfeksiyona bağlı SIRS bulgularından iki veya daha fazlasının bulunmasıdır.

## **Ağır sepsis**

Sepsis ile birlikte organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun bulunmasıdır. Hipoperfüzyon ve perfüzyon bozukluğunda, laktik asidoz, oligüri veya mental durumunda akut değişiklik bulunabilir.

## **Septik şok**

Sepsiste yeterli sıvı tedavisine rağmen, hipotansiyon ile birlikte perfüzyon bozukluğu belirtilerinin (laktik asidoz, oligüri, akut mental değişiklik) devam etmesi durumudur.

## **Multiple organ disfonksiyon sendromu (MODS)**

Akut hastalık tablosu içinde olan hastada organ fonksiyon değişikliklerinin bulunmasıdır. Bu klinik tabloda tedavisiz homeostaz sağlanamaz.

ACCP, SCCM, "European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)", "American Thoracic Society (ATS)" ve "Surgical Infection Society (SIS)"'in 2001 yılında yaptıkları ortak toplantıda sepsis ile ilgili tanımlar yeniden gözden geçirilmiştir. Sepsis tanı kriterleri oluturulmuştur (Levy 2001).

## **2001 ACCP/SCCM Konsensus Sepsis Tanı Ölçütleri;**

### **Gösterilmiş veya şüphelenilen infeksiyon ve aşağıdakilerden bazıları:**

Genel parametreler

- Ateş (Vücut sıcaklığı > 38.3°C)
- Hipotermi (Vücut sıcaklığı < 36°C)
- Kalp atım hızı > 90/dakika veya yaş için normal değerden > 2 SD
- Takipne > 30/dakika
- Mental durum değişikliği

- Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte >20 mL/kg)
- Hiperglisemi (diabetin olmadığı durumlarda plazma glukozu >110mg/dL veya 7,7 mM/L)

### **İnflamatuvar parametreler**

- Lökositoz (Beyaz küre sayısının > 12.000/ $\mu$ L)
- Lökopeni (Beyaz küre sayısının < 4.000/ $\mu$ L)
- İmmatür formun %10'dan fazla olduğu normal beyaz küre sayısı
- Plazma C reaktif proteinin normal değerden > 2 SD fazla olması
- Plazma prokalsitonin değerinin normal değerden >2 SD

### **Hemodinamik parametreler**

- Arteriyel hipotansiyon (sistolik kan basıncının < 90 mmHg, ortalama arteriyel basıncın < 70 veya sistolik kan basıncının yetişkinlerde > 40 mmHg düşmesi veya yaşa göre normal değerden < 2 SD olması)
- Miks venöz oksijen satürasyonu > %70
- Kardiyak indeks > 3.51 dakika/m<sup>2</sup>

### **Organ disfonksiyon parametreleri**

- Arteriyel hipoksemi (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 300)
- Akut oligüri (en az iki saat idrar çıkışı < 0.5mL/kg/saat veya 45mM/L)
- Kreatininde > 0,5 mg/dL artış
- Koagülasyon bozuklukları (internasyonal normalizasyon oranı (INR) > 1,5 veya aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTZ) > 60 saniye)
- İleus (barsak seslerinin olmaması)
- Trombositopeni (trombosit sayısı < 100.000/ $\mu$ L)
- Hiperbilirubinemi

### **Doku perfüzyon parametreleri**

- Hiperlaktatemi (> 3 mmol/L)
- Kapiller doluşta azalma veya deride renk değişikliği

**SD:** Standart deviasyon



## 2.2. EPİDEMİYOLOJİ

Günümüzde tıbbi teknoloji ve antimikrobiyal tedavideki gelişmelere rağmen özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) sepsis, hayatı tehdit edici önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Sepsis ABD’nde tüm ölüm nedenleri arasında 13. sırada yer alırken YBÜ’nde yatan hastalar için ikinci en sık ölüm nedenidir.

Ülkemizde de hastanede yatan hastalarda özellikle YBÜ’nde, sepsis önemli bir infeksiyon problemi olarak karşımıza çıkmakta ve hastaların önemli bir kısmı sepsis nedeniyle kaybedilmektedir. Yaşayan hastalarda ise yaşam kalitesinde düşme görülmektedir (Sevim 2011).

Vincent ve arkadaşları (2006) yaptıkları bir çalışmada Avrupa YBÜ’lerindeki sepsis oranını %37 olarak saptamışlar ve bu hastaların %56’sının dahili YBÜ’lerindeki hastalar olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde 1983-1989 yılları arasındaki yapılan, sadece Gram negatif bakteriyemilerin değerlendirildiği bir çalışmada insidansı 4.2/1000 ve mortalitesi % 45 olarak bildirilmiştir (Uzun 1992).

Ülkemizde 2010 yılında yapılan bir çalışmada bir yıllık sürede YBÜ’lerine kabul edilen 470 hastanın 81’inde (%17.2) hastane kaynaklı sepsis saptanmış olup mortalite oranı %63 (51/81) olarak hesaplanmıştır (Sevim 2011).

## 2.3. ETYOLOJİ

Sepsisli hastalarda antimikrobiyal tedavi seçiminde olası infeksiyon odağı ve bu odakta en sık infeksiyona neden olabilecek mikroorganizmaların bilinmesi gerekmektedir. Sepsiste akciğer infeksiyonları en sık karşılaşılan primer infeksiyon odağıdır. Bunu sırasıyla primer kan dolaşım infeksiyonları, intraabdominal ve üriner sistem infeksiyonları izlemektedir. Vakaların %10-30’unda primer odak belirlenmemektedir. İnfeksiyonun kesin kanıtı olarak kabul edilen kan kültür pozitifliği ise olguların ancak %30-50’sinde saptanmaktadır (Köksal 2005).

Sepsise neden olan mikroorganizmalar, sepsisin hastane içi veya hastane dışında gelişmesine göre değişmektedir. Alberti ve ark ’nın ( 2002) yaptığı bir çalışmada toplum kaynaklı sepsiste Gram pozitif koklar en sık etken olarak tespit edilmiştir. Martin ve arkadaşları (2003) hastane ve YBÜ’den kaynaklı sepsiste en sık etken Gram negatif bakterileri saptamışlardır.

1979-1987 yılları arasında sepsiste Gram negatif bakteriler en sık etkenler iken(Sümerkan 1998), 2000 yılında Gram pozitif bakterilerin daha sık olarak (%52,1) etken olduğu görülmektedir (Eşel 2003).

Fungal mikroorganizmaların sıklığında ise 2000 yılına gelindiğinde %207 oranında bir artış olmuştur (Akalin 2001).

Gram-negatif bakteriler içinde en sık karşılaşılan etkenler *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Gram-pozitif mikroorganizmalara bağlı kan dolaşımı infeksiyonlarının yarısından S.aureus ve koagülaz-negatif stafilokoklar sorumludur, bunu enterekoklar ve pnömokoklar izlemektedir. Candida türleri başta olmak üzere mantarlar olguların yaklaşık %5'inde sepsis etkeni olmaktadır (Fish 2002).

Sevim ve ark (2011)'nin 470 hastada yaptığı bir çalışmada Gram negatifler %64 (52 hasta), Gram pozitifler %21 (17 hasta), fungusların %7 (5 hasta) oranında sepsise neden olduğunu bildirmişlerdir.

Belli klinik tablolarda olası etken mikroorganizmanın bilinmesi antibiyotik seçiminde son derece önemlidir. Tablo 2.1.'de sepsiste sık rastlanan etkenler belirtilmiştir (Zarakolu ve Akova 2005).

**Tablo 2.1:** Sepsiste sık rastlanılan etkenler

Konağın durumu	Olası etkenler
Normal konak	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Yenidoğan	<i>Grup B Streptococcus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
Yaşlılık	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Üriner sistem anomalisi	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Alkolizm	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Siroz	Gram-negatif çomaklar, <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Salmonella</i>
Aspleni	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Capnocytophaga canimorsus</i>
Diyabet	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , mukormikozis
Hipogammaglobulinemi	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Escherichia coli</i>
Yanık	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kistik fibrozis	Çoğul dirençli <i>Pseudomonas spp.</i> ve <i>Burkholderia spp.</i>
AIDS	<i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> (pnömoni etkeni), <i>Mycobacterium avium intracellulare kompleks</i>
Solid organ transplantasyonu	Gram-negatif bakteriler, Sitomegalovirüs (CMV)
İntravasküler enstrümantasyon	<i>Staphylococcus aureus</i> , koagülaz-negatif stafilokoklar
Kronik steroid kullanımı	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
Postoperatif dönem	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , hastane infeksiyonu etkeni gram-negatif bakteriler

## 2.4. Sepsis Patogenezi

Sepsis patogenezi karmaşık bir olaydır. Mikroorganizmanın vücuda yerleşmesi, konak defansı ile etkileşimi sonucu hastalık ortaya çıkar. Hastalığın ortaya çıkışını, konağın immün sistemi ve bakteriyel virulans faktörleri belirler. Sepsis için predispozan faktörler Tablo 2.2.'de özetlenmiştir (Doğanay 1998).

**Tablo 2.2:** Sepsis oluşumunda predispoze faktörler

<b>Konağa Ait Faktörler</b>	<b>Terapötik Faktörler</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Altta yatan ölümcül hastalık</li><li>• Yaş (yenidoğan, &gt;65 yaş)</li><li>• Primer hastalık (siroz, DM, KBY, KKY, vb.)</li><li>• Konak savunma mekanizmalarının zayıflaması (nötropeni, malignite, disproteinemiler, kortikosteroid ve diğer immunosupressif tedaviler)</li><li>• Geniş travma ve yanıklar</li><li>• Lokal enfeksiyonlar</li><li>• Septik abortus, lohusalık</li><li>• Yakın geçmişte uygun olmayan antibiyoterapi</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• YBÜ'nde bakım</li><li>• İnvaziv damar kateterleri</li><li>• Fazla miktarda parenteral mayi veya kan ve kan ürünleri verilmesi</li><li>• Hemodiyaliz</li><li>• Diğer invaziv kateter ve enstrümantasyonlar (üriner kateter ve enstrümantasyon, entübasyon, endotrakeal tüp, mekanik ventilatör)</li><li>• Büyük cerrahi girişimler</li></ul>

### 2.4.1. Konağa ait faktörler ve enfeksiyonun giriş kapısı

Sepsise neden olan mikroorganizmalar dolaşıma genellikle damar dışı bir enfeksiyon odağından yayılım sonucu girmektedir. Bazen de enfeksiyon damar içi kateter, septik tromboflebit, bakteriyel endarterit, endokardit, mikotik anevrizmalar ve damar greftlerinden kaynaklanabilir. Enfeksiyona karşı konağın savunma mekanizmalarının bozulması, lokal veya sistemik enfeksiyonlara zemin hazırlar. Konak savunma mekanizmalarını; anatomik bariyer, hücresel defans (fagositik hücreler, lenfositler), spesifik ve nonspesifik humoral defans olmak üzere üç bölümde toplayabiliriz (Gullberg 1989).

Bakteriyel infeksiyonlara karşı organizmayı koruyan en önemli savunma sistemi anatomik bariyerdir. Sağlam deri ve mukozalar mikroorganizmaların daha derin dokuya girmelerini engeller. Travma, yanık veya perkütan damar içi kateterler bu bariyeri kırar. Gastrointestinal mukoza ve diğer mukozalar sitotoksik ilaçlar ve radyasyon tedavisinden zarar görürler. Diğer önemli bir savunma mekanizması ise vücut sekresyonları ve bunların salgılandıkları alanda sirkülasyonudur. Sirkülasyondaki bozulma, o anatomik bölgede kan akımının azalmasına doku basıncının artmasına ve bakteriyel proliferasyona neden olmaktadır (Gullberg 1989, Hoge 1991).

Ağır sepsis ve septik şok infeksiyöz ajana karşı konağın inflamatuvar ve prokoagülan türde yanıtını gösteren bir tablodur. Sepsis triadı sistemik inflamasyon, koagülasyon ve bozulmuş fibrinolizdir. Sepsis fizyopatolojisinde, mikrobiyal patojenler ve inflamatuvar yanıt yer almaktadır. Yapılan araştırmalarda dokularda oluşan infeksiyon ve travmatik hasar sonucu vücutta hümmoral sistemin aktive olduğu ve çeşitli sitokinlerin salındığı gösterilmiştir. (Bone 1991, Cohen 2002)

Sonuç, sistemik inflamatuvar yanıt, hemostatik değişiklikler ve organ hasarının ortaya çıkmasıdır. Mikroorganizmaların bazı antijenik yapıları ve toksinleri inflamasyonu başlatır (Tablo 2.3). Üzerinde en çok araştırma yapılan toksin gram negatif bakteri endotoksinleridir.

Lipopolisakkarid yapısındaki endotoksinin lipid A bölümü Gram(-)'lerde toksisiteden sorumludur. Ayrıca gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısal komponentleri (peptidoglikan ve teikoik asitler), kapsül antijenleri ve ekzotoksinler (S. aureus'un toksik şok sendromu toksinleri (TSST), S. pyogenes'in pirojenik toksinleri, P. aeruginosa'nın ekzotoksin A'sı), mantarların hücre duvarı antijenleri, viral veya paraziter antijenler inflamasyona neden olabilir. Bu antijenik yapı ve toksinler dolaşımdaki mononükleer fagositik hücreleri CD14 reseptörüne bağlanarak uyarırlar. Monositlerden tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin 1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve trombositleri aktive eden faktör (PAF) salınır. IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive ederek  $\gamma$ -interferon, IL-2, IL-4, granulosit-monosit-koloni-stimulan faktörlerin (GM-CSF) salgılanmasını sağlarlar (Bone 1991, Cohen 2002).

**Tablo 2.3:** Sepsis patogenezinde rol oynayan yapılar (Doğanay 1998)

Bakteriyel yapı	Kaynak	Örnek
Endotoksin (LPS, lipid A)	Bütün gram negatif bakteri	<i>E. coli</i> sepsisi Meningokoksemi
Peptidoglikan Lipoteikoik asit	Bütün bakteriler Gram pozitif bakteri	
Ekzotoksinler	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i> <i>E.coli</i> <i>Aeromonas spp</i>	a- hemolizin Streptolizin - O E. coli hemolizini Aerolizin
Süperantijenler	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>	TŞST-1 Enterotoksin A-F Pirojenik ekzotoksin A+C, SPE*
Enzimler	<i>S. pyogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i>	1L-1b konvertaz Fosfolipaz C

\*SPE: Streptokokal pirojenik ekzotoksin

\*TŞST-1: Toksik şok sendromu toksini-1

Bu sitokinler lokal infeksiyonun sınırlanmasında çok yararlı olurken, büyük miktarlarda sentezlenerek dolaşıma karışmaları yaygın endotel hücre hasarı ile sonuçlanır. Endotoksinin direkt etkisi veya sitokinlerin uyarımı ile tromboksan, prostoglandin ve lökotrienler gibi araşidonik asit metabolitlerinin salınması kapiller permeabilite artışına neden olur. Endotel hasarı, kapiller permeabilite artışı, kanın mikrosirkülasyonda göllenmesi, dolaşımdaki kan volumünün azalması şok ve organ yetersizliği ile sonuçlanır. Endotoksin ayrıca kompleman sistemini de aktive eder. Açığa çıkan C3a ve C5a bazofil ve mast hücrelerini uyarak, histamin başta olmak üzere çoğu hipotansiyona neden olan vazoaaktif bazı mediatörlerin salgılanmasına neden olur. Endotel hücresi tarafından salgılanan, daha önce endotel deprese eden faktör olarak bilinen nitrik oksit (NO) sepsisteki yaygın vazodilatasyondan sorumludur (Bone 1991, Cohen 2002).

**Tablo 2.4:** Sepsis patogenezindeki mediatörler (Cohen 2002)

Sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18, IL-12, IL-15, MIF, HMGB-1	Temel etkileri Nötrofil, lenfositler ve vasküler endotelin aktivasyonu; TNF, MIF, HMGB, IL-10 hücrel adezyon moleküllerinin aktivasyonu, prostaglandinlerin indüksiyonu, nitrik oksit sentaz ve akut faz proteinlerinin aktivasyonu, ateş (IL-10 bu etkilerin hepsini engelleyici bir etkiye sahiptir)
Kemokinler IL-8, MIP-1, MIP-1, MCP-1, MCP-3	İnflamatuvar hücrelerin mobilizasyonu ve aktivasyonu, makrofaj aktivasyonu
Lipid Mediyatörler Tromboksan A2, PAF, Prostaglandinler, Lökotrienler Doku faktörü (TF)	Vasküler endotelin aktivasyonu, vasküler tonusun düzenlenmesi, ekstresek koagülasyon kaskadının aktivasyonu
Oksijen Radikalleri Süperoksid ve hidroksil radikaller NO	Antimikrobik etki, vazokonstriksiyon/vazodilatasyon

MIF: Migration inhibitory factor, HMGB: High mobility group B, MIP: Macrophage inflammatory protein, MCP: Macrophage chemotactic protein, IL: İnterlökin, TNF: Tümör nekroz faktörü, PAF: Platelet aktive edici faktör.

