

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**YALANCI POZİTİF ÜREME SİNYALİ VEREN
OTOMATİZE KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞELERİNDE
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) YÖNTEMİ İLE
BAKTERİ VE MANTAR VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Derya ÇÖLOĞLU
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zeynep Ceren KARAHAN**

**ANKARA
2012**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**YALANCI POZİTİF ÜREME SİNYALİ VEREN
OTOMATİZE KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞELERİNDE
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) YÖNTEMİ İLE
BAKTERİ VE MANTAR VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Derya ÇÖLOĞLU
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

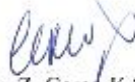
**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zeynep Ceren KARAHAN**

**ANKARA
2012**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

“Yalancı Pozitif Üreme Sinyali Veren Otomatize Kan Kültür Şişelerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi İle Bakteri ve Mantar Varlığının Araştırılması” başlıklı, Dr. Derya ÇÖLOĞLU'na ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/12/2012



Doç. Dr. Z. Ceren KARAHAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı



Doç. Dr. Fikret ŞAHİN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye



Doç. Dr. Ebru US
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince her konuda bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, desteği ve yardımları ile her zaman arkamda olduğumu hissettiğim değerli danışmanım Doç. Dr. Sayın Zeynep Ceren Karahan'a,

Eğitimimin her aşamasında deneyimleri ve bilgileri ile bana yol gösteren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine,

Örneklerin toplanmasında yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlu öğretim üyeleri Prof. Dr. Derya Aysev ve Uzm. Dr. Haluk Güriz ve çalışanlarına,

Tez çalışmam sırasında laboratuvar aşamasında yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Ergül ve Biolog Melike Bakır'a,

Birlikte uyum içinde çalışmaktan keyif aldığım Anabilim Dalı Asistanlarına ve Personeline,

Bu günlere gelmemde gösterdiği özveri, sabır, anlayış ve desteğinden dolayı anne, baba ve kardeşlerime, destek ve sabırları için sevgili eşim Serkan'a ve en değerli varlığım biricik oğlum Mert'e sonsuz teşekkürler...

Dr. Derya Çöloğlu

Ankara 2012

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vii
Şekiller ve Resimler Dizini	x
Tablolar Dizini	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Dolaşım Sistemi Enfeksiyonları	4
2.1.1. Tanımlar	4
2.2. Bakteriyemi Sınıflandırılması	6
2.2.1. Kaynak Yerine Göre Sınıflandırma	6
2.2.2. Etkene Göre Sınıflandırma	7
2.2.3. Kazanılma Yerine Göre Sınıflandırma	7
2.2.4. Süreye Göre Sınıflandırma	8
2.3. Sebepler (Etkenler)	9
2.3.1. Bakteriler	9
2.3.2. Mantarlar	9
2.3.3. Parazitler	10
2.3.4. Virüsler	10
2.4. Epidemiyoloji	10
2.5. Risk Faktörleri	11
2.6. Mikrobiyoloji	12
2.7. Patogenez	14
2.8. Dolaşım Sistemi Enfeksiyon Tipleri	15
2.8.1. İntravasküler Enfeksiyonlar	15
2.8.1.1. Enfektif Endokardit	15
2.8.1.2. Mikotik Anevrizma ve Süpüratif Tromboflebit	16
2.8.1.3. Kateter İlişkili Dolaşım Sistemi Enfeksiyonları	16
2.8.2. Eksravasküler Enfeksiyonlar	16

2.8.2.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları	17
2.8.2.2. Pnömoni	17
2.8.2.3. İntraabdominal Enfeksiyonlar	17
2.8.2.4. Cilt Enfeksiyonları	17
2.8.2.5. Kas-İskelet Enfeksiyonları	18
2.8.2.6. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları	18
2.9. Sepsis Klinik Belirti ve Bulgular	18
2.10. Bakteriyemi ve Sepsiste Tanı	19
2.10.1. Kan Kültürü Endikasyonları	21
2.10.2. Kan Kültürü Alım Tekniği	22
2.10.3. Kan Kültürü Sonuçlarını Etkileyen Teknik Değişkenler	24
2.10.3.1. Kan Kültürü Miktarı	24
2.10.3.2. Besiyeri	24
2.10.3.3. Kanın Sıvı Besiyerine Oranı	25
2.10.3.4. Antikoagülanlar	25
2.10.3.5. Antimikrobiyallerin Nötralizasyon ve İnaktivasyonu	26
2.10.3.6. İnkübasyon Atmosferi	26
2.10.3.7. Şişenin Çalkalanması	27
2.10.3.8. Pasajlar	27
2.10.3.9. İnkübasyon Süresi	28
2.10.4. Kan Kültürlerini Etkileyen Klinik Uygulamalar	28
2.10.4.1. Cilt Antisepsisi ve Kontaminasyonun Önlenmesi	28
2.10.4.2. Kültürü Yapılmış Kan Örneklerinin Sayısı	29
2.10.4.3. Kan Kültürlerinin Alınma Zamanı ve Kan Hacmi	31
2.10.5. Kan Kültürü Sistemleri	32
2.10.5.1. Manuel Sistemler	32
2.10.5.1.1. Septi-Chek Sistemi (BD Diagnostics, ABD)	33
2.10.5.1.2. Oxoid Signal (Remel Inc., İngiltere)	33
2.10.5.1.3. Isolator Kan Kültürü Sistemi (Lizis Santrifügasyon Sistemi) (Wampole laboratuvarları, ABD)	34
2.10.5.2. Sürekli Monitorize Otomatik Kan Kültür Sistemleri	35
2.10.5.2.1. BacT/Alert Sistemi (BioMerieux Inc, Fransa)	36

2.10.5.2.2. BACTEC 9000 (BD Diagnostics, ABD)	38
2.10.5.2.3. Versa-TREK (Trek Diagnostic System) (ESP Sistemi) (Thermo Scientific, ABD)	40
2.11. Dolaşım Sistemi Enfeksiyonlarının Hızlı Moleküler Tanısında Yeni Teknolojiler	42
2.11.1. 16S rRNA Gen Dizi Analizi	45
2.11.2. ITS Gen Dizi Analizi	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Gereçler	48
3.1.1. Kimyasal Madde ve Malzemeler	48
3.1.2. Araçlar	49
3.1.3. Tampon ve Çözeltiler	49
3.2. Yöntemler	50
3.2.1. Kan Kùltürleri	50
3.2.2. Kan Kùltür Şişelerinden DNA Ekstraksiyonu	51
3.2.3. PZR Protokolü	52
3.2.3.1. Örneklerin hazırlanması	52
3.2.3.2. Primerlerin Seçilmesi	52
3.2.3.3. PZR Amplifikasyonu	52
3.2.3.4. PZR Ürünlerinin Değerlendirilmesi	55
3.2.4. PZR Ürünlerinin Sekans Analizi İçin Temizlenmesi	55
3.2.5. DNA Dizi Analizi	56
3.2.5.1. Sekanslama Döngüsü	56
3.2.5.2. Ürünlerin Temizlenmesi ve Sekans Cihazına Yùklenmesi	56
3.2.5.3. Sekans Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	57
4. BULGULAR	58
5. TARTIşMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
ÖZET	71
<i>SUMMARY</i>	72
KAYNAKLAR	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AİDS	“Acquired Immune Deficiency Syndrome”
ATCC	“American Type Culture Collection”
bç	Baz çifti
BSA	Bovin serum albümin
β	Beta
β 1-C	Beta 1 C
C	Sitozin
KOB/ml	Koloni oluşturan birim/mililitre
CRP	C reaktif protein
dH₂O	Distile su
ddH₂O	Çift distile su
DİK	Disemine intravasküler koagülasyon
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
GSBL	Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
g	Gram
G	Guanin
HIV	“Human Immunodeficiency Virüs”
ITS	“Internal Transcribed Spacer”
İL-1	İnterlökin-1
İL-6	İnterlökin-6
KCl	Potasyum klorür
LPS	Lipopolisakkarit
M	Moleküler büyüklük belirteci

MALDI-TOF MS “Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight, Mass Spectrometry”; Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi

MgCl₂	Magnezyum klorür
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
mm³	Milimetreküp
mmHg	Milimetre civa
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NaOH	Sodyum hidroksit
Nasitrat	Sodyumsitrat
ng	Nanogram
PaCO₂	Parsiyel karbondioksit basıncı
pmol	pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RES	Retiküloendotelial sistem
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SIRS	Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu
SLS	Yükleme solüsyonu
SPRI	Solid Phase Reversible Immobilization
SPS	“Sodyum polyanetholsulfonate”
T	Timin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris EDTA
TNF	Tümör nekroz faktörü
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tris HCl	Tris hidroklorik asit
UV	Ultraviyole

° C

Santigrat derece

VRE

Vankomisin dirençli enterokok

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

- Resim 2.1** Kan kültür alınma tekniği
- Resim 2.2** Septi-Chek sistemi iki fazlı kan kültür Şişeleri
- Resim 2.3** Oxoid Signal kan kültür Şişe rneği
- Resim 2.4** Isolator kan kültür sistemi
- Resim 2.5** BacT/Alert 3D kan kültür sistemi
- Resim 2.6** BacT/Alert kan kültür plastik Şişeleri
- Resim 2.7** BACTEC kan kültür sistemi
- Resim 2.8** BACTEC kan kültür Şişeleri
- Resim 2.9** Versa-TREK kan kültür sistemi
- Resim 2.10** Versa-Trek kan kültür Şişeleri
- Resim 4.1** niversel bakteriyel 16S rRNA gen bölgesi için yapılan PZR fotoğrafı
- Resim 4.2** Fungal ITS gen bölgesi için yapılan PZR fotoğrafı
- Resim 4.3** DNA dizi analizi elektroferogram görüntüsü

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Ticari olarak mevcut sürekli monitörize kan kültür sistemlerinin özellikleri

Tablo 3.1 PZR’de kullanılan primerler

Tablo 5.1 Çeşitli çalışmalarda konvansiyonel yöntemler ile moleküler yöntemlerin mikroorganizma tespit etme oranları

1. GİRİŞ

Bakteriyemi, viremi ve fungemi sırasıyla, bakteri, virüs ve mantarların dolaşım sisteminde bulunmasıdır (Reimer ve ark., 1997; Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007). Sepsis, birçok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden öldürücü bir enfeksiyon hastalığıdır (Doğanay, 1996; Carvalho ve Trotta, 2003; Urgancı ve Sayek, 2005).

Dolaşım sistemi enfeksiyonları, antimikrobiyal ve destekleyici tedavilere rağmen morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri olmaya devam etmektedir. Bu nedenle dolaşım sistemi enfeksiyonlarının erken tanısı ve uygun tedavi edilmesi klinik açıdan önemlidir. Kan kültürleri, şüpheli enfeksiyon vakalarında mikrobiyal etiyojolojiyi tanımlar ve tedavinin yönlendirilmesinde rol oynar (Mylotte ve Tayara, 2000; Tabriz ve ark., 2004; Gonsalves ve ark., 2009).

Toplumda ileri yaş grubunun artması, kronik hastalığı olanların yaşam sürelerinin uzaması, bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçların kullanımının yaygınlaşması ve teşhis ve tedavi amacı ile uygulanan invaziv girişimlerdeki artış, sepsis görülme sıklığını artıran faktörlerdendir. Yatak kapasitesi fazla olan, yoğun bakım birimleri bulunan ve invaziv işlemlerin sık yapıldığı hastanelerde hastane kaynaklı sepsis daha fazla görülmektedir (Doğanay, 1998).

Bakteriyemi ve fungemi tespitinde kan kültürü altın standart olmaya devam etmektedir. Son yıllarda birçok gelişme ile kan kültürlerinde patojen tespit oranı arttırılmıştır. Bunlar; yeni sıvı besiyerlerinin geliştirilmesi, besiyerlerine büyüme faktörlerinin ilave edilmesi ve büyüme inhibitörleri/metabolik ürünler/antibiyotik kalıntılarının nötralizasyonudur. Otomatize kan kültür cihazları, besiyerinde üreyen mikroorganizmaların oluşturduğu karbondioksidi floresan ya da kolorimetrik sensörler ile ölçmektedir. Kan kültürü pozitifliği için ortalama tespit süresi hâlâ ortalama 15 saattir (2,6-127 saat) (Jansen ve ark., 2000; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010; Venkatesh ve ark., 2010).

Dolaşım sistemi enfeksiyonlarında kan kültürü pozitifliği, kültürü yapılabilen mikroorganizmalarla sınırlıdır. Konvansiyonel kan kültürlerinin değeri, yavaş ya da zor üreyen (rn; *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Mycoplasma* spp., çeşitli küfler ve *Nocardia* spp.) veya kültürü yapılamayan (rn; *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*) mikroorganizmalar için sınırlıdır. Yöntemin duyarlılığı antibiyotik tedavisi alanlarda, bakteriyel ve mantar yükü düşük olduğunda azalır. Cilt florası nedeni ile yalancı pozitiflik oluşabilir. Yalancı pozitiflik oranı kullanılan besiyeri ve cihaza göre değişmekle birlikte %1,4-6,2 arasındadır (Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010; Tsalik ve ark., 2010). Sonuçların geç çıkması ve yalancı negatif sonuçlar dolaşım sistemi enfeksiyonlarının tanısında kan kültürünün ideal test olmasını engellemektedir. Sonuç olarak daha hızlı, duyarlı ve özgül testlerin geliştirilmesine çalışılmıştır (Klouche ve Schröder, 2008; Ecker ve ark., 2010).

Yalancı pozitif kan kültürleri, sonuçları yorumlamada hatalara yol açmakta, bunun sonucunda da uygunsuz antibiyotik kullanımına, ilave laboratuvar testleri uygulanmasına, hastanede kalış süresinin uzamasına ve tetkik ve tedavi maliyetlerinin artışına neden olmaktadır (Trautner ve ark., 2002, Previsdomini ve ark., 2012).

Dolaşım sistemi enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların yelpazesi oldukça geniştir. *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *Escherichia coli*, diğer *Enterobacteriaceae* ailesi yeleri, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* en sık enfeksiyon etkenleridir (Weinstein ve ark., 1997; Zhao ve ark., 2009; Pien ve ark., 2010).

Kan kültürleri yavaş sonuç veren, aşırı emek isteyen ve gerçekten sepsis olan vakaların %30-50'sinde negatif sonuç veren testlerdir (Previsdomini ve ark., 2012).

Klinik alışmalar moleküler yöntemlerle bakteriyemi tespitiinin zaman ve duyarlılık açısından yarar sağladığını ortaya koymaktadır (Klouche ve Schröder 2008; Gaibani ve ark., 2009; Ecker ve ark.,2010; Mancini ve ark., 2010).

Moleküler yöntemler patojenleri tür düzeyinde identifiye eder (Hansen ve ark., 2009). Moleküler analizlerde otomasyon, hız ve verimliliği artırır, kontaminasyon kontrolünü sağlar ve emek ihtiyacını azaltır. Yeni moleküler teknikler yeni patojenlerin bulunmasını sağlayabilir (Tsalik ve ark., 2010).