Endotoksin etkisi ile aktive olan sistemlerden biri de koagülasyon sistemidir. Sepsiste hücrelerden salınan sitokinlerin çoğu trombin yapımını uyarmakta, başlangıçta ekstrinsik yol ve daha sonra faktör XII aktivasyonu ile intrinsik koagülasyon sistemi aktive olmaktadır. Mikrovasküler yatakta fibrin trombüsleri oluşarak, organ yetersizliğine neden olur. Pıhtılaşma proteinlerinin tüketimi kanamaya yol açmakta, hastalarda hem kanama, hem trombüs gelişimi birlikte görülmektedir. Diğer taraftan fibrin, plazmin tarafından parçalanarak fibrinolizise neden olmaktadır. Dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) olarak tanımlanan bu tablo sepsisteki kötü prognozun en önemli göstergelerinden biridir (Bone 1991, Cohen 2002).

## 2.5. Anti-enflamatuvar Yanıt

Sepsiste ortaya çıkan aşırı inflamatuvar yanıt, zıt etki gösteren molekül, mediatör ve sitokinlerle dengelenmeye, düzenlenmeye çalışılır. Anti-inflamatuvar sitokinlere örnek olarak TNF reseptörleri ve IL-1 reseptör antagonistleri verilebilir. IL-10 anti-inflamatuvar sitokinlerin prototipidir. Bu yanıtlara ek olarak metabolik aktivitede belirgin bir artış

(kortizol üretiminde artma, katekolamin salınımında artma), akut faz proteinlerinin induksiyonu, endotel aktivasyonu, adezyon moleküllerinin artışı, prostanoidler ve trombosit aktive edici faktörün salınımı da meydana gelir. Septik hastalarda bağışıklığın baskılanmasının önemli bir nedeni de lenfosit apoptozudur.

Ek olarak bu hastalarda B ve CD4 lenfosit subgruplarında da azalma görülür. Septik hastaların önemli bir kısmında görülen T-hücre yanıtında azalma ve anerji, ilk başta ortaya çıkan pro-inflamatuvar yanıtı dengelemeye yönelik aşırı bir karşı yanıttır (Tablo 2.5). Bu durum aynı zamanda daha sonra ortaya çıkabilecek organ yetersizliğinin gelişimine de neden olabilir (Bone 1991, Hotchkiss ve Karl 2003).

**Tablo 2.5:** Sepsiste inflamatuvar medyatörler (Karaali ve Tabak 2009)

Konak hücre	Proinflamatuvar medyatörler	Düzenleyici medyatörler	Anti-inflamatuvar medyatörler
Monosit/makrofaj	TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, IFN- $\gamma$ , doku faktörü, prostonoidler, lökotrienler, PAF, NO	IL-6 IL-12	IL-1Ra sTNFr TGF-b
Nötrofiller	integrin ekspresyonu, superoksit, TNF $\alpha$ - IL-1		BPI, defensinler, asikloksiasilhidrolaz
Lenfositler	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	IL-12	IL-4, IL-10, sIL-2r
Endotel hücresi	selektin, VCAM, ICAM, NO, doku faktörü		
Trombositler	serotonin, prostonidler	PDGF	
Plazma	koagulasyon kaskadı,	CRP, LBP	
komponentleri	kompleman aktivasyonu, bradikinin		

BPI, bakteriyel/permeabilite arttıran protein; CRP, C-reaktif protein; ICAM, hücre içi adezyon molekülü; IFN- $\gamma$ , interferon gama; IL-1Ra, interlökin-1 reseptör antagonisti; LBP, lipopolisakkarid bağlayan protein; NO, nitrik oksit, PAF, trombosit aktive eden faktör; PDGF, trombositten açığa çıkan büyüme faktörü; sIL-2r, solubl IL-2 reseptörü; sTNFr, solubl TNF reseptörü; TGF-b, transforming büyüme faktörü; TNF, tümör nekroz faktörü; VCAM, damar hücre adezyon molekülü

## 2.5 Labaratuvar Tanı

Sepsis tanısında etkenin gösterilmesine yönelik direk tanı yöntemleri veya klinik tablonun seyriyle ilgili çeşitli immünolojik proteinlerin gösterilmesine yönelik spesifik olmayan yöntemler kullanılmaktadır. (Yüce 2005)



**a) Non-spesifik yöntemler;** biyokimyasal testler, lökosit, CRP, prokalsitonin, kan gazı, endotoksin seviyesinin belirlenmesi

**b) Spesifik yöntemler ;** Bu yöntemler içerisinde altın standart kan kültürü olup diğeri ise moleküler yöntemlerdir.

#### **a) Non-spesifik yöntemler**

##### **Tam kan sayımı, koagülasyon testleri**

Sepsiste klinik evrelere göre farklı laboratuvar bulguları gözlenir. Hematolojik bulgular; genellikle lökositoz ve sola kayma görülür. Lökosit sayısı  $12.000/mm^3$  üstündedir. Bazen lökomoid reaksiyon görülebilir ve lökosit sayısı  $50-100 \text{ bin}/mm^3$  kadar ulaşır. Lökosit sayısı  $4.000/mm^3$  altına inen lökopeni durumları da görülebilir. Özellikle yenidoğanlarda, yaşlılarda, alkoliklerde ve diğerk kemik iliği rezervi yeterli olmayan hastalarda lökopeni görülür. Periferik yaymada, nötrofillerde toksik granülasyon, Dohle cisimleri ve vakuolizasyon görülür. Sadece vakuolizasyon bakteriyeminin önemli bir işareti kabul edilmektedir. Sepsiste eritrosit yapımı ve serum demiri de azalır. Fakat eğer infeksiyon uzamaz ise bu anemiye neden olmaz.

Plazma fibrinojen seviyesi, sepsisin erken döneminde normal sınırlarda olabilir, çünkü bu protein akut faz reaktanıdır. Ağır sepsislerde hipofibrinojenemi gelişir (Yüce 2005).

##### **Biyokimyasal testler**

Kan gazları, sepsis takibinde önemlidir. Erken dönemde respiratuvar alkaloz, daha sonra metabolik asidoz gelişir. Kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin seviyesi, şok varlığında veya olmadan da artış gösterebilir. Şok durumunda akut tubüler nekroz sonucu azotemi ve oligüri gelişir. (Yüce 2005). Sepsis tanısında kullanılan biyokimyasal testlerden özellikle CRP ve prokalsitonin rutinde sık kullanılan ve duyarlı testler olarak kabul edilmektedir.

##### **CRP**

Karaciğerdensentezlenen ve birbirine özdeş ve nonkovalan bağla bağlanmış beş alt birimden oluşan  $11.800$  dalton ağırlığında bir proteindir. Enfeksiyon ve inflamasyonda

CRP üretimi IL-6, IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi birtakım sitokinlerce uyarılır (Hansson ve Lindquist 1997).

CRP'nin enfeksiyona özgü olmayan bir gösterge olmasına karşın bakteriyel enfeksiyonlarda en yüksek seviyeye ulaşması, kronik inflamatuvar olayların akut alevlenmelerinde yükselmesi geniş kullanım alanı sağlamaktadır. Bakteriyel enfeksiyonlarda tedavi sonrası CRP'nin hızlı düşüşü, sağaltıma yanıtı değerlendirmede kullanımını da gündeme getirmiştir (Clyne ve Olshaker 1999).

CRP düzeyinin ölçümü sepsiste özellikle önemlidir. CRP'nin kullanımını sınırlayan başlıca dezavantajı enfeksiyona özgül olmaması, enfeksiyöz dışı nedenlerle de yükselebmesidir (Whang 1998).

### **Prokalsitonin**

Prokalsitonin, 116 aminoasitten oluşan, moleküler ağırlığı 13 kDa olan bir proteindir tiroid bezinde sentezlenen kalsitoninin prohormonu olarak kabul edilmektedir. İnfeksiyonlar sırasında PCT'deki artış tesadüfen keşfedilmiştir ve böylece PCT'nin bakteriyel enfeksiyonların bir belirteci olarak kullanılmaya başlanmıştır (Gendrel ve Bohuon 2000).

Prokalsitonin üretimi bakteriyel endotoksinler, ekzotoksinler ve bazı sitokinler tarafından uyarılabilmektedir. Çok yüksek PCT değerleri sadece ciddi akut bakteriyel enfeksiyonlarda, bazen de çoklu organ yetmezlik sendromu (Multiple Organ Dysfunction Syndrome-MODS) ve sepsisin hiperinflamatuvar evresinde görülür. PCT değerleri ağır sepsis olgularında normal düzeye inmemekte, sonraki hafif yükselmeler ise çoğunlukla kötü prognozu ve devam eden inflamasyonu göstermektedir (Günel ve Barut 2009).

### **b) Spesifik tanı metodları**

Sepsis tanısında enfeksiyon kaynağını oluşturan odak belirlenmeye çalışılmalıdır. Odağı belirlemek yönünden sistemik muayene en temel yol göstericidir. Bu inceleme sürecinde cerrahi ve diğer yaralar (dekübit) mutlaka gözden geçirilmeli, kateter giriş yeri ve ekstremiteler incelenmeli ve flebit, selülit gibi enfeksiyonlar saptanmalıdır. Tüm bu değerlendirmeler bittiğinde mutlaka kan kültürü ile beraber odak olarak belirlenen bölgelerden de kültür alınarak incelenmelidir. Enfektif bölgeler saptanarak bakteriyemi

kaynağı olup olmadıklarının saptanması, tedaviye yanıt ve prognozla yakından ilişkilidir (Llewelyn 2001, Vidaur 2004).

## **Kan Kültürü**

Sepsiste tanısında etkenlerin izole edilmesinde, altın standart kültür yöntemidir (Sankar 2008).

Çoğu zaman pozitif bir kan kültürü sonucu, klinisyeni doğrudan tanıya yöneltebilmektedir. Kan kültürü alınırken uygulanacak temel prensipler testin değerini artıracaktır. Kan kültürü alınırken; doğru yerden, doğru zamanda, doğru teknikle, yeterli miktarda örnek alınmalı, laboratuvara doğru koşullarda ulaştırılmalıdır.

Tanıda altın standart olan kan kültürünün duyarlılığı en yüksek %50-80 olarak verilmektedir (Gerdes 2004).

Bakteriyel kültürde en erken sonuç 24-72 saatte alınmaktadır ve kan kültüründe üreyen az miktarda bakteri kontaminasyon olarak değerlendirilir. Fakat sepsiste patojenlerin hızlı tespiti ve uygun antibiotik tedavisinin başlanması mortalite hızını etkilemektedir (Wallet 2010).

Yine de sepsis şüphesi olan her durumda antibiyotik tedavisi başlanmadan önce kan kültürü alınmalıdır.

### **Kan kültürü alınırken dikkat edilecek noktalar:**

- Kan olabildiğince kemoterapiye başlamadan önce alınmalıdır.
- Bakteriler hastalığın erken döneminde ve birinci haftanın sonuna kadar kanda çok sayıda bulunurlar.
- Hastalığın seyri esnasında ve özellikle bakterilerin belirli odaklardan kana yayıldıkları durumlarda bakterilerin kanda en çok buldukları saatler, ateş yükselmelerinden hemen önceki zamandır.
- Hemokültür için alınan kan ne kadar fazla miktarda olursa ve bir gün içinde ne kadar çok kez alınırsa mikroorganizmaların üretilme olasılığı o kadar artar.

- Büyükler için günde belirli aralıklarla 3 kez 10-15'er ml ya da aynı anda vücudun değişik venalarından 3 kez kan alınarak ekilmesi başarı şansını artırır.
- Çocukların kan hacmi az olup bakteriler daha yoğun miktarlarda olduklarından alınan kan miktarının fazla olmasına gerek yoktur. Üç kez ve her defasında 2-5 ml kan alınıp ekilmesi yeterlidir
- Ağır septisemili olgularda sağaltımdan hemen önce iki ayrı koldan alınan 10'ar ml kan ayrı ayrı ekim yapılır.

İdeal olarak tüm kültürlerin %5-10 CO<sub>2</sub> içeren atmosfer ortamında birisinin aerop diğerinin anaerop olarak üretilmeleri uygundur. Aerop ve fakültatif anaerop bakteriler de CO<sub>2</sub> li ortamlarda daha iyi ürerler.(Bilgehan 2004)

Kan kültürü almada kullanılacak bölgeler dikkatli bir şekilde seçilmeli ve uygun bir şekilde temizlenmelidir. Kan kültürleri alınırken iyi bir deri antisepsisinin uygulanması gerekir. Aksi halde deride kolonize olan KNS'ler, Corynebacterium gibi etkenler kontaminasyona neden olur (Sümerkan 1998). Bu nedenle kan kültürü için kan alınırken uygun prosedürün izlenmesi çok önemlidir; (Sankar 2008, Bilgehan 2004).

- a) Kanı alacak kişi eğitimli olmalı ve steril eldiven giymelidir.
- b) Kanın alınacağı 5 cm çapındaki bölge, önce % 70'lik etil veya isopropil alkol ile silindikten sonra 30 saniye beklenir. Daha sonra tercihen povidoneiodine ile sonra tekrar alkol ile temizlenmelidir, silme işlemleri dairesel olarak ve içten dışa olacak şekilde uygulanır.
- c) Deri 1 dk kadar kurumaya bırakılır
- d) İğne ile önce deri delinir. Sonra aynı deliğin altına gelmeyecek şekilde damar içine girilerek 10-15 ml kan alınır. Önce lastik turnike çözülür sonra iğne damardan çıkarılır. Deri %70 lik alkol ile silinir ve deliğin üzerine tampon bastırılır.
- e) Alınan kan, önce anaerop besiyerinin lastik tıkaçı iğne ile geçilerek kanın yarısı bırakılır. Sonra aynı şekilde aerop besiyerine ekim yapılır. Dikkat edilecek husus ekilen kan miktarının besiyeri miktarına oranının 1/5 ve en az 1/10 olmasıdır.

f) Bebeklerden kan vena jugularisten alınır. Bunun için bebek bir muayene masasına yatırılır. Başı sarkıtılır. Bu esnada vena jugularis belirginleşir. Dezenfeksiyon işleminden sonra kan alınır

**Kan kültürü için kullanılan yöntemler:** Kan kültürü 19.yüzyıldan beri enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılmaktadır. Belli başlı sistemleri 3 başlıkta sıralayabiliriz;

1- Manuel (konvansiyonel) sistemler

2- Lizis santrifügasyon sistemi

3- Otomatize sürekli izlemeli sistemler

**Manuel yöntemler:** Laboratuvarda hazırlanmış ya da ticari olarak satılan ağzı kapalı, içerisinde tripticase soy, brain-heart infüzyon ve columbia besiyerleri gibi olası etkenlere en kısa sürede ulaşmak amacıyla kullanacak zengin vasatlar içeren şişeler kullanılır.

Bazı şişeler hem sıvı hem de katı kısımları içerir (bifazik). Her gün sıvı besiyeri katı kısmın üzerine yaydırılıp doğrularak katı besiyerine ekim yapılır. Günlük izlemlerle bulanıklık oluşumu, kanın hemolizi, sıvı yada katı besiyerinde üremelerin gözlenmesi gibi üreme izlemi yapılır. Ayrıca kör pasajlar ile üreme takibi yapılabilir.

Ticari olarak satılan bazı şişelerin ağzında günlük inkübasyonları mümkün kılan ek düzenekler veya üreme indikatorü olan ek aparatlar bulunur. İş yoğunluğunun yüksek olduğu laboratuvarlarda şişelerin sürekli izlemleri ve pasajları sorun olmaktadır.

**Lizis santrifügasyon sistemi:** Talep olmadığından pek kullanılmamış olan bir sistemdir. Kan kültürlerinin alındığı şişelerde kanın şekilli elemanlarının parçalanmasını sağlayan maddelerle temasını takiben santrifügasyon yapılır ve agar plaklarına ekilir. Mantar ekimlerinde başarılı olduğu tespit edilmiştir. Rutin bakteriyel patojenlerin saptanması için kullanılabilir; ancak, örneklerin 8 saat içinde hazırlanmaması durumunda anaeroblari, *S. pneumoniae* ve *Haemophilus* türleri gibi mikroorganizmaların üretilmesinde yetersiz kalmaktadır (Murray 2007).