Bu çalışmada, BACTEC otomatize kan kültür cihazında (BD Diagnostics, ABD) üreme sinyali veren ancak rutin mikrobiyolojik inceleme sonucunda üreme görülmeyen (yalancı pozitif) kan kültür şişelerinde, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve DNA dizi analizi yöntemleri ile bakteri ve mantar varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dolaşım Sistemi Enfeksiyonları

Birçok bakteri, virüs, mantar ve parazit, enfeksiyon seyri sırasında dolaşımında bulunabilir. Mikroorganizmalar dolaşımında sürekli, aralıklı ya da geçici olarak bulunabilir ve vücuttaki tüm organları tehdit edebilir. Dolaşım sisteminin mikroorganizmalarca invazyonu enfeksiyon hastalıklarında önemli bir yeri teşkil eder. Dolaşım sisteminin mikrobiyal invazyonu şok, çoklu organ yetmezliği, yaygın damar içi pıhtılaşma (Dissemine intravasküler koagülasyon, DİK) ve ölüm gibi ciddi sonuçlar ile sonuçlanabilir (Mancini ve ark., 2010). Her yıl yaklaşık 200.000 bakteriyemi ve fungemi vakası tespit edilmekte olup, bunların mortalite oranı %35-60'dır. Bu nedenle, etken patojenlerin erken tespiti ve identifikasyonu mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevlerinden biridir. Kan kültürleri özgül etiyolojik teşhis için altın standarttır (Forbes ve ark., 2007; Riedel ve ark., 2008).

Laboratuvarlar tarafından kandan mikroorganizmaların tespit edilebilmesi bazı faktörlere bağlıdır. Bunlar; bakteriyemi tipi, örnek toplama yöntemleri, alınan kan hacmi, kan kültürlerinin alınma zamanı ve sayısı, sonuçların yorumu ve hasta popülasyonunun tipidir (Çiçek ve ark., 2005; Hall ve Lyman, 2006; Forbes ve ark., 2007; Riedel ve ark., 2008; Patel ve ark., 2011).

2.1.1. Tanımlar

Enfeksiyon: Patojen mikroorganizmaların, konak dokularında bulunması veya dokulara invazyonu sonucu gelişen inflamatuvar cevaptır.

Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu (SIRS): Enfeksiyona ve enfeksiyon dışı nedenlere (pankreatit, yanık, multiple travma ve doku yaralanmaları, iskemi, hemorajik şok, immünolojik nedenli doku hasarları, vb.) bağlı gelişen, ağır klinik durumlara vücudun oluşturduğu inflamatuvar bir yanıttır. SIRS tanısı için aşağıdaki kriterlerin en az ikisinin bulunması gerekir:

- 1.Vücut ısısı (oral) : >38 °C veya <36 °C
- 2.Kalp hızı : >90/dk
- 3.Solunum sayısı : >20/dk veya PaCO₂: <32mmHg
- 4.Lökosit sayısı : >12000/mm³ veya <4000/mm³, periferik yaymada çomak formunun >%10 olması.

Sepsis: Sepsis, birçok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden, şok geliştiği takdirde mortalitesi yüksek olan bir enfeksiyon hastalığıdır (Doğanay, 1996; Carvalho ve Trotta, 2003; Urgancı ve Sayek, 2005; Mancini ve ark., 2010). Enfeksiyona verilen sistemik inflamatuvar yanıttır. Enfeksiyon sonucu SIRS bulgularının iki veya daha fazlasının bulunmasıdır. (Doğanay, 1996).

Ağır sepsis: Sepsis ile beraber organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon (laktik asidoz, oligüri, mental durum değişikliği) veya hipotansiyonun bulunmasıdır.

Septik şok: Sepsiste, yeterli sıvı tedavisine rağmen, hipotansiyon ve perfüzyon bozukluğu belirtilerinin devam etmesidir.

Sepsise bağlı hipotansiyon: Sepsiste sistolik kan basıncının 90 mmHg'nın altına düşmesi veya diğer nedenler olmaksızın, bilinen sistolik kan basıncının 40 mmHg'dan daha fazla düşmesidir.

Çoklu organ yetmezliği sendromu: Birden çok organda bakteriyemi sonucu gelişen yetmezlik durumudur.

Bakteriyemi, viremi, fungemi: Dolaşım sisteminde sırasıyla bakteri, virüs ve mantarların bulunmasıdır (Reimer ve ark., 1997; Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007). Dolaşım sisteminde bu organizmaların dolaşması semptomlar verebilir; ya da vermeyebilir. Eğer hastada herhangi bir belirti yoksa bu “sessiz” ya da “subklinik” olarak isimlendirilir. Buna karşın sepsis (septisemi) denilen ateş, titreme, kırıklık, taşikardi, hiperventilasyon ve toksisite ya da bitkinlik ile karakterize bir

durum görülebilir. Semptomlar mikrobiyal toksin ve/veya inflamatuvar hücrelerin ürettiği sitokinlerin salınımına bağlıdır. Hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler sepsise neden olabilir (Koneman ve ark., 2006). Bakteriyemi çoğu kez hastanede yatış, invaziv girişimler ya da çeşitli müdahaleler ile ilişkilidir (Trevino ve Ross, 2007). Fakat bakteriyemilerin üçte birinde organizma kaynağı belirlenemeyebilir (Koneman ve ark., 2006).

Bakteriyemi genellikle sistemik fizyolojik cevap ile sonuçlanır. Bu cevaplar; sepsis (enfeksiyona sistemik cevap), ciddi sepsis (sepsise eşlik eden organ fonksiyon bozukluğu, hipotansiyon ya da doku hipoperfüzyonu) ve septik şok (sepsise eşlik eden inatçı hipotansiyon) gibi durumlardır. Ölüm riski bu sıralama ile gittikçe artar (Trevino ve Ross, 2007). Septik hastaların %70'inden fazlasında enfeksiyonun kesin klinik belirtilerine rağmen kan kültürleri negatif olabilir (Trevino ve Ross, 2007; Previsdomini ve ark., 2012).

2.2. Bakteriyemi Sınıflandırılması

2.2.1. Kaynaklandığı Yere Göre Sınıflandırma

Kaynaklandığı yere göre bakteriyemiler “primer” ve “sekonder” olarak sınıflandırılır.

Primer bakteriyemi, enfekte kalp kapakları ya da intravenöz kateter gibi endovasküler bir kaynaktan ortaya çıkarken; sekonder bakteriyemi, pnömonisi olan bir hastanın akciğer gibi ekstrasvasküler kaynaklı enfeksiyondan ortaya çıkar (Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007; Paolucci ve ark., 2010).

Bilinmeyen orjinli bakteriyemiler primer ve sekonder bakteriyemiye göre daha kötü prognoz gösterirler (Erbay ve ark., 2003; Trevino ve Ross, 2007).

2.2.2. Etkene Göre Sınıflandırma

Bakteriyemi kan dolaşımına invaze olan spesifik patojen ya da genel mikroorganizmalara göre sınıflandırılabilir. Gram pozitif bakteriyemi *S. pneumoniae*, *S. aureus* ya da *Enterococcus faecium* gibi organizmalar ile oluşurken, gram negatif bakteriyemi *E. coli* ya da *P. aeruginosa* gibi bakteriler ile oluşur. Anaerobik bakteriyemide etken sıklıkla *Bacteriodes fragilis* iken, polimikrobiyal bakteriyemi birden fazla organizma ile oluşur. Bakteriyemilerin bu şekilde sınıflandırılması, bakteriyeminin kökeni için ipucu sağlayabilir ve organizmalar çoğalmadan önce bile tedaviye yol gösterebilir. Örneğin hastanede yatan hastalarda KNS bakteriyemisi sıklıkla kalıcı vasküler alet ile ilişkilidir. Enterokoklar ve gram negatif bakterilerle oluşan polimikrobiyal bakteriyemi ise sıklıkla bağırsak perforasyonu ile gastrointestinal floranın kan dolaşımına geçmesi sonucu oluşur (Trevino ve Ross, 2007). Son yıllarda anaerobik izolat sayısı azalırken mantar ve KNS sayısı artmaktadır (Weinstein ve ark., 1997; Cockerill ve ark., 2004; Koneman ve ark., 2006).

2.2.3. Kazanılma Yerine Göre Sınıflandırma

Toplum kaynaklı bakteriyemi, toplumda yaşayan bireylerde oluşurken; hastane kaynaklı bakteriyemi hastanede yatan ya da huzurevi gibi devamlı bakım merkezlerinde yaşayan hastalarda oluşur (Siegman-Igra ve ark., 2002; Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007). Hastane kaynaklı bakteriyemi, hastaneye kabulden en az 72 saat sonra bakteriyeminin oluşması olarak tanımlanmaktadır (Doğanay, 1998; Siegman-Igra ve ark., 2002; Trevino ve Ross, 2007). Bazı bakteriyemiler genellikle toplum kaynaklıdır. Örneğin *S. pneumoniae* bakteriyemilerinin %90'dan fazlası toplum kaynaklıdır. *P. aeruginosa* ya da enterokok türleri gibi sıklıkla özel direnç mekanizmaları ile çoklu antimikrobijale karşı direnç gösteren mikroorganizmaların neden olduğu bakteriyemi ise büyük olasılıkla hastane kaynaklıdır (Siegman- Igra ve ark., 2002; Trevino ve Ross, 2007).

2.2.4. Süreye Göre Sınıflandırma

Bakteriyemik olay süresine göre bakteriyemi; geçici, aralıklı ya da sürekli olabilir (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Trevino ve Ross, 2007; Steifert, 2009; Mancini ve ark., 2010). Toplanan kan kültürlerinin sıklığı, alım zamanı ve sayısı hastanın bakteriyemi tipine bağlı olarak sonuç verebilir ya da vermeyebilir (Trevino ve Ross, 2007).

Geçici bakteriyemi, kendiliğinden oluşabileceği gibi, normal flora ile kolonize olan ağız, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistem gibi bazı vücut bölgelerine müdahale sonucu da oluşabilir (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Trevino ve Ross, 2007; Steifert, 2009; Mancini ve ark., 2010). Enfekte dokulara müdahale, kontamine mukozal yüzeyler ile ilgili işlemler ve nonsteril yerler ile ilgili ameliyatlara bu duruma neden olabilir (Forbes ve ark., 2007; Steifert, 2009). Geçici bakteriyemi dental, kolonoskopik ya da sistoskopik işlemlerden kısa süre sonra oluşabilir (Trevino ve Ross, 2007; Mancini ve ark., 2010).

Aralıklı bakteriyemi, bakterinin enfekte alandan belirli aralıklarla kana salınması ile oluşur (Koneman ve ark., 2006). Bazı bölgelerde abse varlığında görülebileceği gibi meningokoksemi ve gonokoksemi gibi kesin enfeksiyon türlerinin de klinik göstergesidir (Trevino ve Ross, 2007; Steifert, 2009; Mancini ve ark., 2010). Menenjit, pnömoni, piyojenik artrit ve osteomyelitte neden olan etkenler enfeksiyonun erken döneminde kandan izole edilebilirler (Forbes ve ark., 2007; Steifert, 2009; Mancini ve ark., 2010).

Sürekli bakteriyemi, organizmalar intravasküler kaynaktan geldiği zaman ya da dolaşımında yoğun olarak bulunduğu zaman oluşur (Trevino ve Ross, 2007; Steifert, 2009; Mancini ve ark., 2010). Septik şok, bakteriyel endokardit ve diğer endovasküler enfeksiyonlarda organizmalar kan akımında sürekli bulunurlar (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Mancini ve ark., 2010). Her ne kadar enfekte intravenöz kateter ya da septik trombus gibi endovasküler kaynaklar sürekli bakteriyemi ile sonuçlansa da en yaygın sürekli bakteriyemi ile sonuçlanan klinik

tablo enfektif endokardittir (Trevino ve Ross, 2007). Ayrıca özgül enfeksiyonların erken evreleri boyunca (tifoidal ateş, brusellozis ve leptospirozis) bakteriler kan akımında sürekli bulunurlar (Forbes ve ark., 2007).

2.3. Sebepler (Etkenler)

2.3.1. Bakteriler

Kandan en sık izole edilen bakteriler koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *S. aureus* ve *Enterococcus* türlerini de içeren gram pozitif koklardır. Son on yılda mantar türleri ve KNS sayısı artarken klinik olarak belirgin anaerobik izolat sayısı azalmıştır (Weinstein ve ark., 1997; Cockerill ve ark., 2004).

Kandan bakteriyel türlerin izolasyonu, daha önceden bulunan, gizli ya da teşhis edilmemiş tümörlerin varlığını gösterebilir. Neoplastik hastalıklarla ilişkili olan organizmalar *Clostridium septicum* ve diğer *Clostridium* türleri, *Streptococcus bovis*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* ve *Campylobacter* spp.'dir. *Streptococcus anginosus* grubu bakteriler kandan izole edilirse abse varlığını gözönünde bulundurulmalıdır (Beebe ve Koneman, 1995; Forbes ve ark., 2007).

2.3.2. Mantarlar

Fungemi genellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda görülür ve ciddi bir klinik tablodur. *Candida* türleri hastane kaynaklı kan enfeksiyonlarının %8-10'undan izole edilir. *C. albicans* en sık izole edilen türdür. *Malessezia furfur*, yeni doğanlardan ve lipit takviyeli parenteral nutrisyon alan hastalardan izole edilir (Plaller ve Diekema, 2004). Lökositler içinde üreyen *Histoplasma capsulatum* hariç mantarlar kan hücrelerini istila etmezler, fakat kanda bulunmaları vücutta herhangi bir yerde enfeksiyon odağı bulunduğunu gösterir. Kanda bulunan mantarlar konağın tüm organlarına yayılabilir. Çoğaldıkları yerde normal dokuları istila eder ve toksik ürünler üretirler. Mantarların kan dolaşımına giriş yerleri, gastrointestinal sistem ya da mukoza bütünlüğü bozulan diğer sistemler, hasarlı cilt, primer enfeksiyon

odakları, akciğerler, diğer organlar ve intravasküler kateterlerdir (Forbes ve ark., 2007).

2.3.3. Parazitler

Parazitler diğer doku ve organlara göç ederken geçici olarak kan akımında bulunabilirler ve kanda bulunmaları sırasında hastada klinik belirtilere neden olabilirler. Örneğin *Toxoplasma gondii* takizoidleri kanda bulunabilir, *Dipetalonema*, *Mansonella*, *Loa Loa*, *Wuchereria* ve *Brugia* ile enfeksiyon sırasında periferik kanda mikroflaryalar görülebilir. Malaryal parazitler konak eritrositleri ve hepatik parankimal hücreleri istila eder. Etkene karşı konağın immün yanıtı da zararlı etkiler yaratabilir (Forbes ve ark., 2007).