### **Otomatize kan kültür sistemleri**

Bu tür kan kültür sistem ve yöntemlerin ortaya çıkması ile hemokültür sonuçlarının daha sağlıklı alınmasında ve özellikle kontaminasyonların önlenmesinde büyük aşamalar

sağlanmıştır. Üretilen bakterilerin çeşitli otomasyon sistemleri ve yöntemleri ile de çok çabuk identifikasyonları ve antibiotik duyarlılıklarının saptanması, sağaltımı çok çabuk gereken septisemi olaylarında, klinik başarıyı büyük çapta olumlu yönde etkilemiştir. Merkez mikrobiyoloji laboratuvarımızda BACT/ALERT kan kültür sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde geniş üretme özelliği bulunan besiyeri var olup 10 ml kan alabilecek kapasitededir. Üreyen mikroorganizmalar CO<sub>2</sub> oluştururlar. Her şişenin tabanında CO<sub>2</sub>'ye duyarlı bir kimyasal ayıraç bulunmakta olup bu, kan ve besiyerinin bulunduğu bölümden tek yönlü geçişe izin veren bir membran ile ayrılmıştır. CO<sub>2</sub> oluştuğunda ayıracın rengi yeşilden sarıya döner. Şişelerin yerleştirildikleri aygıt otomatik olarak çalışan çalkalayıcı bir enkübatör olup kapasitesine göre 120-240 adet hemokültür şişesi alır. Aygıtın kapısı kapatılınca her 10 dakikada bir, her şişe için özel diyotlardan salınan bir ışın, şişenin endikatörüne yöneltilir. Yeterli CO<sub>2</sub> oluşması nedeniyle eğer endikatörün rengi değişmiş ise, aygıtla bağlantılı olan bilgisayarda o şişenin kod'unu da belirten bir sinyal alınarak hangi şişede üreme olmuş olduğu anlaşılır (Bilgehan 2004).

Şişelerden laboratuvarın çalışma prensipleri doğrultusunda boyama ve pasajlar yapılır. Bakterilerin tiplendirilmesi ve antibiotik duyarlılık testleri tamamlanır. Otomatize sistemlerin bakterileri üretmekte daha başarılı olduğu ve daha hızlı izolasyon sağladığı belirtilmektedir.

Birçok besiyeri içeriği mevcuttur: 40 ml'lik katkılı triptik soya buyyonu(TSB) içeren standart aerobik (SA) ve anaerobik (SN) besiyerleri ve bunlar 10 ml'ye kadar kan alabilmektedirler; peptonla zenginleştirilmiş TSB, BHI katı parçaları eklenmiş ve kandaki antimikrobiyal maddelere ve diğer indirgen maddelere bağlanan veya inaktive eden aktif kömür tozu içeren 30 ml'lik aerobik FAN(FA) ve 40 ml'lik anaerobik FAN(FN) besiyerleri; ve fazla miktarda kan alınamayan çocuk ve yaşlı hastalar için piyasada bulunan, pepton ile zengileştirilmiş TSB ve BHI katı parçaları eklenmiş ve aktif kömür tozu içeren daha düşük hacimli (20 ml) FAN besiyeri (Murray 2007).

### **Moleküler yöntemler**

Mikroorganizmaların tiplendirilmelerinde en güçlü, etkin ve güvenilir yaklaşımlardan biri DNA temelli yöntemlerdir. Son teknolojik gelişmeler, özellikle in vitro şartlarda nükleik asit çoğaltılması ve tespitine imkan sağlayan yöntemler, tıbbi tanı ve

tedavi protokollerinde önemli reformlar sağlamıştır. Bunlar nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon (NAA) yöntemleridir.

NAA yöntemlerinden, DNA/RNA üzerindeki spesifik gen bölgelerinin hedef alındığı hedef (target) amplifikasyon yöntemleri içerisinde ilk ve en önemli olanı Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) dir (Durmaz 2001).

### **Polimeraz zincir reaksiyonu(PZR)**

PZR özellikle kültürü yapılamayan birçok mikroorganizmanın direkt tanısında oldukça başarı sağlamaktadır. İlk olarak Kary Mullis (1993)'in *Thermus aquaticus*'dan izole edilen termostabil Tag DNA polimerazı, PZR tekniğinde başarı ile uygulaması, spesifik DNA dizilerinin in vitro şartlarda çoğaltılmasını mümkün hale getirmiştir (Durmaz 2001).

### **Prensibi**

PZR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş, test tüp sistemidir. İn vivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. PZR de in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. Bir PZR reaksiyonu hedef DNA, iki oligonükleotid primer, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, eşit olarak karıştırılmış deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP, dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), MgCl<sub>2</sub>, KCl ve bir Tris-HCl tampon içermektedir.

PZR basitçe üç olayın bir döngü halinde tekrarlanmasından oluşur. Bunlar;

- Denatürasyon: Çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96°C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Moleküller arası hidrojen bağlarının kırılması ile meydana gelir.
- Primer bağlanması (Annealing): Örnek, birkaç dakika 30-60 °C'de tutularak, primerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) ssDNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu, hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır.

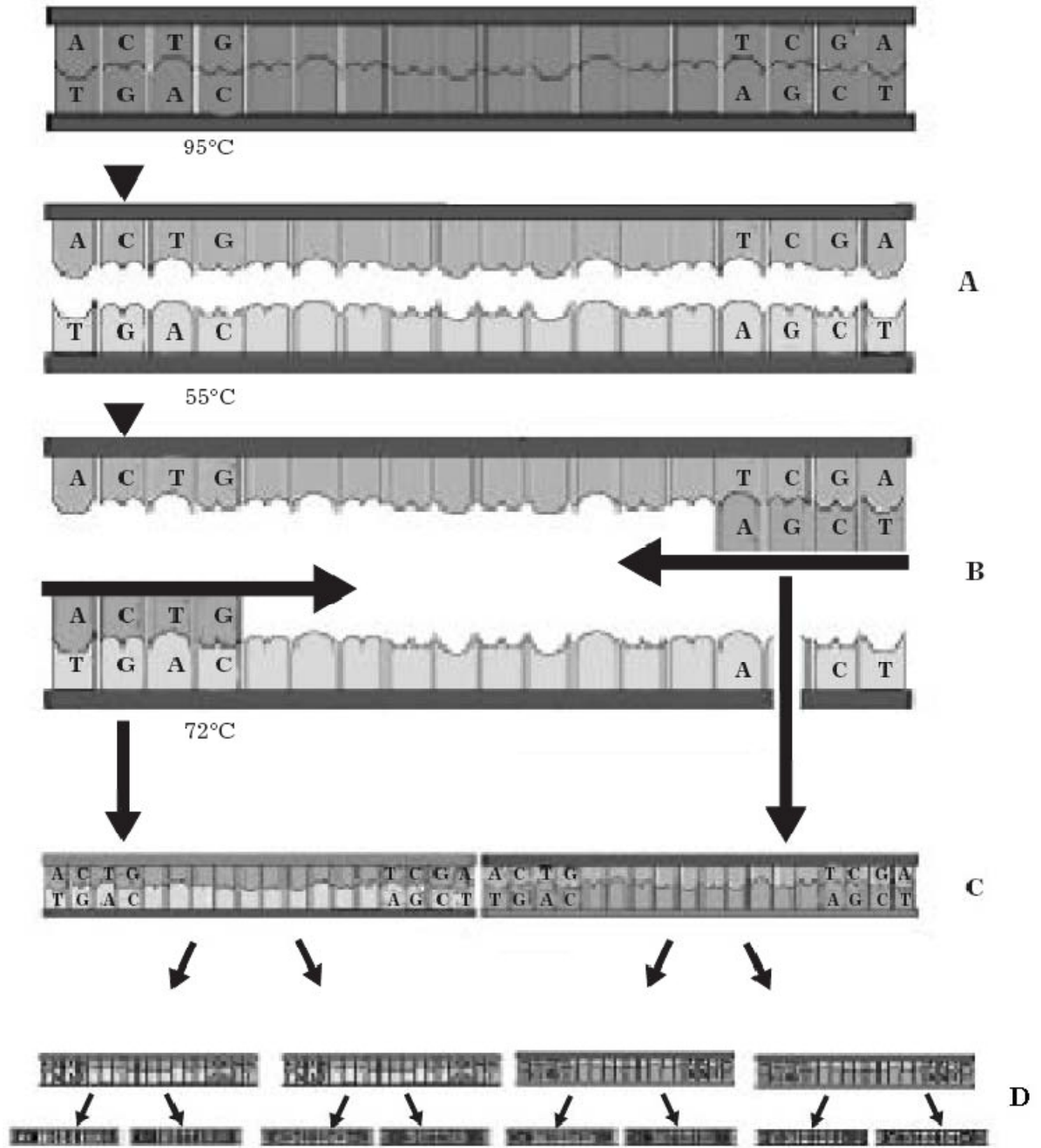
- Uzama (Extension): Polimeraz enzimi yardımı ile ssDNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'→3' yönde uzatılmasıdır. DNA polimeraz, solüsyonda bulunan dATP, dTTP, dCTP veya dGTP moleküllerinden diziye gelmesi gerekeni primerden başlamak üzere bağlar. Uzatma için optimal ısı 65-72 °C dir.

Bağlanma sikluslarını takiben, orijinal DNA segmenti yeni komplementer DNA'lar ve yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. Bu işlem 30 defa tekrarlanarak milyardan fazla hedef DNA eldesi mümkün hale gelir ( Durmaz 2001).





Şekil 2.1: PZR basamakları (Birben 2006)



(A) Sıcaklığı arttırılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. (B) Sıcaklığın düşmesi ile primerlerin bağlanması ve uzatma gerçekleşir. (C) Yeni oluşan iki zincir. (D) Bu artış üssel olarak devam eder

Özellikle hızlı mikrobiyolojik tanı için PZR yöntemine dayalı teknikler yüksek duyarlılığa sahip olup kültür yöntemiyle saptanamayan mikroorganizmaların saptanmasına olanak

vermektedir. Mikroorganizmanın genetik materyali kanda, serobrospinal sıvıda veya doku örneklerinde saptanabilir (Köksal 2005).

Çalışmamızda Real-time PZR yöntemiyle sepsis ön tanılı hastaların kanından etken mikroorganizmaları identifiye etmeye çalıştık.

### **Real-time PZR**

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PZR yöntemidir.

Sisteminin bir uygulamasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan 'cyber green'(floresans boya) miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. PZR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Real-time PZR kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç alınabilmektedir. (Durmaz 2001)

Moleküler yöntemlerin tanısal mikrobiyolojide kullanımının 3 amacı vardır: Sonucun hızlı alınması, konvansiyonel yöntemlerle saptanamayan mikroorganizmaların saptanması ve test duyarlılığının yüksek olmasıdır.

## **2.6 TEDAVİ**

Sepsis ve septik şok tablolarının tanı ve tedavisi mümkün olduğunca dinamik bir şekilde ve vakit kaybedilmeden gerçekleştirilmelidir. Bu kapsamda, sepsis riski taşıyan hastalar klinik olarak dikkatli takip edilmeli, bulgular mümkün olduğunca erken değerlendirilip tanıya yönelik tetkikler hemen gerçekleştirilmelidir (Köksal 2005).

1. İnfeksiyon kaynağının belirlenmesi, etkenin belirlenmesi ve enfeksiyon odağının kontrol edilmesi
2. Uygun antibiyotik tedavisinin başlanması
3. Hemodinamik fonksiyonların düzeltilmesi ve devam ettirilmesi
4. Oksijenlenme ve solunumun desteklenmesi
5. Antitrombotik, profibrinolitik, antiinflamatuvar tedavi
6. Metabolik destek
7. Kritik hastalarda komplikasyonların önlenmesi

### **2.6.1 Antimikrobiyal Tedavi**

Sepsis tedavisinde antibiyotik seçimi, infeksiyonun gelişim yeri (toplum kökenli-nazokomiyal); konağın özellikleri, sepsisin kaynağı dikkate alınarak ve olası etken düşünülerek akılcı bir şekilde planlanır. Ayrıca hastanın yatmakta olduğu birimin kan ve diğer kültürlerinde üretilen etkenler ve direnç durumları tedavide dikkate alınmalıdır (Köksal 2005).

Sepsiste başlangıç antimikrobial tedaviye hemen daima ampirik olarak başlanır. Uygun antimikrobiyal tedavinin zamanında başlaması prognozu olumlu yönde etkiler. Sepsis mortalitesi yüksek bir hastalık olduğundan başlangıç antimikrobial tedavi mutlaka olası tüm etkenleri kapsayacak şekilde geniş tutulmalıdır.

Uygun kültürleri aldıktan sonra, ağır sepsisin tespitinden itibaren ilk bir saat içinde intravenöz antibiyotik tedaviyi başlamak gerekir. Antimikrobiyal ajan varsayılan infeksiyon kaynağına geçebilmelidir ( Dellinger 2004).

Ciddi seyirli sepsis olgularında “deeskalasyon” olarak adlandırılan, geniş spektrumlu antibiyotikler ile başlayıp, kültür sonuçlarına göre dar spektrumlu antibiyotiğe geçiş yoluna başvurulur. “Deeskalasyon” tedavisinin mortalite oranlarını azalttığı ileri sürülmektedir (Öztürk 2006 ).

Ağır sepsis ve septik şoklu hastalarda antifungal ajanların da ampirik kullanımı önerilmemektedir. Antifungal tedavi geniş spektrumlu antibakteriyel tedaviye yanıt alınamayan veya kanıtlanmış fungal infeksiyonlarda kullanılmalıdır (Köksal 2005).

Altta yatan hastalık ve buna bağlı olarak konağın savunma mekanizmalarındaki bozukluklar bazı mikroorganizmalarla daha sık infeksiyon görölmesine neden olabilir . Nozokomiyal sepsisli olgularda hastanın izlendiği hastane veya kliniğin son altı ayda kan kültürlerinde üreyen bakterilerin antibiyotik duyarlılık durumlarının bilinmesi uygun ampirik antibiyotik tedavisi için önemlidir (Doğanay ve Ünal 2003).

Sepsisli hastalarda antimikrobiyal tedavi seçiminde olası infeksiyon odağı ve bu odakta en sık infeksiyona neden olabilecek patojenleri bilinmesi gerekmektedir. Primer infeksiyon odağının belirlenmesi hem farmokolojik hem de farmokolojik olmayan tedavi stratejilerinin seçilmesinde ve klinik sonucun başarısında son derece önemlidir. Baktereminin eşlik ettiği nazokomiyal pnömonilerde ağır sepsis ve septik şok riski en yüksektir. İntraabdominal infeksiyonlar, polimikrobiyal bakteremiler, postoperatif yara infeksiyonlarında ağır sepsis riski yüksek, intravasküler katetere bağlı sepsis ve ürosepsiste ise düşüktür (Köksal 2005,Fish 2002).İnfeksiyon odaklarına göre önerilen antibiyotik tedavileri özetlenmiştir(Tablo 2.6).

**Tablo 2.6:** İnfeksiyon odaklarına göre önerilen antibiyotik tedavi (Köksal 2005)

İnfeksiyon odağı	Antibiyotik tedavisi
Akciğer	
Toplum kökenli pnömoni	Üçüncü veya dördüncü kuşak sefolosporin/ Beta-laktam+beta-laktamaz

	inhibitörü/karbepenem±aminoglikozid/kinolon/makrolid
Nazokomiyal pnömoni	Antipsödomonal penisilin/üçüncü veya dördüncü kuşak sefolosporin/karbepenem/beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü±aminoglikozid/kinolon/makrolid
İntraabdominal ve pelvik	
Toplum kökenli veya nazokomiyal	Metronidazol/klindamisin+aminoglikozid/aztreonam/Kinolon/üçüncü kuşak sefalosporin veya beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü veya karbepenem
Üriner sistem	
Toplum kökenli	Üçüncü kuşak sefolosporin/kinolon/aztreonam/beta-laktam+beta-laktamaz inh.±aminoglikozid
Nazokomiyal	Antipsödomonal üçüncü veya dördüncü kuşak sefolosporin/beta-laktam+beta-laktamaz inh./karbepenem±aminoglikozid/kinolon/aztreonam
Deri ve yumuşak doku	
Toplum kökenli seülit	Antistafilokoksik penisilin/birinci kuşak sefolosporin±aminoglikozid
Nazokomiyal yanık inf.	Glikopeptid+antipsödomonal beta-laktam±aminoglikozid
Bası yarası	Metronidazol/klindamisin+üçüncü kuşak sefolosporin/aminoglikozid/kinolon/aztreonam±glikopeptid
Cerrahi alan	Antistafilokoksik penisilin veya glikopeptid+üçüncü kuşak sefolosporin/aminoglikozid/kinolon veya beta-laktam+beta-laktamaz inh./karbepenem±glikopeptid
Nazokomiyal intravasküler odak	
İntravasküler kateter	Antistafilokoksik penisilin veya glikopeptid± üçüncü veya dördüncü kuşak sefalosporin/aminoglikozit/kinolon/aztreonam/karbepenem

	/linezolid
İnfeksiyon odağı bilinmiyor	
Toplum kökenli veya nazokomiyal	Metronodizol/klindamisin+üçüncü kuşak sefolosporin/dördüncü kuşak sefolosporin/aminoglikozid/kinolon/aztreonam veya karbepenem/beta-laktam+beat-laktamaz inh./üçüncü kuşak sefolosporin/dördüncü kuşak sefolosporin

**Tablo 2.6.(devam)** İnfeksiyon odaklarına göre önerilen antibiyotik tedavi

Metisilin direnci dikkate alınmalıdır

Yakın zamanlara kadar hep tartışılmalı bir konu, sepsiste ampirik tedavide tek ya da kombine antibiyotik uygulaması olmuştur. Ancak günümüzde özellikle üçüncü kuşak sefalosporinler, karbapenemler, beta-laktamaz inhibitörlü geniş spektrumlu penisilinler ve dördüncü kuşak kinolonlar, geniş spektrum sağlama amacıyla antibiyotiklerin kombine edilme gerekliliğini ortadan kaldırmıştır. Ancak sinerji ve direnç gelişimini önleme amacıyla ciddi Pseudomonas infeksiyonlarında kombinasyon tedavisi hala tercih edilmektedir (Zarakolu ve Akova 2005).