2.3.4. Virüsler

Bazı virüsler, hastalığın belli evrelerinde kanda dolaşabilirler. Bu virüslerden kan hücrelerini enfekte edenler Epstein Barr Virüs (EBV) (lenfositleri istila eder), Cytomegalovirüs (CMV) (monosit, polimorfonükleer hücreler ve lenfositleri istila eder), Human Immunodeficiency Virüs (HIV) (kesin T lenfosit ve belki makrofajları kuşatır) ve diğer human retrovirüsler (lenfositlere saldırır)'dir. (Forbes ve ark., 2007).

2.4. Epidemiyoloji

Bacillus pyocyoneus (şimdiki adı *P. aeruginosa*) ile oluşan ilk bakteriyemi vakası Brill tarafından 1899 yılında raporlanmıştır. On yıl sonra 40'dan daha az vaka, takip eden beş yıl boyunca 30'dan daha az vaka bu sayıya ilave olmuştur. 1950-2003 yılları arasında septiseminin mortalite oranı yaklaşık 40 kat artarak ölüm nedenleri arasında 10. sıraya tırmanmıştır (Trevino ve Ross, 2007).

Sepsis ve septik şok insidansı her yıl artmakta ve yılda 200.000'den fazla ölüme neden olmaktadır. ABD'de her yıl yaklaşık 250.000 dolaşım sistemi enfeksiyonu

bildirilmektedir (Flayhart ve ark., 2007). Bu sayı miyokard enfarktüsü, inme ya da kanser ölümlerinden fazladır. Bakteriyemik hastalarda septik şok insidansı etkenin patojenitesi, bakteriyemi kaynağı, konağın bağışıklık sisteminin baskılanma durumu ve eşlik eden hastalık varlığına bağlı olarak %10-30 oranında değişmektedir. Bakteriyemide şok olmaksızın mortalite, bakteriyemi kaynağına göre %10-20 arasındadır. Bakteriyeminin seyrini etkileyen faktörler; 70'den ileri yaş, polimikrobiyal etiyojoloji, hastada kanser, AIDS, renal yetmezlik varlığı, respiratuvar sistem ya da bağırsak kaynaklı bakteriyemi, kaynağın belirlenememesi ve uygunsuz antimikrobiyal tedavidir (Trevino ve Ross, 2007).

2.5. Risk Faktörleri

Artmış bakteriyemi insidans nedenleri; seçilmiş hasta popülasyonunda azalmış immün yeterlilik, invaziv prosedür uygulamaları, hasta yaşı, ilaç tedavi yöntemleri olarak sıralanabilir (Forbes ve ark., 2007; Trevino ve Ross, 2007).

Bakteriyemi, özellikle hematolojik malignansisi olan, bağışıklığı baskılayıcı kemoterapi alan ve kemik iliği transplantasyonu geçiren hastalarda siktir. Bunun nedeni, azalmış nötrofil sirkülasyonu, kemoterapiye bağlı gastrointestinal mukoza özelliğinde bozulma ve takiben normal floranın kan dolaşımına invazyonudur. Diabet, siroz vb. kronik hastalığı olan kişiler ile bağışıklığı baskılayıcı tedavi alanlar (romatoid artrit glukokortikoid alımı gibi) da bakteriyemi gelişimi açısından artmış risk altındadır (Erbay ve ark., 2003; Çiçek ve ark., 2005; Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007).

Kalıcı alet, respiratör ve invaziv teşhis prosedürlerinin artmış kullanımı bakteriyemi oluşumunda rol oynayabilir (Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007).

Üriner, gastrointestinal ve biliyer sistem ameliyatları yerleşik floranın yayılımını engellemekle görevli olan mukozal bariyerlerin bozulmasından dolayı bakteriyemi ile sonuçlanabilir (Trevino ve Ross, 2007; Rebelo ve ark., 2011).

Bakteriyemi insidans oranları bimodal dağılım gösterir. Çocuk yaş grubunda bakteriyemi oranının artması humoral immunitedeki defektlere bağlıdır. Oysa yaşlı populasyonunda diyabet gibi eşlik eden bir durumda, immun durumdaki azalma ile bakteriyemi oluşmaktadır. Sonuç olarak ilerlemiş yaş hem bakteriyemi hem de mortalite için bir risk faktörüdür (Trevino ve Ross, 2007; Rebelo ve ark., 2011).

Geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi normal florayı baskılar ve kolonizasyona yardım eder. Böylece dirençli bakteriler ile invazyon olur (Trevino ve Ross, 2007). Steroidler ve antikanser kemoterapötikler gibi bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçlar hastalar için bakteriyemi açısından risklidir (Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007; Rebelo ve ark., 2011).

2.6. Mikrobiyoloji

Son 25 yıldır bakteriyemiden sorumlu organizma profilleri değişmiştir. 1960-1970'de *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi gram negatif organizmalar bakteriyemide en sık izole edilen etkenler iken; 1980-1990'da çoğu bakteriyemi *S. aureus*, KNS ve *Enterococcus* türleri gibi gram pozitif organizmalar ile oluşmaya başlamıştır. Son yıllarda kan dolaşımının bakteriyel invazyonuna ilaveten, vakalarda *C. albicans* gibi fungal etkenlerin önemleri giderek artmaktadır. Bu mikrobiyolojik değişiklik muhtemelen hastaların sahip olduğu risk faktörlerine bağlıdır. Duyarlı hasta profilinin değişmesi ile bakteriyemiden sorumlu organizmalar da değişmiştir. MRSA bakteriyemisi 1970'lerde nadir görülürken, günümüzde bakteriyemi gelişen hastaların %40'ından fazlasının etkenidir (Karchmer, 2000; Kuehnert ve ark., 2005; Hadler ve ark., 2012). Vankomisine dirençli enterokok (VRE) ve genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) sentezleyen gram negatif bakteriler daha sık izole edilmektedir (Karchmer, 2000; Tacconelli ve ark., 2004; Chen ve Hsueh, 2012).

Toplumdan edinilmiş sepsiste sık karşılaşılan etkenler streptokoklar, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* iken, hastaneden edinilmiş sepsiste karşılaşılan etkenler sıklıkla *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*, *S. aureus* ve enterokoklardır (Weinstein ve ark., 1997; Erbay ve ark., 2003).

İmmünizasyon uygulanarak enfeksiyon oluşturma riski azaltılan bazı organizmalar da daha nadir bakteriyemi nedenleri arasına girmiştir. Mesela, daha önceden çocuklarda bakteriyemi ve sepsisin major nedeni olan *H. influenza b* ve *S. pneumoniae* ile oluşan enfeksiyonların insidansı, aşı kullanımı ile %95 azalmıştır (Hall ve Lyman, 2006; Trevino ve Ross, 2007).

Bakteriyemi mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar polimikrobiyal enfeksiyonların insidansının arttığını göstermektedir. 1930'larda hemen hemen tüm bakteriyemi vakaları tek bir organizma ile oluşurken 1990'ın başlarında bakteriyemi vakalarının yaklaşık %10'unun birden fazla mikroorganizma içerdiği bildirilmiştir (Hall ve Lyman, 2006). Polimikrobiyal bakteriyeminin mortalitesi monomikrobiyal bakteriyemiye göre daha yüksektir. Polimikrobiyal bakteriyemi için predispozan faktörler, intravenöz ilaç kullanımı, yanık ve gastrointestinal sistem kaynaklı faktörlerdir. Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda, alkolizm, granülositopeni, geniş yanıklar, diyabet, kronik renal yetmezlik ve iskemiye neden olan vasküler yetersizlik gibi durumlarda risk artmaktadır. Polimikrobiyal enfeksiyonların çoğunda *B. fragilis* izole edilmektedir. Bazı antimikrobiyallere *B. fragilis*'in doğal olarak dirençli oluşu bakteriyemi mortalitesinin artışı açısından bir risktir.

Mikrobiyologların önemli mücadelelerinden biri de bağışıklığı baskılanmış hastaların kan kültürlerinin işlemleridir. AIDS'li hastalarda kandan izole edilen önemli patojen türler mikobakteriler, *Bartonella henselae*, *Corynebacterium jeikeium*, *Shigella flexneri*, nadir *Salmonella* türleri, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* ve *Cytomegalovirüs*'tür (Adeyemi ve ark., 2010; Varma ve ark., 2010; Crump ve ark., 2011). Bağışıklığı sağlam konakta sıklıkla kontaminan olarak değerlendirilen *Corynebacterium jeikeium* bağışıklığı baskılanmış hastalarda bakteriyemi sebebidir (Forbes ve ark., 2007; Ifantidou ve ark., 2010).

2.7. Patogenez

Bakteriyemi patogenezi, enfekte olan patojenin giriş yeri ve hastanın bağışıklık sisteminin durumuna bağlıdır. Bakteriyemi genellikle normal cilt ya da mukozal bariyerin bozulması ve kan dolaşımına bakteriyel invazyon ile oluşmaktadır. Bu bozulma travma, yanık ya da iskemi nedeni ile derideki çatlak artışı, viral enfeksiyon vb. ile epitelyal hattın bozulması ya da ameliyat, enstrumentasyon ya da kalıcı alet yerleştirme gibi iyatrojenik bir durumla oluşabilir. Diğer bir neden de fokal bakteriyel enfeksiyon sırasında oluşan lokal inflamasyon, ödem ve doku yıkımı ile etraftaki vasküler yapıların bozulması ve kan dolaşımını invazyonu ile bakteriyemi gelişmesidir.

Bakteriyemi gelişimini takiben hastanın bağışıklık sistemi antikorlar aracılığı ile enfeksiyonu kontrol altına almaya çalışır. Antikorlar mikroorganizmaları opsonize eder ve fagositler ile beraber kompleman aracılı öldürmeyi tetikler. Bunlara ek olarak lenfatikler, böbrekler ve dalaktaki geniş vasküler yataklardaki süzme mekanizmaları organizmaları tutabilir. Eğer bu savunma mekanizmaları başarısız olursa iki ana komplikasyon olan metastatik enfeksiyon ve/veya septik şok oluşur. Kan dolaşımının invazyonu organizmaların bütün vücuda yayılması ile sonuçlanabilir. Örneğin, *S. pneumoniae* bakteriyemisi meninks enfeksiyonu ile pnömokok menenjitine neden olabilir. *S. aureus* bakteriyemisi metastatik enfeksiyon ya da abse gelişimine, endokardit, osteomyelit, septik artrit, hepatik abse ya da piyomyozite neden olabilir (Cosgrove ve ark., 2003; Karchmer ve Bayer, 2008).

Sepsis ve septik şok bakteriyeminin diğer bir olası sonucudur. Gram negatif bakteriler gram pozitif bakterilere göre daha sık septik şoka neden olsa da her iki grubun da sepsis, ciddi sepsis, septik şok ve ölüm riskleri benzerdir. Her iki durumda da bakteriyel membran komponentlerinin (gram negatif organizmalarda membran lipopolisakkaritleri [LPS], gram pozitif organizmalarda lipoteikoik asit ve peptidoglikan) makrofajlarla etkileşimi, TNF, İL-1, İL-6 ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olur. Sonuçta endotelyal aktivasyon; vasküler permeabilite, kan akımı ve nötrofil göçünde artış gerçekleşir. Bu cevaplar

enfeksiyonun kontrolünü sağlar ve antiinflamatuvar medyatörler yıkıcı sistemik inflamatuvar reaksiyonu önler. Sepsis ve septik şokta bu regülasyonda ortaya çıkan dengesizlik, mikrovasküler anormallik ve endotel hasarına neden olur. Sırasıyla, azalmış doku perfüzyonu, komplemen aktivasyonu ve çoklu organ yetmezliği gelişir ve septik şok ve ölümlerle sonuçlanan yaygın damar içi pıhtılaşması (DİK) gözlenir (Trevino ve Ross, 2007).

2.8. Dolaşım Sistemi Enfeksiyonu Tipleri

En sık bakteriyemi ve sepsis gelişimine neden olan odaklar, enfekte intravenöz kateterler, üriner sistem, akciğer ve gastrointestinal sistemdir (Trevino ve Ross, 2007). Dolaşım sistemi enfeksiyonları iki ana kategori altında incelenir:

- İnvasküler (Kardiyovasküler sistemden köken alır)
- Eksravasküler (Diğer enfeksiyon bölgelerinden lenfatik sistem ile kan dolaşımına geçen bakteriler ile oluşur) (Forbes ve ark., 2007; Akalın, 2007).

2.8.1. İnvasküler Enfeksiyonlar

İnvasküler enfeksiyonlar, enfektif endokardit, mikotik anevrizma, süpüratif tromboflebit ve invasküler kateter ilişkili bakteriyemileri kapsar. Bu enfeksiyonlarda vasküler sistem içinde organizmalar kan akımında sürekli bulunurlar (Forbes ve ark., 2007; Mancini ve ark., 2010).

2.8.1.1. Enfektif Endokardit

Endokardit ile ilişkili organizmalar yaygın olarak viridans streptokok, *S. aureus* ve protez kalp kapaklarında KNS'dir (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Trevino ve Ross, 2007). *Streptococcus sanguis* ve *Streptococcus mutans* en sık izole edilen streptokokal endokardit nedenleridir (Forbes ve ark., 2007). Artan oranda invasküler kateter kullanımı sonucu vasküler protezler ile *S. epidermidis* ve diğer KNS'ler deriden kan akımına ulaşır ve kalp kapağı ve vasküler endotelyumda çoğalırlar (Forbes ve ark., 2007). Semptomları olan bazı vakalarda etyolojik ajanı

elde etmek zor ya da mümkün değildir (kültür negatif endokardit). *Chlamydia pneumoniae*, *Coxiella burneti* ve *Bartonella* türleri gibi bazı mikroorganizmaların geleneksel kan kültür teknikleri ile elde edilememesi bunun nedeni olabilir (Gdoura ve ark., 2002; Koneman ve ark., 2006).

2.8.1.2. Mikotik Anevrizma ve Süpüratif Tromboflebit

Bu iki intravenöz enfeksiyon, damar duvarındaki hasarlanmış endotelial hücrelerden kaynaklanır. Süpüratif endokardit hospitalize hastalarda artmış intravenöz kateter kullanımının komplikasyonu olarak gösterilmektedir (Forbes ve ark., 2007).

2.8.1.3. Kateter İlişkili Dolaşım Sistemi Enfeksiyonları

Kateterler giriş yerine komşu olan dokuda kolonize olan bakteriler için giriş noktası ya da mikrobiyal mikrokolonileri barındıran yabancı bir cisim görevi yapabilir (Koneman ve ark., 2006). En yaygın etyolojik ajanlar ciltte bulunan organizmalardır (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007). Kateter ilişkili dolaşım sistemi enfeksiyonları tüm semptomatik bakteriyemilerin %19'udur (Trevino ve Ross, 2007; Seifert, 2009). İnfüzyon ilişkili bakteriyemiler *P. aeruginosa* ve *E. cloacae* gibi gram negatif organizmalar ile oluşur (Koneman ve ark., 2006; Trevino ve Ross, 2007).