Tedavi süresi tipik olarak 7-10 gün arasında olmalı ve klinik yanıtı göre değerlendirilmelidir.( Dellinger 2004)

### 2.6.2 Hemodinamik Destek Tedavi

Yetersiz doku perfüzyonu ve oksijenizasyon, çoklu organ yetmezliğine gidişte önemli faktörlerdir. Erken dönemde agresif bir sıvı resüsitasyonu, kardiyovasküler stabilitenin temininde başlangıç basamağıdır. Mevcut hipotansiyon erken dönemde hızlı bir sıvı resüsitasyonuna sıklıkla cevap verir. Bu ilk resüsitasyonda sıvı ihtiyacı çok fazla olabilir ve yeterli dolum basınçlarına ulaşmak, ilk basamak tedavide hayati önem taşır.Daha sonra kardiyovasküler stabilite sağlanamazsa vasopressör ajanlar tedaviye eklenir.(Köksal 2005)

### 2.6.3 Solunumsal Destek Tedavi

Sepsis olgularının %25-42' sinde akut akciğer hasarı görülmektedir. Ağır sepsis ve septik şokta birçok hastada bu klinik tablo, akut solunum sıkıntısı sendromu(ARDS)'na ilerleyebilmektedir. Sepsisteki hastalarda klinik tablonun ARDS ile komplike olmasının mortaliteyi %60 düzeylerine yükselttiği bildirilmektedir.

Bu hastaların takip ve tedavisinde mekanik ventilasyon desteği ihtiyacının erken dönemde değerlendirilmesi birincil basamağı oluşturur. (Köksal 2005)

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışmaya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2011/250 no'lu kararı ile onay alındı. 121518004 no'lu proje ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklendi.

Çalışmaya Kasım 2012-Mart 2013 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na yoğun bakım ünitelerinde sepsis ön tanısıyla yatmakta olan hastaların kan kültürü örnekleri dahil edildi. Kan kültürü örnekleri laboratuvara kabul edilen hastalardan, eş zamanlı olarak moleküler testlerin çalışılması amacıyla EDTA'lı tüpe kan örnekleri alındı. Hastaların demografik özelliklerine hastane otomasyon yönetim sisteminden ulaşıldı.

#### **3.1 Kan Kültürü**

Kan kültürü örnekleri BacT-Alert 3D (Biomérieux) tam otomatik kan kültürü sisteminde inkübe edildi. BacT/Alert 3D mikrobiyal saptama sistemi, bakteremi/fungemiye neden olduğundan şüphelenilen hastalardan alınan numunelerin üremelerini aerobik ya da anaerobik olarak sürekli izleyen, numuneleri inkübe eden ve çalkalayan tam otomatik, kolorimetrik bir sistemdir. Numune cihaza yerleştirildikten sonra, pozitif veya negatif olarak saptanana kadar periyodik olarak, cihazın içinde takip edildi. Üreme olduğu saptandığında (pozitif bir sonuç) cihaz tarafından sesli alarm verildi. Bir numunede 5 gün süre içerisinde, herhangi bir mikrobiyal üreme görülmediğinde ise negatif olarak bildirildi.

Tek kullanımlık BacT/Alert şişeleri, katı-faz reflektometrelerle sürekli izlenen karbondioksit sensörlerine sahiptirler. BacT/Alert bilgi işlem sistemi sensör okumalarını denetler ve hangi numunelerin negatif, hangilerinin pozitif olduğuna karar veren bir veritabanına sahiptir.

BacT-Alert kültür şişeleri, plastik kapaklı steril şişelerdir. Şişelerin, 77 cc kapasitesi olup, aerobik, anaerobik ve pediatrik kullanım için planlanmış şekilleri vardır. Şişelerin iç

tabanında kolorimetrik CO<sub>2</sub> sensörü bulunur. Bakteri üremesinin olması ile CO<sub>2</sub> oranındaki değişiklik sensörlerce algılanır ve cihaz software'yi ekrandan üreme varlığını gösterir.

**Aerobik şişeler,** vakum altında CO<sub>2</sub> içeren kompleks aminoasitleri ve karbonhidrat substratları içeren triptik soya besiyeridir (40 ml). Antikoagülan olarak sodyum polianethol sulfonat ( % 0.035) içerir.

**Anaerobik şişeler;** vakum altında CO<sub>2</sub> ihtiva eden hava atmosferinde kompleks aminoasidleri ve karbonhidrat substratları içeren triptik soya besiyeridir (40 ml). Antikoagulan olarak sodyum polianethol sulfonat (% 0.035) ihtiva etmektedir.

**Pediyatrik şişeler;** vakum altında CO<sub>2</sub> ihtiva eden nitrojen atmosferinde kompleks aminoasidleri ve karbonhidrat substratları içeren beyin kalp infüzyon besiyeridir (20 ml). Antikoagulan olarak sodyum polianetholsulfonat (% 0.02) içerir

### **Bakterilerin tanımlanması**

Üreme sinyali veren kan kültürü şişeleri, cihazdan çıkarılarak bek alevi yanında, şişe kapakları, alkollü pamukla silindikten sonra, şişelerden enjektör ile yaklaşık 1 ml kadar kan örneği alındı. Alınan örneklerin, % 5 koyun kanlı agar (Biomérieux, Fransa), Eosin Metilen Blue (EMB) agar (Sigma) ve Sabouraud dextroz agar(SDA)'a ekim yapıldı. Plaklar, 37 °C'lik etüvde 24-48 saat inkübe edildi. Bir numunede 5 gün süre içerisinde, herhangi bir mikrobiyal üreme görülmediğinde ise negatif olarak bildirildi. Kan kültürü alımında en önemli sorun kontaminasyondur, özellikle ciltteki normal florada bulunan KNS'ler (nadiren de Streptococcus spp) buna sıklıkla neden olmaktadır. Bunların hastalık etkeni olabilmesi için kan kültüründen aynı duyarlılık paternine sahip KNS türünün en az iki kez izole edilmesi gerekmektedir. İnkübasyon süreleri sonunda üreme olanlarda konvansiyonel yöntemler (Gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi, plazma koagülaz) ve Vitek 2 Compact (Biomérieux, Fransa) tam otomatik bakteri tanımlama sistemi kullanarak identifikasyonu yapıldı.

**Kanlı Agar:** Hazır ticari olarak satılmakta olan ve 90 mm çapında, plastik petri içerisinde, % 5 koyun kanı içeren Mueller Hinton agar kullanıldı (Biomérieux, Fransa).

**Eosin Metilen Blue Agar:** Toz halinde ticari olarak satılmakta olan EMB agar, bir balon içerisinde 1 litre distile suya 36 gram eklenip 12 °C'de 15 dakika otoklavlanarak hazırlandı. El yakmayacak sıcaklığa (40-50°C'ye) düşüğünde daha önceden steril etmiş



olduğumuz cam petrilere (70-90 mm çapında) 0.4 mm kalınlıkta olacak Şekilde döküldü ve besiyeri oda ısısında donduktan sonra plakları ters çevirerek buzdolabında +4  C 'de muhafaza edildi. Ekim yapmadan önce oda ısısında bir süre beklettikten sonra ekimler yapıldı.

EMB besiyerinin içeriği (gr/L.);

- Pepton 10.0,
- di-Potasyum hidrojen fosfat 2.0,
- Laktoz 5.0,
- Sukroz 5.0,
- Eosin 0.4,
- Metilen Blue 0.07,
- Agar-agar 13.5

**ukulata Agar:** Toz halinde ticari olarak satılmakta olan Gelose Mueller Hinton 2 (MH2-D) agardan (Biom rieux, Fransa) steril bir balon içerisine 1 litre suya 38 gram olacak Şekilde konuldu ve 121 C'de 15 dakika otoklavlandı.

Otoklavdan ıkdıktan sonra besiyerinin sıcaklığı 50-55 C'ye dŕtğnde % 5 oranında insan kanı (tam kan) eklendi. Kanı ekler eklemeyen balonu yavaŕ hareketlerle alev üzerinde çalkalayarak ısının etkisiyle eritrositlerin parçalanması ve sonuçta besiyerinin renginin kahverengi olmasını sağlandı. Steril cam plaklara besiyerini dökerek ve besiyerinin donmasını bekledikten sonra buzdolabının +4  C bölmesinde muhafaza edildi. Ekim yapılmadan önce oda ısısında bir süre beklettikten sonra ekimleri yapıldı.

ukulata agar içeriği;

- Gelose Mueller Hinton 2 (MH2-D) Agar (Biom rieux, Fransa)
- % 5 İnsan kanı; kan bankasından torba kan olarak temin edildi.

## **Sabouraud-Dextroz Agar**

İçeriği;

- Dextroz
- Pepton veya Neoptone
- Agar
- Sikloheksimid
- Kloromfenikol
- Saf su

Dekstroz, pepton su ve agar karıştırılıp sıcak su banyosunda eritilir.10 ml asetonda eritilmiş 500 mg sikloheksimid ve 10 ml %95'lik alkolde eritilmiş kloromfenikol eklendi. Ph 6.8-7 'ye ayarlanır.Otoklavda 121 derecede 10 dakika sterillendi. Nem kaybettirmeksizin soğukta 3 ay saklanabilir.

## **Konvansiyonel Yöntemler**

### **Katalaz Testi (Gunn ve ark 1987)**

- Katalaz enzimi yapan bakteriler hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırıştırır. Bu nedenle bu enzim hidrojen peroksit ile araştırılır.
- Katı besi yerinde (kanlı agar hariç) üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden öze ile yeterli miktarda alınarak temiz bir lamın üzerine konuldu.
- Üzerine, % 30'luk hidrojen peroksitten bir damla damlatıldı.
- Hidrojenperoksit katılmasından sonra hava kabarcıkların görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Şüpheli durumlarda gram boyama yapılarak mikroskop altında değerlendirildi

**Koagülaz Testi:** Bu deney ile bağlı koagülaz=kümeleşme faktörü=clamping factor ortaya konulmaktadır. Bakteri yüzeyindeki faktörün plazmadaki fibrinojeni pıhtılaştırıp Stafilokokları kümeleştirmesi ile sonuçlanır. Çalışmamızda lamda koagülaz testi yapıldı. Lam üzerine bir damla latex koagülaz (Oxoid) damlatıldı. Üzerine test edilecek bakteri ile süspansiyon yapıldı. İyice karıştırıldıktan sonra aglütinasyon varlığı pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

**Oksidaz testi :** Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidase enziminin (sitokrom C oksidase) varlığını ortaya koymada kullanılır. %1'lik 32 tetramethyl-p-phenlenediaminie dihydrochloride bir kurutma kağıdına emdirilip, öze ile alınan bir koloninin bu kağıda sürülmesine takip eden saniyeler içerisinde renk değişiminin olup olmasına bakılır. Mavi rengin oluşması bakterinin oksidaz enzimi ürettiğini gösterir. Hiç bir renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi.

Üreyen bakterilerin kanlı agardaki kolonileri üzerine hazır olarak temin edilen substrat emdirilmiş (tetramethyl-p-phenlenediaminie dihydrochloride) strip (Oxoid), değerlendirilerek oluşan renk reaksiyonu 1-2 dakika içerisinde değerlendirildi. Kağıt üzerinde mavi, mor rengin oluşması oksidaz pozitif olarak değerlendirildi. (Michael ve Abbott 2002)

### **Gram boyama (Bilgehan 2004)**

#### **Preperat Hazırlanması**

- Temiz bir lam üzerine öze ile bir damla steril fizyolojik tuz çözeltisi damlatıldı.
- Öze bek alevinde sterilize edilerek, soğuması için kısa süre beklendi,
- Steril öze ile katı besiyerinden bir miktar bakteri kolonisi alındı,
- Bakteri kolonisi lam üzerine damlatılmış su ile karıştırıldı,
- Öze bek alevinde sterilize edilerek yerine kondu,
- Preparat havada kurutuldu,
- Bir pens yardımıyla bir ucundan tutulan lam bek alevinden 3 kere geçirilerek fiksasyon yapıldı.

#### **Boyama işlemi**

- Uygulamada hazırlanan preparat üzerine kristal violet damlatılarak 1-2 dakika beklendi,
- Su ile hafifçe yıkanarak boyanın fazlası akitildi,

- Lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletildi, sürenin sonunda lugol çözeltisi akıtıldı.
- Preparat % 95'lik etil alkol ile 10-15 saniye yıkandı.
- Preparat, saf sudan geçirildikten sonra sulu karbol fuksin çözeltisi ile 10-30 saniye boyandı.
- Damıtık su ile iyice yıkanıp ve kurutma kağıdı ile hafifçe suyu alınarak kurumaya bırakıldı.

İmmersiyon objektifi ile mikroskopta incelendi.

### **Kullanılan çözeltiler**

#### **Kristal violet çözeltisi:**

- Kristal violet 0.50 gr
- Damıtık su 100.00 ml

#### **Lugol çözeltisi**

- İyot 1.00 gr
- KI 2.00 gr
- Damıtık su 300.00ml

### **Bakterilerin Biyokimyasal Özellikleri**

Bakterilerin biyokimyasal özellikleri Vitek 2 (Biomerieux, Fransa) tam otomatik bakteri tanımlama sistemi ile belirlenmiştir. Vitek 2 sistemi bakterilerin ve mayaların tanımlanmasında kullanılan, kolorometrik, bilgisayar destekli bir yöntemdir. Tanımlama liyofilize kartlara, 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonunun dağıtılması, 8-16 saat  $35.5 \pm 1.0$  °C'de cihazın inkübatöründe inkübasyondan sonra kuyucuklardaki biyokimyasal verilerin toplanıp, veri tabanındaki datalarla karşılaştırılmasıyla yapılır. Tanımlama amacıyla, GN (Gram negatif) tanımlama kartı, GP (Gram pozitif) tanımlama kartı kullanılmıştır.

## **Mantarların Tanımlanması**

Üreme sinyali veren kan kültürü şişelerinden maya mantarları için özel besiyeri olan Sabouraud dextroz agar (SDA)'a ekim yapıp 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilerek maya mantarı yönünden incelendi. SDA besiyerinde üremesi olan plaklardan API ID 32 C sistemiyle identifikasyon yapıldı.

### **3.2 Real-time PZR**

DNA izolasyonu MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) ve amplifikasyonu Septi-Fast (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) hazır ticari kiti ile yapıldı.

LightCyler Septi-Fast Testi ile 3 aşamada tanımlama yapıldı;

- a) Homojenizasyon (MagNA Lyser Sistem ile) ve DNA izolasyonu (MagNA Pure Compact Sistem ile)
- b) 3 paralel reaksiyonda (Gram pozitif bakteri, Gram negatif bakteri, mantar) hedef DNA'nın gerçek zamanlı PZR amplifikasyonu ve spesifik hibridizasyon problemleri aracılığıyla ölçüm,
- c) Örneklerin ve kontrollerin otomatik tanımlanması

### **DNA izolasyonu**

Her bir hastadan alınan, 1.5 ml'lik EDTA'lı periferik kan örnekleri kullanıldı. \*Örnekler MagNa Lyser cihazında 70 sn 7000 rpm'de lysis kiti tüplerinde lysis edildi. MagNA Lyser Cihazı hücreleri veya diğer biyolojik maddeleri otomatik olarak homojenize eden cihazdır. Bu cihaz üst faz içeren nükleik asitlerin (NA) ve sonraki arıtma, ekstraksiyon veya analize uygun proteinlerin üretimini kolaylaştırır. MagNA Lyser Cihazının çalıştırılması sırasında, özel tüplerle dolu rotor hızla çalkalanır. Cihazın salınması tüplerin içindekileri (boncuklar, hücre malzemesi ve lizin reaktifleri gibi) hafif bir bükülme hareketiyle son derece yüksek hızda aşağı yukarı çalkalar.

\*5-10 dk. MagNA Lyser soğuk bloğunda bekletilir. Orta fazda bulunan homojenize olmuş kan materyali, MagNa Pure Compact Cihazına Bakteri **DNA protokolü** kullanılarak yüklendi.

**\*Hasta numunelerinin izolasyonu;**

Başlangıç Hacmi:400µl

Elüsyon Hacmi:200µl

Internal Kontrol (IC):4µl (Kullanılmadan önce IC iyice vorteks edildi.)

**\*Negatif Kontrol izolasyonu;**

High Pure PZR Template Preparation Kit içinden Tissue Lysis Buffer kullanıldı.

Başlangıç Hacmi:400µl

Elüsyon Hacmi:200µl

Internal Kontrol (IC):4µl (Kullanılmadan önce IC iyice vorteks edildi.)

**DNA Amplifikasyonu**

**Hedef seçimi;** İç kısımdaki transkripsiyona uğramış ara (IS S-internal iranscribed spacer) bölge, bakteri ve mantar örneklerinin ayırt, edilmesi için hedef bölge seçilmiştir. Bakteri ve mantar genomlarında çeşitli operonlar bulunduğundan, tekli kopya genlerinden daha yüksek bir analitik duyarlılık sunar. Ayrıca, ITS ribozomal RNazlardan türe daha spesifiktir ve bu nedenle türlerin ayırt edilmesi için en uygun olandır. Tüm bakterilerin 16S ve 23S ribozomal DNA sekansları arasında ve tüm mantarların 18S ve 5.8 S ribozomal DNA sekansları arasında yer alır. Saptanabilen bakteriler Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Amplifikasyon;** SeptiFast PZR miksi deoksi timin yerine deoksiüridin içerir. Böylece sentezlenen tüm amplikonlar deoksiüridin ihtiva eder. Bu durum da Amphrase in seçiçi degradasyon yaratmasını sağlar. PZR amplifikasyonundan önce, Amphrase (urasil-N-glikosilaz) enzimi kullanılarak amplikon kontaminasyonu riski azaltılır. Deoksiüridin içeren DNA sarmallarını tanıyıp bunların bozulmasını katalize eder, ancak deoksitimidin içeren DNA'yı tanımaz. İşleme tabi tutulmuş örnekler, içinde PZR amplifikasyonunun meydana geldiği LighCycler® Kapilerler (100 µl) MGrade içindeki hot-start Taq polimeraz içeren amplifikasyon karışımına eklendi. Belirtilen örneklerin her bir hedefi, jenerik veya spesifik primerlerle amplifiye edildi. Hedeflerden bir karışım reaktif kontrollerinde olarak amplifiye edildi.

**Tablo 3.1:** Septifast tanı paneli

<b>Gram negatif</b>	<b>Gram pozitif</b>	<b>Mantar</b>
Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Klebsiella (pneumoniae/oxytoca) <sup>1</sup>	KNS	Candida tropicalis
Serratia marcescens	Streptococcus pneumoniae	Candida parapsilosis
Enterobacter (cloacae/aerogenes) <sup>1</sup>	Streptococcus spp. <sup>2</sup>	Candida glabrata
Proteus mirabilis	Enterococcus faecium	Candida krusei
Pseudomonas aeruginosa	Enterococcus faecalis	Aspergillus fumigatus
Acinetobacter baumannii		
Stenotrphomonas maltophilia		

<sup>1</sup> İki türü ayıramamaktadır. <sup>2</sup> Streptococcus agalactiae, pyogenes, viridans

**Septifast Mastermiks ve LC kapillerlerinin Hazırlanması;** 1 şişe RM(Reaktif karışımı) 1a, RM 1b. DM G+( Ölçüm karışımı Gram Pozitif), DM G-, DM F, RC G+(Reaktif Kontrolü Gram Pozitif) , RC G-, RC F (LC Septifast Kiti içinde) çalışmadan 15 dakika önce dışarı çıkarıldı

1. RM la haricindekiler, hafifçe vortekslendi ve tümü spin santrifüj yapıldı.
2. Tüm reaktifler ve deteksiyon miksleri Septifast soğuk bloğu üzerindeki uygun yerlerine yerleştirildi.
3. RM 1b'den 600 µl RM la içine ilave edildi ve pipetleme ile hafifçe karıştırıldı.
4. Oluşturulan RM'den (Reaktif miks) 200 µl DM G+, DM G- ve DM F içine ayrı ayrı ilave edildi. Böylelikle Mastermiks G+, MMX G- ve MMX F oluşturulmuş oldu.
5. Septifast Cooling Block üzerindeki uygun noktalara Mgrade Light Cycler 100 µl' kapillerlerden ilave edildi.
6. Oluşturulan MMX'lerden her biri sağdan sola olacak şekilde 50 µl kapillerlere ilave edildi.

7. MMX'ler ihtiva eden kapiller içine 50 µl DNA ilave edildi.

8. Light Cycler Carousel Centrifuge'de santrifüj edilerek Light Cycler cihazına yükleme yapıldı.

### **PZR Ürünlerinin Hibrit(Hyb) problemleri tarafından Gerçek Zamanlı Ölçümü**

Spesifik bir çift HybProb kullanılarak floresan ile ölçüldü. Floresanla işaretli bu Hyb problemler, amplifikasyon döngüsünün birleşme aşaması sırasında amplifiye edilmiş fragmanın bir iç sekansı ile hibritleşir. Yayılan floresan LightCycler® 2.0 Cihazı tarafından dört farklı ölçüm kanalından birinde ölçüldü. Amplifikasyonun tamamlanmasından sonra bir erime eğrisi analizi gerçekleştirilir. Erime sıcaklığı  $T_m$ 'leri, prob ile hedef DNA arasındaki uzunluk, sekans ve homoloji derecesine bağlıdır. Problemler, bir kanalda ölçülen  $T_m$ 'leri ile bu türlerin ayırt edilmesi için tasarlanmıştır.

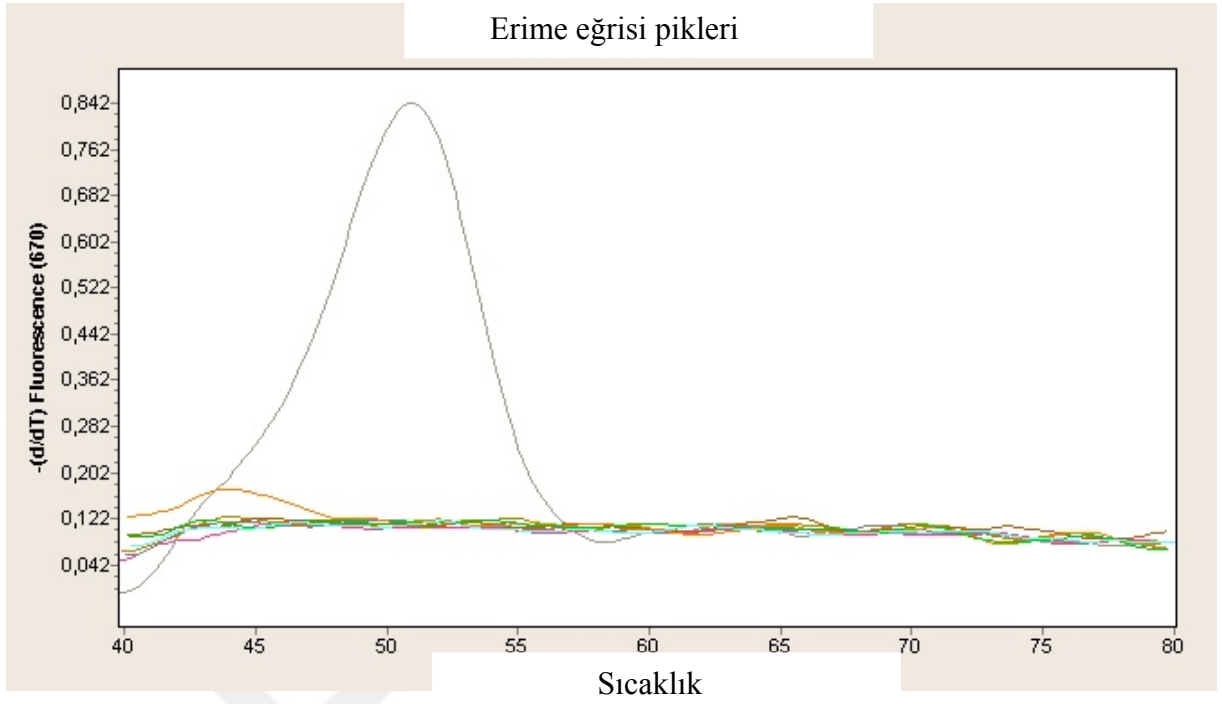
- Ekstra: Her PZR ürünü kendi  $T_m$  derecesi ile karakterizedir.

- $T_m$  derecesi: DNA çift zincirinin %50 sinin tek zincirli olduğu derecedir.

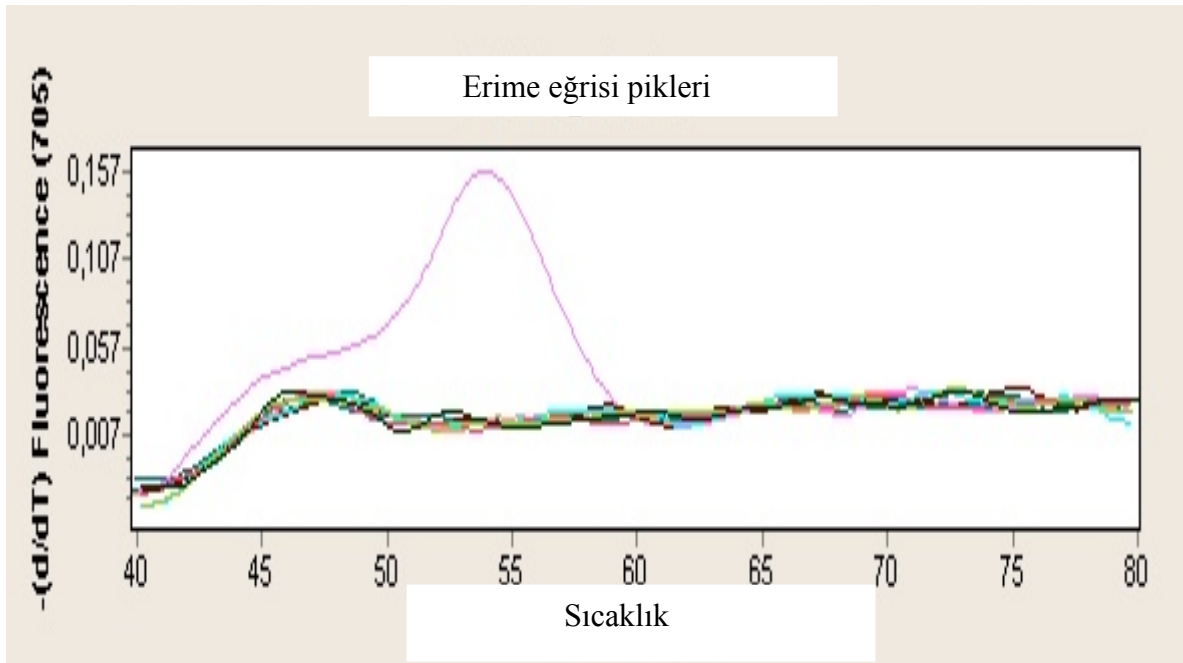
- PZR ürününün erimesi, sıcaklık arttıkça floresan miktarındaki düşüşten takip edilebilir.
- Farklı ürünler erime eğrisi profillerinde farklılık gösterir. Spesifik olmayan ürünler ve primer dimerleri ayırt edilebilir.



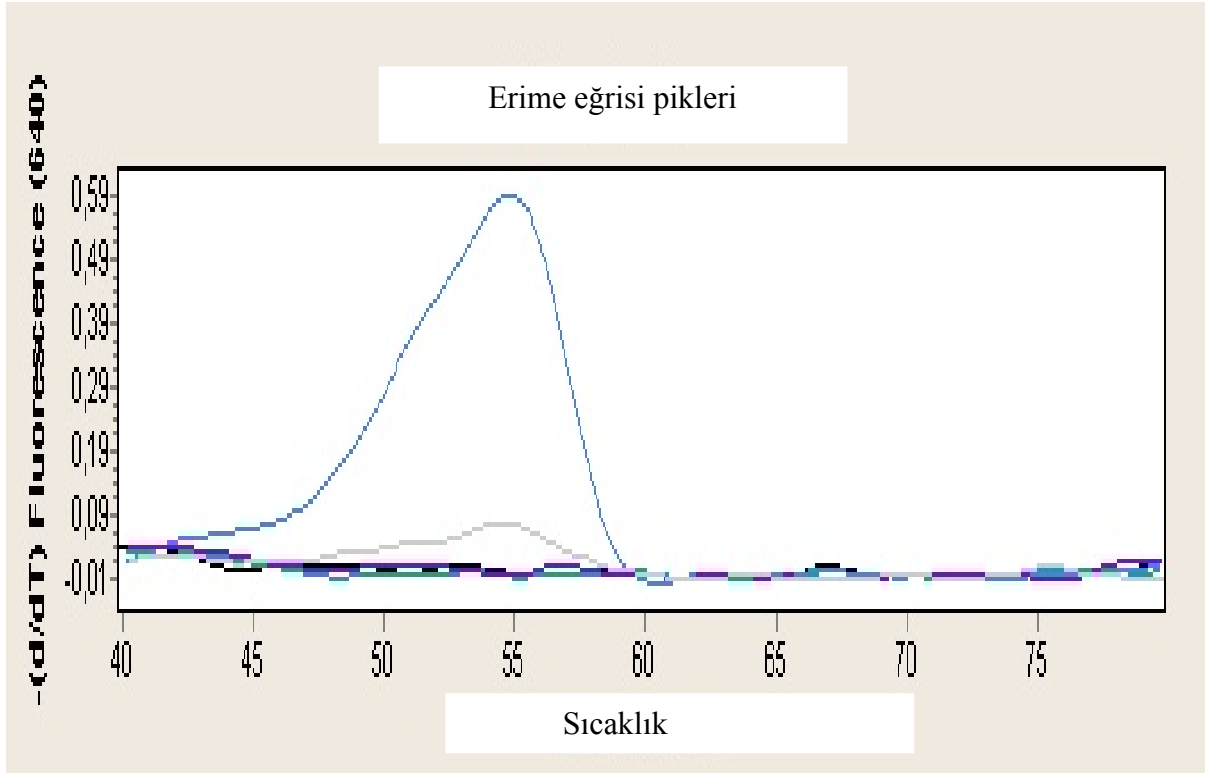
Şekil 3.1: *Escherichia coli*'nin Tm derecesi ve erime eğrisi



Şekil 3.2: *Candida parapsilosis*'in Tm derecesi ve erime eğrisi



Şekil 3.3: Koagülaz negatif stafilokok'un Tm derecesi ve erime eğrisi



### Türlerin ve Kontrollerin Otomatik Tanımlanması

Örneklerin ve kontrollerin erime sıcaklıkları (TM) belirlenmiş bir tanımlama yazılımıyla (SeptiFast Tanımlama Yazılımı) analiz edildi ve bir rapor oluşturuldu. Çalışma akışı kontaminasyon aralığını yansıtan düşük konsantrasyonlarda KNS görüntülenmediği için bu kontaminant mikroorganizmalar için Septifast tanımlama yazılım programında özel bir yazılım olan CP kesim kuralı uygulandı. *Aspergillus fumigatus*'un ortamdan kaynaklanan eksojen kontaminasyon olup olmadığının belirlenmesi için EORTC 2008 kriterleri kullanıldı (Pauv 2008).

### CP kesim kuralı

SeptiFast Master Listesindeki (SML) organizmaların birçoğu insan vücudunda, kan alma yoluyla SeptiFast testine aktarılabilecek normal flora olarak mevcuttur. CP kesim kuralı, kontamine edici oldukları ve gerçek infeksiyon için rastgele ajanlar olmadıkları varsayımına dayanarak belirli komensal organizmalar için pozitif oranı azaltan bir yazılım özelliğidir. CP kesim kuralı sadece KNS ve *Streptococcus spp*'ye uygulanabilir ve 20

döngüde ayarlanmıştır. 20'den az bir CP değeri pozitif bir sonucu temsil ederken, 20'den fazla bir CP değeri kontaminasyon olarak kabul edilir ve SIS raporunda negatif bir sonuç olarak görüntülenir. Aşağıda 8 örneğe ait sonuçların SIS raporu gösterilmektedir.

Şekil 3.4: Septifast sonuç raporu

Specimen	Assay	Data	Results	Flags	Comment
SeptiFast sample 1	G(+)	ch705 t62.00 h0.59	E. faecalis		
	G(-)	ch640 t57.21 h0.72	K. pneumoniae/oxytoca		
	F		⊖		
SeptiFast sample 2	G(+)	ch640 t54.77 h0.68 cp9.16	CoNS from SML		
	G(-)	ch640 t56.05 h0.64	K. pneumoniae/oxytoca		
	F	ch640 t54.93 h0.23	C. albicans		
SeptiFast sample 3	G(+)	ch640 t61.25 h2.47	S. aureus		
	G(-)	ch670 t51.00 h1.86	E. coli		
	F		⊖		
SeptiFast sample 4	G(+)		⊖		
	G(-)		⊖		
	F		⊖		
SeptiFast sample 5	G(+)		⊖		
	G(-)		⊖		
	F		⊖		
SeptiFast sample 6	G(+)		⊖		
	G(-)		⊖		
	F		⊖		
SeptiFast sample 7	G(+)		⊖		
	G(-)		⊖		
	F		⊖		
SeptiFast sample 8	G(+)		⊖		
	G(-)		⊖		
	F		⊖		

#### Testin Analitik Duyarlılığı

LightCycler® SeptiFast Test MGRADE'in analitik duyarlılığı, sağlıklı donörlerden alınan EDTA'lı kanda 100, 30 ve 3 CFU/mL'lik bir dilüsyon serisinin her bir analitinin isabet oranı analizi ile test edilmiştir. KNS ve *Streptococcus spp* (100 CFU/mL) dışında tüm türler için minimum 30 CFU/mL değerinde minimum bir duyarlılık elde edilmiştir.(CFU=coloni forming unit).