2.8.2. Eksravasküler Enfeksiyonlar

Lenfatik sistem, bakterilerin dolaşım sistemine girmelerinde kullandıkları bir başka yoldur. Klinik olarak önemli bakteriyemi vakalarının birçoğu ekstravasküler enfeksiyon sonucu oluşmaktadır. Organizmalar akciğer gibi lokal enfeksiyon yerinde çoğalmaya başlayınca lenfatikler ile drene olabilir ve kan akımına ulaşabilirler. Genellikle kan akımı içindeki organizmalar karaciğer, dalak ve kemik iliğindeki retikuloendotelial sistem (RES) ve dolaşımdaki fagositik hücreler tarafından etkili ve hızlı bir şekilde ortadan kaldırılır. Fakat enfeksiyon lokal olarak kontrol altında tutulamazsa mikroorganizmalar dolaşıma yayılır ve bakteriyemi ve fungemiye neden olurlar. Bakteriyemi için en sık giriş bölgeleri genitoüriner sistem (%25), solunum

sistemi (%20), abseler (%10), cerrahi yaralar (%5), safra sistemidir (%5) (Forbes ve ark., 2007; Seifert, 2009).

Ekstravasküler kökenli bakteriyemi oluşma olasılığı; enfeksiyonun yerine, şiddetine ve etken organizmaya bağlıdır. Lokalize enfeksiyon yerinden kan akımına sıklıkla hücum eden organizmalar, *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, anaerobik kok, *Bacteriodes*, *Clostridium*, beta hemolitik streptokok ve *Pseudomonas*'tır (Forbes ve ark., 2007).

2.8.2.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları

E. coli en yaygın bakteriyemi nedenidir (Trevino ve Ross, 2007).

2.8.2.2. Pnömoni

Pnömoni ile eş zamanlı bakteriyemi oluşturan organizmalar *S. pneumoniae*, *H. influenza*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. aerogenes*'tir (Trevino ve Ross, 2007).

2.8.2.3. İntraabdominal Enfeksiyonlar

Bakteriyemilerin %5'ini oluşturur (Trevino ve Ross, 2007).

2.8.2.4. Cilt Enfeksiyonları

Selülitli hastaların %2'sinde *S. aureus*, *S. pyogenes* ve *Streptococcus agalactia* bakteriyemiye neden olur (Trevino ve Ross, 2007).

2.8.2.5. Kas-İskelet Enfeksiyonları

S. aureus'un neden olduğu akut osteomyelit çoğunlukla geçici bakteriyemi nedenidir. *S. aureus* ya da A grubu beta hemolitik streptokok gibi virülan

organizmalar ile oluşan protez eklem enfeksiyonları sepsis ve ölüme neden olabilir (Trevino ve Ross, 2007).

2.8.2.6. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları

S. pneumoniae ya da *N. meningitidis*'in neden olduğu akut bakteriyel menenjit genellikle geçici bakteriyemiye neden olur (Trevino ve Ross, 2007).

2.9. Sepsis Klinik Belirti ve Bulgular

Septisemi belirti ve bulguları, yüksek ya da düşük vücut sıcaklığı, üşüme-titreme, hiperventilasyon, mental durum değişiklikleri ve diyaredir. Ciddi göstergeler, hipotansiyon, DİK, şok ve organ yetmezliğidir (Forbes ve ark., 2007; Trevino ve Ross, 2007).

Diğer semptomlar arasında santral sinir sistemi perfüzyonu azalmasına bağlı deliryum, stupor ya da ajitasyon, bulantı ve kusma yer alır. Hastaların %38'den fazlasında oligüri ve anüri ile beraber akut böbrek yetmezliği olabilir (Trevino ve Ross, 2007).

Yaşlı hastalarda bakteriyemik epizod sırasında ateş olmayabilir veya hafif ateş olabilir (Çiçek ve ark., 2005, Riedel ve ark., 2008). Ayrıca yenidoğanlar ve kortikosteroid ya da nonsteroid antiinflamatuvar ilaç alanlar da sepsise ateşle karşılık vermeyebilirler, hatta hipotermik olabilirler (Çiçek ve ark., 2005).

Eritematöz alanla çevrili santral nekrotik alandan oluşan ektima gangrenosum *Pseudomonas* bakteriyemisi ile ilişkilidir. Bazı laboratuvar bulgularının değişmesi de bakteriyemi göstergesi olabilir. Bunlar trombositopeni, lökositozis ya da lökopeni, laktik asidoz, hipoglisemi ya da hiperglisemi, anormal karaciğer fonksiyon testleri (özellikle hiperbilirubinemi), koagülopati, CRP yüksekliği, haptoglobulin ve fibrinojende artmadır (Trevino ve Ross, 2007).

Şok, sepsiseminin en ciddi komplikasyonudur. Klinik görünüm hipotansiyon, taşikardi, böbrek, beyin, karaciğer ve akciğer gibi hayati organların fonksiyonlarında bozulma, asit-baz dengesi ve kanama bozukluklarıdır (Trevino ve Ross, 2007).

DİK, sepsisin bir komplikasyonudur. DİK'e bağlı kanama, tromboz, organ yetmezlikleri, pıhtılaşma testi bozuklukları ve trombositopeni görülür (Forbes ve ark., 2007).

2.10. Bakteriyemi ve Sepsiste Tanı

Kan Kültür Sistemleri

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevlerinden biri kan kaynaklı patojenlerin tespiti ve identifikasyonudur (Thorpe ve ark., 1990; Nolte ve ark., 1993; Ziegler ve ark., 1998; Durmaz ve ark., 2003; Karahan ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Wallet ve ark., 2009; Weinstein ve Doern, 2011). Laboratuvarın bu konudaki başarısı klinisyenin başarısını ve hastanın bir an önce iyileşmesini sağlayacak, hastanede yatma süresini kısaltacak ve tedavi ve bakım masraflarını azaltacaktır (Başustaoğlu ve Gün, 1998).

Kan kültürü, bakteriyemi ve fungemi tespitinde altın standart tanı yöntemidir (Hall ve Lyman, 2006; Fenollar ve Raoult, 2007; Mancini ve ark., 2010; Patel ve ark., 2011). Genellikle üç set kan kültürü alınması önerilmektedir. Kan kültürleri ortalama olarak kanda 1 KOB/ml bakteri ve mantarı tespit edebilme yeteneğine sahip en duyarlı yöntem olarak kabul edilir. Dezavantajları; işlemlerin tamamlanmasının 1-5 gün sürmesi ve pozitif sonuç alınması için kan örneğinin en az 8 saat inkübasyonununun gerekmesi ve yalancı negatif sonuç alma olasılığıdır (Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010; Tsalik ve ark., 2010; Kaleta ve ark., 2011). Kan kültürlerinin pozitif prediktif değerleri, özellikle tekrarlayan kültürlerde aynı bakteri tespit edildiğinde yüksektir (%98). Bununla birlikte, dolaşım sistemi enfeksiyonlarının yaklaşık %30-40'ında kan kültürleri pozitif bulunur (Klouche ve ark., 2008; Towns ve ark., 2010). Bunun nedeni enfeksiyonun lokal olması, yetersiz

miktarda kan alınması ya da hastanın kültür alınmadan önce antibiyotik kullanması olabilir. Ayrıca dolaşım sistemi enfeksiyonlarında kan kültürü pozitifliği kültürü yapılabilen mikroorganizmalarla sınırlıdır. Yavaş üreyen mikroorganizmalar ve bazı zor üreyen bakterilerde, bakteriyel ve mantar yükü düşük olduğunda, önceden antimikrobiyal ve antimikotik tedavi alanlarda kan kültürlerinin duyarlılığı düşer (Peters ve ark., 2004; Fenollar ve Raoult, 2007; Klouche ve ark., 2008; Jarvinen ve ark., 2009; Stefani, 2009; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010).