#### Çalışmada kullanılan ve hazır olan reaktifler

SeptiFast Lys Kit MGRADE LM (Lizis Matriksi) cam/seramik partiküller	100 Test
MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti I	32 test

<b>LightCycler® SeptiFast Kit MGRADE</b>	<b>54 Test</b>
<b>[1a] RM 1a</b> (Reaksiyon Karışımı 1a) 3 U/μL FastStart Taq Polimeraz < %0,1 AmpErase (urasil-N-glikosilaz) enzimi	3 x 27 μL
<b>[1b] RM 1b</b> (Reaksiyon Karışımı 1b) < %1 Brij < %0,1 Magnezyum solüsyonu < %0,1 dNTP Tris-HCl tamponu	3 x 620 μL
<b>[2] DM G+</b> (Ölçüm Karışımı Gram Pozitif) < %0,001 primer, G+ için proplar < %1 Brij Tris-HCl tamponu	3 x 126 μL
<b>[3] DM G-</b> (Ölçüm Karışımı Gram Negatif) < %0,001 primer, G- için proplar < %1 Brij Tris-HCl tamponu	3 x 126 μL
<b>[4] DM F</b> (Ölçüm Karışımı Mantar) < %0,001 primer, F için proplar < %1 Brij Tris-HCl tamponu	3 x 126 μL
<b>[5] RC G+</b> (Reaktif Kontrolü Gram Pozitif) < %0,001 G+ için DNA Kontrol Kalıbı EDTA Tris-HCl tamponu	1 x 330 μL
<b>[6] RC G-</b> (Reaktif Kontrolü Gram Negatif) < %0,001 GEDTA için DNA Kontrol Kalıbı Tris-HCl tamponu	1 x 330 μL
<b>[7] RC F</b> (Reaktif Kontrolü Mantar) < %0,001 F için DNA Kontrol Kalıbı EDTA Tris-HCl tamponu	1 x 330 μL
<b>[8] IC</b> (Dahili Kontrol) < %0,001 G+, G-, F için İşlem Kontrol Kalıbında DNA EDTA Tris-HCl tamponu	5 x 100 μL
<b>[9] NC</b> (Negatif Kontrol) < %35 Polietilen glikol 10000 Tris-HCl tamponu	10 x 1600 μL

### 3.3 İstatiksel Analiz

İstatiksel analiz için istatistik programı, SPSS 15.0 ( SPSS Inc, ABD, IL) Sürümü kullanıldı ve p değeri <0.05 ise anlamlı kabul edildi. Sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) McNemar testi kullanılarak hesaplandı.

## 4. BULGULAR

Çalışmaya Kasım 2012-Mart 2013 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na sepsis ön tanısıyla gelen 100 hastaya ait kan numuneleri dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların 47'si(%47) kadın, 53'ü(%53) erkekti. Hastalar 11-93 yaşları (ortalama 59,84 yaş; SD=21,2) arasındaydı. Çalışmaya dahil edilen örneklerin kliniklere göre dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** Çalışmaya alınan örneklerin kliniklere göre dağılımı

KLİNİK	SAYI
Dahili Yoğun Bakım	9
Anesteziyoloji ve Reaminasyon	26
Beyin Cerrahi Yoğun Bakım	3
Genel Cerrahi Yoğun Bakım	4
Acil Yoğun Bakım	40
Nöroloji Yoğun Bakım	13
Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım	2
Göğüs Cerrahisi Yoğun Bakım	1
Kardiyoloji Yoğun Bakım	2
Toplam	100

Örneklerin en çok (%40) acil yoğun bakım ünitesinden geldiği görülmüştür. Çalışmaya alınan kan kültürü örneklerinin 63'ünde (%63) üreme saptanmazken, 37 örnekte (%37) bir mikroorganizma saptandı. Kan kültüründe saptanan mikroorganizmaların dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2:** Kan kültüründe saptanan mikroorganizmaların dağılımı

Mikroorganizma	Sayı(%)
Koagülaz negatif stafilokoklar(KNS)	11(11)
Acinetobacter baumannii	6(6)
Escherichia coli	4(4)
Klebsiella pneumoniae	2(2)
Enterococcus faecium	4(4)
Enterococcus faecalis	4(4)
Staphylococcus aureus	1(1)
Candida albicans	1(1)
Candida spp.	1(1)
Candida parapsilosis	2(2)
Candida dubliniensis	1(1)
Üreme Olmayan	63(63)
Toplam	100

Kan kültürü değerlendirilen hastaların 37'sinde (% 37) bir bakteri izole edildi. En çok saptanan etken KNS idi (11 örnekte saptandı). Fakat bunlardan 6 tane KNS, kan alımında meydana gelen cilt bulaşı olması nedeniyle kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir.

Benzer şekilde moleküler yöntemle de sepsise neden olan etkenler araştırıldı. 100 hastanın, 64'ünde (% 64) herhangi bir etken saptanmazken, 36 (% 36) örnekte bir ve/veya iki etken saptanmıştır (dört örnekte iki etken saptandı). İki vakada tespit edilen Aspergillus fumigatus ortamdan kaynaklanan kontaminasyon olarak kabul edildi.. Moleküler yöntemle saptanan bakteriyemi etkenlerinin dağılımı gösterilmiştir (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3:** Real-time PZR yöntemiyle saptanan mikroorganizmaların dağılımı

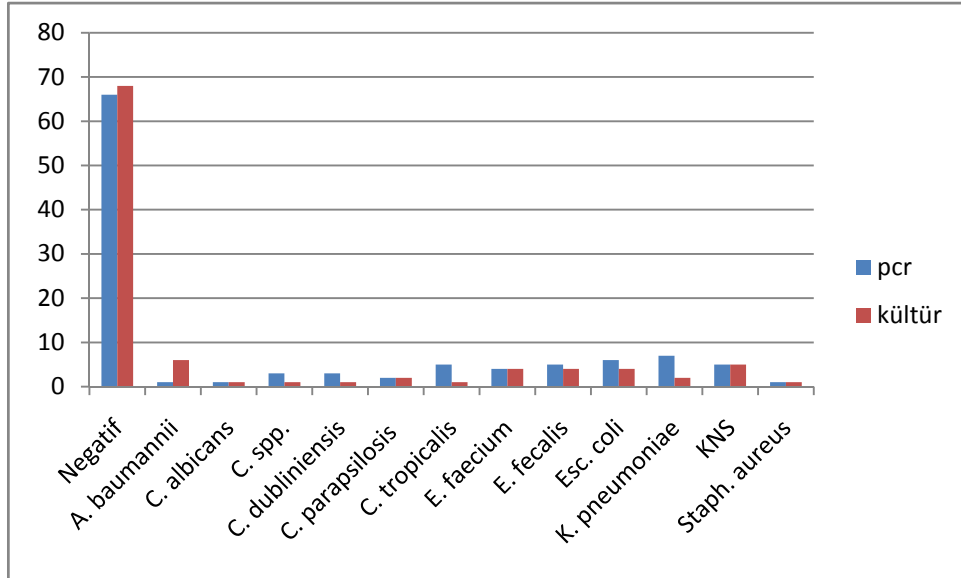
<b>Mikroorganizma</b>	<b>Sayı</b>
Koagülaz negatif stafilokoklar(KNS)	5
Acinetobacter baumannii	2
Escherichia coli	5
K.pneumoniae/oxytoca	7
E.cloacae/aerogenes	3
Staphylococcus aureus	6
Entereococcus faecium	3
Candida albicans	1
Candida tropicalis	3
Candida parapsilosis	3
Aspergillus fumigatus	2
Negatif	64
Toplam	104

Moleküler yöntemle en fazla saptanan mikroorganizma K.pneumoniae(%18,4) olarak bulundu. Kan kültürü ve moleküler yöntemle, 100 örneğin 68'inde benzer sonuca ulaşılmış olup her iki yöntem sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (McNemar test) da p değeri 0.860 bulunmuş ve bir farklılık olmadığı gösterilmiştir. Kan kültürü ile moleküler yöntemle aynı olarak bulunan sonuçlar tabloda verilmiştir (Tablo 4.4). Kan kültürü ve PZR'de saptanan mikroorganizmaların dağılım yüzdeleri grafikte gösterilmiştir (Şekil 3.5).

**Tablo 4.4: Kan kültürü ve Real-time PZR ile aynı bulunan sonuçlar**

Sonuç	Kan kültürü	Real-time PZR
KNS	5	5
K. pneumoniae	2	2
E.coli	3	3
E.faecium	2	2
C.parapsilosis	2	2
C.albicans	1	1
C.tropicalis	1	1
A.baumannii	1	1
Negatif	51	51
Toplam	68	68

**Şekil 3.5: Kan kültürü ve PZR’da saptanan mikroorganizmalar ve yüzdeleri**



100 örneğin 51’inde (%51) her iki testle de herhangi bir etken saptanmadı. Kan kültüründe patojen olduğu kabul edilen 32 örneğin 17’sinde (%53) PZR’la da aynı etken



saptandı. İki testin negatif saptama oranı, pozitif saptama oranına kıyasla daha yüksek düzeyde uyumlu bulundu (McNemar testi) (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5:** PZR ve Kan kültürü sonuçlarının karşılaştırılması

KAN KÜLTÜRÜ	PZR	
	NEGATİF	POZİTİF
NEGATİF	51	21
POZİTİF	15	17

Kültürle herhangi bir patojen tespit edilemeyen 17 örnekte, sadece moleküler yöntemle bir ve/veya iki etken tespit edilmiş olup, buna karşın moleküler yöntemin patojen saptayamadığı 15 örnekte de kan kültüründe bir etken tespit edilmiştir.

**Tablo 4.6:** PZR ve Kan kültürü analizleri ile tespit edilen patojenler

Patojen	Kan kültürü (yalnız)	PZR (yalnız)	Her iki metodla saptanan
S.aureus	1	6	0
KNS	0	0	5
E. fecalis	4	0	0
E. faecium	2	1	2
E. cloacae	0	3	0
E. coli	1	2	3
A. baumannii	5	1	1
K. pneumoniae	0	5	2
C. tropicalis	0	2	1
C. albicans	0	0	1
C. dubliniensis	1	0	0
C. parapsilosis	0	1	2
C. spp.	1	0	0
TOPLAM	15	21	17

Kan kültüründe üreme saptanmayan diğer 17 örnekte moleküler olarak 21 etken mikroorganizma saptanmıştır.

5 örnekte PZR yöntemiyle, kültürde tespit edilen etkene ek olarak ikinci bir mikroorganizma tespit edildi (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7:** PZR yöntemiyle kültür de tespit edilen etkenlere ek bulunan mikroorganizmalar

Örnek sayısı	Kan Kültürü	Septifast
1.Örnek	KNS	KNS/A.baumannii
2.Örnek	K.pneumonia	K.pneumonia/C.tropicalis
3.Örnek	C.tropicalis	K.pneumonia/C.tropicalis
4.Örnek	K.pneumonia	K.pneumonia/C.tropicalis
5.Örnek	E.faecium	E.faecium/P.aeruginosa

Her iki yöntemle de tespit edilen etkenler patojen olarak kabul edilip, tek bir mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir (Yanagihara 2010).

## 5. TARTIŞMA

Sepsis, enfeksiyona karşı gelişen sistemik inflamatuvar yanıt olarak tanımlanmaktadır. Hastaların hastaneye yatışlarından 48-72 saat sonra ortaya çıkan sepsis tablosu ise nozokomiyal sepsis olarak tanımlanır. Günümüzde tıbbi teknoloji ve antimikrobiyal tedavideki gelişmelere rağmen özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) sepsis, hayatı tehdit edici önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Sepsis Amerika Birleşik Devletleri(ABD)'nde ölüm nedenleri arasında 13. sırada olup YBÜ'nde ise ikinci sıradadır. Ülkemizde de hastanede yatan hastalarda özellikle YBÜ'nde, sepsis önemli bir enfeksiyon problemi olarak karşımıza çıkmakta ve hastaların önemli bir kısmı sepsis nedeniyle kaybedilmektedir (Balk 2000). Bakteriemi, tüm septik şok ve şiddetli sepsis vakalarının %30 ila 40'ına karşılıktır ve morbidite ve mortalitenin önemli nedenidir. Yeterli antimikrobiyal tedavinin başlanabilmesi ve hastanın prognozunu iyileştirmek için kandaki enfeksiyonların tanısı hızlı yapılmalıdır (Paolucci 2010). Bakteriyemilere bağlı mortalite % 20-50 arasında bildirilmektedir. Toplum kaynaklı bakteriyemilerde mortalite daha düşükken, nozokomiyal olarak edinilmiş bakteriyemilerde daha yüksektir. Ayrıca farklı hastanelerde farklı direnç profillerine sahip etkenlerin varlığı da prognozu etkilemektedir (Pirson 2005) (Magadia ve Weinstein 2001).

Tedaviye başlanmasında gecikmelerin mortalite oranını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmektedir. Örneğin kandidemide tedavide 12 saatten fazla gecikmenin mortaliteyi önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Morrell 2005). Tanı ve prognoz arasındaki dikkat çekici korelasyondan dolayı, hızlı sonuca varmayı sağlayan çeşitli tanı yöntemleri kullanıla gelmiştir. Etkenin direk saptandığı ve etkene yönelik invitro duyarlılık testlerinin çalışılabildiği kan kültürü yöntemleri kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında halen altın standart olarak kabul edilmektedir (Lehmann 2008). Ancak uzun süreli inkübasyondan dolayı zaman kaybına neden olmaktadır. LC-SF (LightCycler SeptiFast) testi önceden inkübasyona ihtiyaç duyulmadan doğrudan kanda mikroorganizmaları belirlemek için kullanılan ilk DNA bazlı testtir (Wallet 2010).

Bu çalışmada toplam 100 hastadan eş zamanlı olarak hem kan kültürü için hem de LC-SF testi için kan örneği alındı. Kan kültürü örneklerinin geldiği kliniklere göre dağılımına bakıldığında en fazla örneğin acil yoğun bakım (n: 40, % 40) ve reanimasyon ünitesinden (n: 26, % 26) gönderilmiş olduğu bulunmuştur. Bu klinikler uzun süre hastanede yatan ve yoğun bakım gerektiren kritik hastaların yattığı servislerdir. Nozokomiyal enfeksiyonların

da en fazla görüldüğü hasta grubudur. Çalışmamızda hastaların tümü hastanede yatan hastalardan seçilmiş ancak bakteriyemi-fungemi kaynağı nozokomiyal olup olmaması açısından, araştırılmamıştır.

Tüm septik olgularda, kan kültürlerinde her zaman bir etken saptanamayabilir. Hastaların ampirik antibiyotik tedavisi alıyor olmaları, üremek için özel koşulların sağlanması gereken bakterilerin bulunması, kan kültüründe gözlenebilen yalancı negatiflik (ki bu durum az miktarda örnek alınması, alınan örneğin inkübatöre konmadan uzun süre oda ısısında beklemesi ve alım tekniğindeki hatalarla ilişkilidir) gibi durumlar veya bakteremi-fungemi bulgusu olmadan ampirik alınan kan kültürü örneklerine bağlı olarak etken saptanamayabilmektedir. Daha önce Mehli ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada kan kültüründe örneklerin %26.26'sında üreme saptamıştır. Willke ve arkadaşları da (2011) örneklerin %12'sinde üreme olduğunu bildirmişlerdir. Bu oran bizim çalışmamızda %32 olarak bulunmuştur.

Bakteremiye neden olan mikroorganizmaların dağılımında, zaman içinde farklılıklar gözlenmiştir. Hastane infeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların ve bunların antibiyotiklere duyarlılıklarının değişmesi farklılığın en önemli nedenlerindedir. Antistafilokokal beta-laktamların kullanıma girmesiyle, 1970'li yıllarda, *Enterobacteriaceae* ailesi başta olmak üzere Gram negatif bakteriler en sık karşımıza çıkmaktayken, 1980'den sonra Gram pozitif mikroorganizmalara daha sık rastlanıldığı gözlenmiştir (Sümerkan 1998). Bu farklılıklar, hastaneden hastaneye, hastanenin büyüklüğüne, bakteriyemilerin toplum veya hastane kaynaklı olmasına, bakteriyemilerin kateter kaynaklı olmasına ve uygulanan antibiyotik tedavi protokollerine bağlı olabilir. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda Gram pozitif ve Gram negatif bakteri oranlarını sırası ile Durmaz ve ark.(2003) % 41.07 ve % 44.88, Yüce ve ark. (2005) % 28.1 ve % 59.3, Yurtsever ve ark. (2006) % 71 ve % 27, Sevim ve ark.(2007) % 54 ve % 41, Kaya ve ark. (2007) % 62.2 ve % 37.8, Duman ve ark. (2011) % 68.5 ve % 31.5 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki Gram pozitif ve Gram negatif bakteri oranları ise %29,7 ve %25,5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki örnek sayısının diğer çalışmalara göre daha az olması oranları etkilemiştir.

Kan kültürü sepsis etkenlerinin saptanmasında halen altın standart olduğu bildirilmektedir. Yeni teknoloji kan kültürü sistemleri hızlı, etkin ve kullanışlı sistemlerdir. BACTEC (Becton Dickinson, florometrik sistem) ve BacT/Alert (BioMeireux, kolorimetrik sistem) en çok kullanılan sistemlerdir. Kan kültürü alımında en önemli sorun kontaminasyondur,

özellikle ciltteki normal florada bulunan KNS'ler (nadiren de *Streptococcus spp*) buna sıklıkla neden olmaktadır. Kontaminasyonu en aza indirmek için uygun cilt antiseptisi yapılması gereklidir. Kan alma işinde görevli özel personel "flebotomist" varlığı kontaminasyon oranlarını azaltmaktadır. Dermatolojik sorun olan bölgeden ve femoral bölgeden kan kültürü alınmaması önerilir. Sadece kateterden alınan kan kültürleri yanıltıcı sonuçlar vereceğinden önerilmez. Kateterden alınması sürecinde uygun cilt antiseptisi en büyük sorun kaynağıdır. Farklı öneriler olmakla beraber, alkol, iyot bileşikleri en çok kullanılan antiseptiklerdir. Bu antiseptiklerin doğru uygulanmasında sorunlar olabilmektedir. İyotlu antiseptik kullanıldığında kurumasının (yaklaşık 30-60 saniye) ve bu arada etki etmesinin beklenmemesi, antisepti uygulanan bölgeye steril eldiven giymeden tekrar damarı palpe etmek amacıyla dokunulması en sık yapılan hatalardır. Alınan kan kültür şişesine aktarılmasında şişenin kapağı tercihen alkol ile silinmelidir ve bu aşamada iyot önerilmemektedir. İşlem sonunda derideki iyot alkol ile temizlenmelidir. (Magadia ve Weinstein 2001; Aygün 2008) Fakat buna rağmen Gram pozitif bakteriler içerisinde KNS bir çok çalışmada en sık izole edilen etkidir (Mehli 2007, Willke 2011). Bundan dolayı KNS'lerin cilt florasından kaynaklanıp kaynaklanmadığının tespit edilmesi gerekir. Patojen olması için kan kültüründen aynı duyarlılık paternine sahip KNS türünün en az iki kez izole edilmesi gerektiği bildirilmektedir (ACCP/ SCCM Konsensüs Konferans Komitesi).

Wallet ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada kan kültüründe saptanan KNS 1 vakada kan alımında meydana gelen bir kontaminant olarak kabul edilmiştir. West ve arkadaşları (2009) ise 22 vakada kontaminasyon bulmuşlar. Bununla birlikte, bizim çalışmamızda 6 vakada kontaminasyon görülmesine rağmen Louie ve arkadaşları (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 8 örnekte kontaminasyon (*S. epidermidis*) saptanmıştır.

Eksojen kontaminasyon ihtimali, otomatik gerçek zamanlı PZR gibi teknik gelişmelere bağlı olarak önemli oranda azalmıştır. Bu moleküler yöntem, kan kültüründen daha hızlı bir sonuç vermesine rağmen, bu yöntemin mevcut versiyonu, PZR basamağı hariç; laboratuvar ortamında, önemli ölçüde teknisyen çabası gerektirmektedir. Sonuç olarak, analizlerin gruplar halinde yapılması önerilmektedir. Laboratuvar ortamında, özellikle kanda *Aspergillus fumigatus*un belirlenmesinde kontaminasyonları önlemek amacıyla dikkatli olunmalıdır (Wallet 2010). Sadece Mancini ve arkadaşları (2008) LC-SF testiyle bir hastada *A. fumigatus* tespit etmiştir. Bizim çalışmamız esnasında 2 vakada eksojen kontaminasyona rastlanmıştır. Wallet ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada ise hiçbir eksojen kontaminant tespit edilmemiştir. Çalışmacılar ise bu durumu hazırlık safhasındaki büyük dikkat, çalışma

sırasındaki giysi değişikliği yapılması ve laboratuvar yüzeyleri ile aygıtların dekontaminasyonuna bağlamışlardır.

Bizim çalışmamızda kan kültüründe elde edilen sonuçlarla moleküler olarak saptanan sonuçlar karşılaştırıldığında 100 hastanın 68'inde benzer sonuçlara ulaşılmış olup, uyum % 68 olarak bulunmuştur. Saptanan uyumun negatif örneklerde daha yüksek (% 51), pozitif örneklerde daha düşük (% 17) olduğu gözlenmiştir. West ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada kültürde saptanan 50 tane örnek PZR ile tanımlanan türlere eş türler olarak tanımlanmıştır. 359 hastadan elde edilen 558 çift örnek değerlendirilmiş ve 382 örnekte her iki yöntemle de bir etken tespit edilememiştir. İki yöntem arasındaki uyum %71 olarak hesaplanmıştır. Grif ve arkadaşları (2012) ise her iki analizle, 51 örneği (%71.8) negatif olarak bulmuştur. Beş örnek ise iki analizde pozitif saptanmış ve kan kültür yöntemi ile PZR analizinin uyum oranı %78.9 olarak tespit edilmiştir. Dierkes ve arkadaşları (2012) kan kültürü ve PZR birlikte 14(%13) örnekte pozitiflik saptarken 69(%65) örnekte negatiflik saptamıştır.

Moleküler yöntemlerle, bakterinin canlı olmasına gerek duyulmadan DNA saptanabildiğinden hastaların antibiyotik alıyor olmaları, moleküler yöntemlerin duyarlılığını etkilememektedir. Bu nedenle pek çok çalışmada moleküler yöntemle kan kültürüne göre daha çok sayıda mikroorganizma saptanmıştır. Bizim çalışmamızda 100 numunenin kan kültürü ile 32(%32)'sinde etken tespit edilmişken, PZR ile 38(%38,7)'inde etken saptanmıştır. Lehmann ve arkadaşları (2007) nın çalışmasında kültürle 58(12,8) örnekte, moleküler olarak 114(%25,2) örnekte mikroorganizma tespit edilmiştir. Dierkes ve arkadaşları (2012) benzer bir çalışmada geleneksel kan kültürü ile 23(%22), PZR ile 28(%26) etken saptamışlardır. Mancini ve arkadaşlarının (2008) çalışmasındaki 103 numunenin yirmi biri (%20.4) ve 34'ü (%33) sırasıyla kan kültürü ve PZR ile pozitif olarak bulunmuştur.

Organizmaların birçoğu insan vücudunda, normal flora olarak mevcuttur ve kan alımı sırasında her iki teste de aktarılabilir. Bu nedenle, KNS veya Streptococcus spp., kan kültürü ve PZR tarafından belirlendiğinde, sonraki kriter, bu yüklerin patojenik bir enfeksiyonu temsil edip etmediğini belirlemek için uygulanmıştır: (1) Testler, KNS'ın , kan kültürü ve PZR tarafından tespit edilmesinden önce ve sonra 48 saat içinde en az iki kez yapılmışsa; (2) KNS ve Streptococcus spp., 48 saat içinde ayrı ayrı iki kez uygulanan iki farklı kan kültüründe saptanmış ve (3) KNS, Streptococcus spp., 3 kez uygulanan testlerde iki kez ya da daha çok kez tespit edilmişse, numune sonuçları bu üç kriterden birini karşılıyorsa, numune patojen olarak değerlendirilmektedir (Weinstein 2003).

West ve ark.(2009) yaptığı çalışmada, kan kültürü ile tanımlanan 96 izolattan 22 izolat kontaminant olarak düşünülürken, PZR ile 186 mikroorganizma tanımlanmış ve bunlardan 12 tanesi kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir. Paskualini ve arkadaşları (2012) ise kan kültüründe 19 kontaminasyona rağmen PZR ile hiç kontaminasyona rastlamamışlardır. Bizim çalışmamızda da sadece kültürle 6 vakada kontaminasyon görülmüştür. Matsushima ve ark(2012) ise PZR ile 1 vakada, kültürle 5 vakada kontaminasyon tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda moleküler olarak etken saptanamayan 15 örnekte kan kültüründe bir etken bulunmuştur. Moleküler testler hızlı ve duyarlı sonuç alınabilen testler olmasına rağmen, testi olumsuz etkileyen faktörlerin başında saptanmaya çalışılan DNA'nın amplifiye olmasını engelleyen çeşitli inhibitörler gelmektedir. Heparin gibi antikoagülanlar, hemoglobin yapısındaki hem molekülü ve örnekte çok miktarda farklı DNA'nın olması bu inhibitörlerin başlıcaları arasındadır. Ayrıca kan kültürüyle saptanan mikroorganizmalar PZR panelinde olmayan etkenler ise PZR'da tespit edilememektedir (Ünver 2005).Bizim çalışmamızda kan kültüründe saptanan etkenler PZR testi kapsamında mikroorganizmalar olduğu için nedenin PZR inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür. Antikoagülan olarak tüplerde EDTA bulunduğundan inhibisyonun diğer faktörlere ilgili olduğu sonucuna varılmıştır.

Lehmann ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada PZR ile saptanamayan 18 örnekte kan kültürü yöntemiyle bir etken saptanmıştır. Dierkes ve arkadaşları (2012) ise benzer bir çalışmada sadece kan kültürüyle 9 vakada etken tespit etmişlerdir. Matsushima ve arkadaşları da (2012) bizim çalışmamıza benzer olarak PZR'la tespit edilemeyen 12 örnekte bir mikroorganizma saptamışlardır.

Çalışmamızda kan kültüründe üreme saptanamayan 17 örnekte moleküler olarak 21 etken bulunmuştur. Bu grupta yer alan bakterilerin kan kültüründe saptanamamasının nedeni, cilt bulaşına (hastanede yatan hastaların cilt florasında KNS yanı sıra streptokokların ve mayaların sık kolonize olduğu bilinmektedir), bakterilerin sayısının az olmasından dolayı kültürde ürememesine bağlanabilir. Bazı hastaların tedavi nedeniyle almakta oldukları antibiyotikler de bu sonuca etki edebilir. Bu nedenle kan kültürü şişelerine serumdaki antibiyotik düzeyinin kan kültürü sonuçlarına etkisini azaltmak amacıyla çeşitli şelatör reçineler ilave edilmektedir. Buna rağmen yoğun antibiyotik tedavisi altındaki hastalardaki yüksek serum antibiyotik konsantrasyonlarının, üreme saptanması üzerine olumsuz etkisi olduğu bildirilmektedir. Moleküler yöntemlerle ise, bakterinin canlı olmasına dahi gerek kalmadan DNA saptanabildiğinden bu durum,

moleküler yöntemlerin duyarlılığını etkilememektedir (Ünver 2005;Wallet 2010). Bazı çalışmalarda lökosit sayısının da PZR inhibisyonuna neden olabileceği söylenmektedir. Özellikle 30000/mm<sup>3</sup> den daha yüksek olduğunda bu etkiden bahsedilmektedir. Wallet ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında 3 vakada PZR inhibisyonu gözlenmiştir. Jordan ve ark.(2005) nın çalışmasında bu durumun, düşük bakteriyel DNA'ya karşın lökosit sayısına bağlı olarak insan genomundaki DNA'nın yüksek seviyesi arasındaki farktan kaynaklanabileceği söylenmiştir. Fakat bizim çalışmamızda hastaların lökosit sayısı takip edilmediği için bu konuda bir saptamamız olmamıştır.

Wallet ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında sadece PZR yöntemiyle 11 etken tespit edilmişken, Lehmann ve ark. (2007)'nin çalışmasında kan kültürüyle tespit edilemeyen 74 mikroorganizma saptanmıştır. Bu fazlalığın sebebi Lehmann ve ark'.nın 453 örnekte çalışmış olmasından dolayıdır. Dierkes ve arkadaşları (2012) ise 106 örneğin 14'nde sadece PZR ile etken saptamışlardır. Matsushima ve arkadaşları da (2012) bizim çalışmamıza benzer şekilde 16 örnekte sadece moleküler yöntemle etken tespit etmişlerdir.

Sepsisin erken tanısı, etken patojenlerin hızlı tespiti ve uygun antibiyotik tedaviye erken başlanması sepsise bağlı mortalite üzerinde ortak bir etkiye sahiptir. Geleneksel kan kültürü ve diğer numunelerden elde edilen sonuçlar, enfeksiyondan şüphe edildiği dönemde veya hastanın ilk muayenesinden sonraki 24-72 saat içerisinde genellikle tespit edilemezler, bu durum ampirik tedavinin başlanmasını gerektirir. Sepsis şüphesinin ilk 24 saati süresince, antibiyotik tedavisi başlanmasının vakaların %10-60 ında uygun olmadığı bildirilmektedir (yani ,seçilmiş antibiyotiklere dirençli bir veya daha fazla sayıda patojen tespit edilmiştir) (Harbarth 2003;İbrahim ve ark 2000). Uygun olmayan antibiyotik tedavisi, yoğun bakım ünitelerinde(YBÜ) ortaya çıkan antibiyotik direnci(2) ile birlikte %10-45(Kollef 2000) lik bir mortalite oranıyla ve daha uzun hastane yatışı ile ilişkilendirilmiştir( Paterson ve Rice 2003). Etken patojenlere yönelik olarak antibiyotik tedavisinin hedeflenmesi direnci azaltmada önemlidir; fakat potansiyel patojenlerin tespiti için, daha hızlı ve duyarlı tanı koyucu araçlar daha doğru ve uygun antibiyotiğin seçimi için gereklidir. Yoğun bakım ünitelerine kabul edilen hastaların kanındaki tüm enfeksiyonların %90'nına neden olan 20 en önemli bakteriyel ve fungal türü kandan doğrudan tespit etmek için multipleks gerçek zamanlı PZR testi geliştirilmiştir. Ortalama 6 saatlik bir sürede sonuç vermektedir (Wallet 2010). Louie ve ark(2008)'da yaptıkları çalışmada ortalama patojen saptama zamanını 6,5 saat olarak bulmuşlar. Bizim çalışmamızda ise yaklaşık 4,5 saatte sonuca ulaşılmıştır. Test süreleri arasındaki farklılığın



sebebi izolasyon aşamasından kaynaklanmaktadır. Bizim çalışmamızda otomatik DNA izolasyonu yapılırken diğer çalışmalarda manuel izolasyon yapılmıştır.

Sonuçta çalışmamızda Real-time PZR yönteminin kan kültürüne göre duyarlılığı (sensivite) %44,7, özgüllüğü (spesifite) %77, pozitif prediktif değeri(PPV) %53,1 negatif prediktif değeri(NPV) %75 olarak tespit edilmiştir. Wallet ve ark.(2010)'nın yaptıkları çalışmada moleküler yöntemin analitik parametreleri; sensitivite, spesifisite, PPV,NPV sırasıyla %40, %88, %27 ve %93 olarak bulunmuştur. Lehmann ve ark(2010)' nın yaptığı çalışmada testin analitik değerleri sırasıyla %39, %81, %35, %95 olarak saptanmıştır. Grif ve arkadaşları (2012) ise benzer bir çalışmada, PZR analizinin negatif prediktif değeri %94; sensitivitesi %63 ve spesifitesi %81 idi. Yapılan çalışmalarda moleküler yöntemin spesifititesi aşağı yukarı benzer değerlere sahiptir. Real-time PZR yöntemi, bütün sepsis patojenleri tespit edememesine rağmen, kan kültür analizi tarafından belirlenemeyen, çok önemli olan patojenleri tam olarak saptamıştır. Fakat antibiyotik duyarlılık testi yapmadığı için ve belli mikroorganizmalar panelinde olmadığından dolayı kullanımı kısıtlanmaktadır. Ancak, moleküler ve kan kültürü analizlerini birleştirerek, patojen saptaması önemli ölçüde artacaktır. Bu hızlı patojen saptayan moleküler yöntem geleneksel kan kültürünün tamamlayıcısıdır. Özellikle antibiyotik tedavisi öncesi hastalarda etken patojenlerin zamanında tespiti için önerilmektedir (Yanagihara 2010)

Sepsis tanısında çeşitli indirekt tanı yöntemleri (en sık kullanılanları, lökosit sayısı, CRP, prokalsitonindir) sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin sepsis dışında bir çok durumda da saptanması duyarlılığını düşürmektedir. PZR temelli testlerden elde edilen sonuçların klinik anlamlılığı, ancak mevcut klinik ve diğer laboratuvar verilerinin tümüyle birlikte değerlendirilmelidir. Spesifik tanı yöntemlerinden kan kültürünün halen bakteriyemi için en duyarlı yöntem olduğu, moleküler olarak etkenlerin saptanmasına yönelik testlerde yaşanan sorunların giderilmesiyle, yakın bir gelecekte daha yaygın kullanılacağı ve daha uyumlu sonuçlara ulaşılacağı düşünülmektedir. Moleküler testlerin kullanılmasıyla ilgili en önemli kısıtlayıcı faktörlerin alt yapı sorunu ve maliyet olduğu bilinmektedir. PZR yöntemlerindeki gelişmeler, otomatik ekstraksiyon sistemlerin geliştirilmesi, konvansiyonel yöntemlere nazaran gerekli laboratuvar koşullarını nispeten kolaylaştırmıştır. Maliyetle ilgili de daha geniş hasta gruplarında çalışmalar yapılarak maliyet etkinlik araştırılmalıdır.

**Tablo 5.1** Çeşitli çalışmalardan elde edilen PZR ve Kan kültürü sonuçları

MAKALELER	Yıl	Çalışılan Örnek	PZR(%)	KK(%)	Toplam
Çalışmamız	2013	100	38(38)	32(32)	70
Dierkes ve ark	2012	106	28(26,4)	23(21,6)	51
Matsushima ve ark	2012	93	20(21,5)	12(12,9)	32
Grif ve ark	2012	71	12(16,9)	8(11,2)	20
Pasqualini ve ark	2012	391	60(15,3)	57(14,5)	117
Tsalik ve ark.	2010	306	64(20,9)	72(23,5)	136
Wallet ve ark.	2010	100	15(15)	10(10)	25
Yanagihara ve ark	2010	407	55(13,5)	43(10,5)	98
Obara ve ark	2010	78	21(26,9)	12(15,3)	33
Lehmann ve ark	2010	453	114(25,1)	58(12,8)	172
West ve ark	2009	558	186(33,3)	86(15,4)	282
Mancini ve ark	2008	103	34(33)	21(20,3)	55

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ve önerileri şu şekilde sıralayabiliriz:

1.Ciddi sepsis, YBÜ de sıklığı giderek artan bir ölüm nedenidir. Hızlı ve doğru antimikrobiyal tedavinin başlatılması mortaliteyi azaltmaktadır. Etiyolojik ajanların saptanmasında kan kültürü halen altın standart bir tanı yöntemidir. Fakat geleneksel kan kültürü ve diğer numunelerden elde edilen sonuçlar, sepsisten şüphe edildiği dönemde veya hastanın ilk muayenesinden sonraki 24-72 saat içerisinde genellikle tespit edilemezler. Bu durum ampirik tedavinin başlanmasını gerektirir.

2. Sepsis şüphesinin ilk 24 saati süresince, antibiyotik tedavisi başlanmasının vakaların %10-60 ında uygun olmadığı bildirilmektedir fakat potansiyel patojenlerin tespiti için, daha hızlı ve duyarlı tanı araçlarına daha doğru ve uygun antibiyotik seçimi için gereklidir. Uygun olmayan antibiyotik tedavisi, YBÜ'lerinde ortaya çıkan antibiyotik direncine sebep olmaktadır. Bu nedenle daha duyarlı ve hızlı tanı için moleküler yöntemlere ihtiyaç vardır.

3.Yoğun bakım ünitelerine kabul edilen hastaların kanındaki tüm enfeksiyonların %90'nına neden olan 20 en önemli bakteriyel ve fungal türü kandan doğrudan tespit etmek

için multipleks gerçek zamanlı PZR testi geliştirilmiştir. Ortalama 6 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermektedir. Bizde çalışmamızda ortalama 4,5 saatte sonuçları elde ettik.

4. Çalışmamızda multipleks real-time PZR yönteminin kan kültürüne göre duyarlılığı(sensivite) %44,7, özgülüğü(spesifite) %77, pozitif prediktif değeri(PPV) %53,1, negatif prediktif değeri(NPV) %75 olarak tespit edilmiştir.

5. Moleküler yöntemlerde, testi olumsuz etkileyen faktörlerin başında saptanmaya çalışılan DNA'nin amplifiye olmasını engelleyen çeşitli inhibitörler ( heparin, hem molekülü vb.) gelmektedir. Ayrıca PZR panelinde olmayan mikroorganizmaları tespit edememektedir. Bu durumlar moleküler yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır. Oysaki kan kültüründe böyle bir kısıtlama bulunmamaktadır. Ayrıca kültürde zor üreyen çeşitli mikroorganizmalar için özel besiyerlerine ekim yapılmaktadır. Bu da kültürde identifikasyon şansını arttırmaktadır.

6. Moleküler yöntemlerde tespit edilen etkene yönelik antibiyotik duyarlılığının belirlenemiyor olması bu yöntemin tek başına kullanımını kısıtlayan faktörlerden biridir. Sadece saptanan etkene bağlı olarak ampirik antibiyotik seçimine yardımcı olabilir. Fakat otomatize kan kültür sistemleri etken tespitinden sonraki bu aşamada, etkene yönelik antibiyotik duyarlılık testi yaptığı için moleküler yöntemlerden bu yönüyle üstündür.

7. Moleküler testlerin kullanılmasıyla ilgili en önemli kısıtlayıcı faktörlerin alt yapı sorunu ve maliyet olduğu bilinmektedir. Maliyetle ilgili de daha geniş hasta gruplarında çalışmalar yapılarak maliyet etkinliği araştırılmalıdır.

8. Hastaların almakta oldukları antibiyotiklerin kan kültür sonucuna etki ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle kan kültürü şişelerine serumdaki antibiyotik düzeyinin kan kültürü sonuçlarına etkisini azaltmak amacıyla çeşitli şelatör reçineler ilave edilmektedir. Buna rağmen yoğun antibiyotik tedavisi altındaki hastalardaki yüksek serum antibiyotik konsantrasyonlarının, üreme saptanması üzerine olumsuz etkisi olduğu bildirilmektedir. Moleküler yöntemlerle ise, bakterinin canlı olmasına dahi gerek kalmadan DNA saptanabildiğinden bu durum, moleküler yöntemlerin duyarlılığını etkilememektedir.

9. Moleküler testler hızlı ve duyarlı sonuç alınabilen testler olmasına rağmen, antimikrobiyal direnç verilerinin sağlanamaması, PZR analizi kapsamında olan hedef patojen sayısının sınırlılığına bağlı olarak yöntemin kullanılabilirliği kısıtlanmaktadır. Sonuç olarak, konvansiyonel ve moleküler yöntemler beraber uygulandığında, hızlı ve

uygun antimikrobiyal tedavi sağlanarak, antibiyotik direncinde azalma ve daha iyi klinik yanıt elde edilecektir.



## 7. KAYNAKLAR

- Akalın H. Yoğun bakım ünitesi enfeksiyonları: Risk faktörleri ve epidemiyoloji. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2001;5.5-16.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman S.V, et al. Epidemiyoloji of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med. 2002;108-121.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992; 20:864-74.
- Aygün G. Akut ateşli hastada laboratuvarın akılcı kullanımı. Toplumdan edinilmiş enfeksiyonlara pratik yaklaşımlar sempozyum dizisi. Dizi no: 61, 2008: 31-42.
- Balk, RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. Crit Care Clin 2000; 16:179.
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4.baskı. İzmir: Barış Kitabevi; 2004.syf.317- 28.
- Bone RC. The patogenesis of sepsis. Ann Intern Med 1991;115 (6): 457-9.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 ;101(6):1644-55.
- Clyne B, Olshaker S. The C-reactive protein. J Emerg Med. 1999; 17(6): 1019-1025.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002;420(6917): 885-91
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et all. European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008;46(12):1813-21.
- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, et al. Surviving sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic hock. Crit Care Med .2004; 32: 858-73.
- Dierkes C, Ehrenstein B, Linde HJ, Lehn N, Reisch U, Salzberger B. Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with sepsis. BMC Infectious Diseases 2009, 9:126
- Doğanay M, Ünal S. Nazokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları. Hastane İnf. 1.baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi;2003.473-88
- Doğanay M. Nozokomiyal sepsis: önemi ve tanımlar. Hastane İnf. Derg. 1998; 2: 179-181.

- Doğanay M, Willke Topçu A, Söyletir G. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002:621-36.
- Duman Y, Kuzucu Ç, Çuğlan SS. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. Erciyes Tıp Derg 2011; 33(3): 189-96.
- Durmaz G, Us T, Aydın A, Kiremitçi A, Kiraz N, Akgun Y. Optimum Detection Times for Bacteria and Yeast Species with the BACTEC 9120 Aerobic Blood Culture System: Evaluation for a 5-Year Period in a Turkish University Hospital J Clinical Microbiol. 2003; p. 819–21
- Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2.Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2001;15-43. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Malatya
- Eşel D, Doğanay M, Alp E, Sümerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish University Hospital: epidemiology, microbiology, and patient outcome. Clin Microb Infect. 2003; 9: 1038-44
- F. Wallet, S. Nseir, L. Baumann, S. Herwegh, B. Sendid, M. Boulo, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. Clin Microbiol Infect. 2010; 16: 774–9
- Fish DN. Optimal antimicrobial therapy for sepsis. Am J Health Syst Pharm. 2002;59:13-9.
- Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin as a marker of bacterial infection. Pediatr Infect Dis J. 2000; 19: 679-88.
- Gerdes, JS. Diagnosis and management of bacterial infections in the neonate. Pediatr Clin North Am. 2004;51(4):939-59.
- Grif K, Fille M, Würzner R, Weiss G, Lorenz I, Gruber G, et al. Rapid detection of bloodstream pathogens by real-time PCR in patients with sepsis. Wien Klin Wochenschr 2012 124:266–70.
- Gullberg RM, Homann SR, Phair JP. Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. Rev Infect Dis 1989; 11(1): 74-85.
- Gunn BA, Kiser JF, Almazon RD. Culture Media, test and Reagents in Bacteriology. In: Howard BJ, Klass J, (eds). Clinical and pathogenetic microbiology. The CV Mosby Company, St. Louis. 1987; 849-905.
- Günel Ö, Barut ŞH. Sepsis ve prokalsitonin Cumhuriyet Tıp Derg 2009; 31: 502-512.
- Hansson LO, Lindquist L. İnfeksiyon hastalıklarının tanı ve izleminde C-reaktif proteinin rolü. İnfeksiyon Hastalıkları Gündemi 1997;11:33-44.
- Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. Am J Med 2003; 115: 529–35.

- Hoge CW, Adams J, Buchanan B, Sears SD. Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal. *Rev Infect Dis* 1991; 13 (4): 600-5.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.
- Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118: 146–155.
- Jordan JA, Durso MB. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* 2005; 7: 575–81.
- Karaali R, Tabak F. Sepsis patogenezi. *Klinik Fizyopatoloji*. 2009;22(3):71-6.
- Kaya S, Arıdoğan CB, Çetin H, Demirci M. Çocuk hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik dirençleri. *Fırat Tıp Derg* 2007; 12: 34-6.
- Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 131–8.
- Köksal İ, Çakar N, Arman D .Yoğun bakım infeksiyonları. *Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi*;2005. syf.369-453
- Lehmann LE, Hunfeld K-P ,Book M, Brade V , Steinbrucker M, Wissing H, et al. Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis *Intensive Care Med* 2010 ;36(1):49-56
- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefl A, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* (2008) 197:313–24.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250-6.
- Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27 (1): 10- 32.
- Louie RF, Tang Z, Albertson TE et al. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008; 36: 1487–92.
- Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, et al. Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected Sepsis. *J clin microbiol*; 2011: 2252–8
- Magadia RR, Weinstein MP. Laboratory diagnosis of bacteremia and fungemia. *Infect Dis Clin North America* 2001; 15: 1009-24.

- Mancini N, Clerici D, Diotti R et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2008; 57: 601–4.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
- Matot I, Sprung CL Definition of sepsis. *Intensive Care Med.* 2001;27 Suppl 1:3-9
- Matsushima A, Tasaki O, Shimazu T, Asari S, Kimura K, Sakata T, Sugimoto H. Potential Clinical Usefulness of the Polymerase Chain Reaction Test to Detect Pathogens Causing Sepsis. *J Medical Microbiol Diagnosis* 2012, 1:2
- Mehli M, Gayyurhan ED, Zer Y, Akgün S, Özgür Akın FE, Balcı İ. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* 2007; 21(3): 141-145.
- Michael JJ, Abbott SL. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *J Clin Microbiol.* 2002; 40:1887-91.
- Morrell M, Victoria J, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the Empiric Treatment of *Candida* Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. *Antimicrob Agents Chemother* .2005; 49(9): 3640–5
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Klinik mikrobiyoloji* 9.baskı.1.cilt Ankara: Atlas Kitapçılık;2007:192–6.
- Mylotte JM, Tayara A. Blood culture: clinical aspects and controversies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19: 157–63.
- Obara H, Aikawa N, Hasegawa N, Hori S, Ikeda Y, Kobayashi Y. The role of a real-time PCR technology for rapid detection and identification of bacterial and fungal pathogens in whole-blood samples. *J Infect Chemother.* 2011;17:327–33
- Öztürk R. Sepsiste Antimikrobik Tedavi. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Güncel Bilgiler Işığında Sepsis Sempozyum Dizisi.* 2006;51:61 – 8.
- Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36S 2010; 6–16.
- Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E, et al. Diagnostic Performance of a Multiple Real-Time PCR Assay in Patients with Suspected Sepsis Hospitalized in an Internal Medicine Ward. *J Clin Microbiol.* 2012;50: 1285–88
- Paterson DL, Rice LB. Empirical antibiotic choice for the seriously ill patient: are minimization of selection of resistant organisms and maximization of individual outcome mutually exclusive? *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1006–12.
- Pirson M, Dramaix M, Struelens M, Riley TV, Leclercq P. Cost associated with hospital-acquired bacteraemia in a Belgian hospital. *J Host Infect.* 2005; 59(1): 33-40.



- Pittet DL, Li N, Woolson N, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: A 6-year validated, population-based model. *Clin Infect Dis* 1997; 24:1068-78.
- Sankar MJ, Agarwal R, Deorari AK, Paul VK. Sepsis in the newborn. *Indian J Pediatr*, 2008;75(3):261-6.
- Sevim Erol, Çelik İlhami, Karlıdağ E. Gülden Fırat Üniversitesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde Gelişen Nozokomiyal Sepsiste Mortalite İçin Risk Faktörleri. *Fırat Tıp Dergisi* 2011; 16(2): 71-7
- Serap Sevim, Şenay Öztürk, Ayten Coşkuner, Onur Özgenç, Meltem Avcı BACTEC kan kültür sistemi ile izole edilen mikroorganizmaların değerlendirilmesi *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2007; 21 (3): 135-140
- Sümerkan B. Nozokomiyal sepsis: etyoloji ve mikrobiyolojik tanısı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1998; 2: 182-187.
- Tabriz MS, Riederer K, Baran J Jr, Khatib R. Repeating blood cultures during hospital stay: practice pattern at a teaching hospital and a proposal for guidelines. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 624–7
- Trautner BW, Clarridge JE, Darouiche RO. Skin antiseptic kits containing alcohol and chlorhexidine gluconate or tincture of iodine are associated with low rates of blood culture contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002 Jul;23(7):397-401.
- Uzun Ö, Akalın HE, Hayran M, Ünal S. Factors influencing prognosis in gram- negative bacteraemia: Evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 866-73
- Ünver S, Atasoyu EM, Evrenkaya TR, Ardıç N, Özyurt M, Öncül O, M. Tülbek YM. Kateterle ilişkili bakteriyemide Vücut Florasının Önemi. *İnfeksiyon Derg* 2005; 19(1): 87-90.
- Vidaur L, Rodriguez A, Rello J. Antibiotic therapy for sepsis, severe sepsis, and septic shock: The “Tarragona” strategy. In Vincent JL (ed). *Year Book of Intensive Care and Emergency Medicine* 2004, Springer Verlag, Berlin, 229-41.
- Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB: The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997, 24:584-602.
- Weinstein MP: Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Microbiol* 2003, 41:2275-8.
- Westh H, Lisby G, Breyse F, Bøddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15: 544–51.

- Whang KT, Steinwald PM, White JC, Nysten ES, Snider RH, Simon GL, et al. Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* .1998; 83 (9): 3296-301.
- Willke A, Azak E. Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları: üç yıllık sonuçlar. *ANKEM Derg.* 2011; 25 (Ek1): 1.
- Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, Tsukasaki K, Kohno S, Seki M, et al. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Critical Care* 2010; 14:159
- Yurtsever SG, Baran N, Afşar İ, Yalçın MA, Kurultay N, Türker M. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere karşı duyarlılıkları. *Klimik Derg* 2006; 19: 56-9.
- Yüce P, Demirdağ K, Kalkan A, Özden M, Denk A, Kılıç SS. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg.*2005; 19: 17-21.
- Zarakolu P, Akova M. Sepsiste Antimikrobiyal Tedavi. *Yoğun Bakım Dergisi.* 2005;5(2):103-8.