Kan kültürünün üç ana amacı vardır. Bunlar,

1. Enfeksiyöz etiyolojiyi doğrulamak
2. Etiyolojik etkeni tanımlamak
3. Antibiyotik tedavisini yönlendirmek olarak sayılabilir (Wayne 2007).

Son 20 yılda mikroorganizmaların saptanma ve tanımlanmasında geleneksel kan kültür şişelerine dayalı yöntemlerden uzaklaşmış, otomatize sistemlerin kullanımına doğru bir yönelim görülmüştür. Kan kültürlerinde otomasyon ilk kez 1970'li yılların başında yarı otomatik kan kültürü cihazlarının kullanımı ile başlamıştır. Otomasyon eğilimi sürekli monitorize kan kültürü sistemlerinin kullanılmaya başlaması ile hız kazanmıştır. Bu cihazlardaki gelişmeler, veri tabanlarının genişlemesi, tanı koyma zamanını azaltan teknolojilerin uygulanması ve laboratuvarlarda verilerin yorumu, saklanması ve yönetilmesini sağlayan yazılımlarındaki önemli ilerlemeleri içermektedir (Hasçelik, 2008).

1990 yıllarında otomatik sürekli monitorize kan kültürü sistemlerinin geliştirilmesi, geleneksel manuel yöntemlerden uzaklaşma eğilimini hızlandırmıştır (Hasçelik, 2008).

Sürekli monitorize kan kültür sistemlerinin avantajları:

- Laboratuvarında iş gücünü azaltır. (çünkü sadece pozitif kültür olduğu zaman teknisyenin çalışmasını gerektirir).
- Yanlış pozitif sonuç ve psödobakteriyemileri azaltır.

- Tespit hızını ve mikroorganizma tespit oranını arttırır (Ziegler ve ark., 1998; Koneman ve ark., 2006; Karahan ve ark., 2006).

Dezavantajları:

- Bazı sistemler için kısıtlı veri tabanı olması,
- Sınırlı besiyeri olanakları,
- Büyük cihazlar olması ve buna bağlı laboratuvarında yer sorunu ve
- Pahalı olmalarıdır (Reimer ve ark., 1997; Koneman ve ark., 2006).

2.10.1. Kan Kültürü Alım Endikasyonları

Dolaşım sistemi enfeksiyonları, hastaya en üst düzeyde yararlı olunabilmesi için laboratuvar ve klinik bulguların birlikte değerlendirilmesinin en fazla gerekli olduğu enfeksiyonlardan birisidir (Çiçek ve ark., 2005).

Kan kültürü alımı için standardize edilmiş endikasyonlar bulunmamaktadır. Ateş, kan kültürü alınmasının en sık nedenidir. Üşüme, taşikardi, takipne gibi kanda mikroorganizma varlığını düşündüren klinik durumlarda, açıklanamayan ateş ve hipotansiyon olduğunda ve nötropeni sırasında ateş ortaya çıkarsa kan kültürü alınmaktadır. (Sümerkan, 1998; Çiçek ve ark., 2005)

Ateş yokluğunda; lokal enfeksiyonu olan (pnömoni, menenjit, osteomyelit gibi), açıklanamayan lökositozu olan, böbrek yetmezlikli hastalardan, bağışıklık sistemi bozulmuş veya yoğun bakım altında açıklanamayan pulmoner, renal ve hepatik fonksiyon bozukluğu olanlardan, açıklanamayan hemodinamik bozuklukları olan hastalardan kan kültürü alınabilir (Sümerkan, 1998, Çiçek ve ark., 2005).

Kan kültürü teknolojilerindeki büyük ilerlemeler ile mikroorganizmaların saptanma ve identifikasyon süreleri kısalmıştır. Bununla birlikte kan kültür sonuçlarının yorumlanmasında sorun olan pek çok faktör vardır. Yalancı pozitif kan kültürleri klinik olarak yorumlamada hatalara yol açmakta, uygunsuz antibiyotik kullanımına,

ilave laboratuvar testlerinin uygulanmasına, uzun süreli hastanede kalışa ve tedavi maliyetlerinin artışına sebep olmaktadır (Çiçek ve ark., 2005; Hall ve Lyman, 2006).

2.10.2. Kan Kültürü Alım Tekniği

Kültür için kan, hekimler, tıbbi teknolojistler, eğitilmiş flebotomistler, hemşireler ve diğer sağlık personeli tarafından alınmalıdır. Kan kültürü alımında mutlaka steril eldiven giyilmelidir. Kan alımında ilk girişim başarısız olmuşsa yeni bir enjektör kullanılmalıdır. Kan periferik venlerden venöz ponksiyon yoluyla alınabilir. Venöz ponksiyondan önce, kan kültür şişesinin kauçuk başlığı %70 alkolle dezenfekte edilmelidir. İyot kauçuğun yapısını bozacağından tercih edilmemelidir. Venöz ponksiyon için uygun bölge seçildikten sonra, turnike uygulanmalı ve ven palpe edilmeli, %70'lik alkolle deri temizlenmeli, kuruduktan sonra merkezden periferik doğru %10'luk povidon iyodin veya %1-2'lik iyot uygulanmalıdır. Sonra tekrar alkolle merkezden periferik doğru silinerek iyot uzaklaştırılmalıdır. Kan alan kişi dezenfeksiyondan sonra cildi tekrar palpe etmemelidir. Kan birçok değişik yolla alınabilir. Tercih edilen yöntem fazla volüm alan enjektörlerle kan almaktır. Birçok flebotomist enjektörle birlikte kelebek kullanmayı tercih etmektedir. Fakat bu yöntem pıhtılaşmayı artırmaktadır. Kan kültür şişelerine direkt kan alımı önerilmemektedir. Çünkü kan kültür şişelerindeki vakum önerilen kan volümünden daha fazlasının kan kültür şişesine aspire edilmesine neden olur. İstenilen miktarda kan alındıktan sonra iğne damardan çekilmeli ve şişeye inoküle edilmelidir. Pıhtılaşmayı önlemek için inoküle edilen şişeler birkaç dakika yavaşça çalkalanmalıdır (Mylotte ve Tayara, 2000; Weinstein, 2003; Çiçek ve ark, 2005).

Son zamanlarda damardan kan alınmadan önce klorheksidin kullanılması önerilmektedir (Forbes ve ark., 2007; Haşçelik, 2008). Kontaminasyonu azaltmak için cilt temizliğinde kullanılan maddeye bakılmaksızın titiz bakım ve aseptik tekniklerin kullanılması gereklidir. Ayrıca periferik kandan alınan kan örneklerinin kataterden alınan kan örneklerine göre kontaminasyona neden olan mikroorganizmaları üretme olasılığı daha düşüktür (Haşçelik, 2008).

Kan kültürleri doktor, hemşire, özel eğitilmiş teknisyen gibi tecrübeli sağlık görevlileri tarafından alınmalıdır. Kanı alacak olan kişi bu işlem sırasında eldiven giymelidir. Ayrıca cilt temizliği yapıldıktan sonra tekrar palpasyon yapılmamalı, yapılacaksa eldivenin parmak kısımları dezenfekte edilmeli ve kan kültür şişelerinin ağızları da dezenfekte edilmelidir (Resim 2.1.) (Çiçek ve ark., 2005; Koneman ve ark., 2006).

Kan kültürünün düzgün sonuç vermesi için dikkat edilecek hususlar şunlardır:

- Kan kültür şişeleri kullanılmadan önce hasar ya da renk değişikliği açısından kontrol edilmeli, kontaminasyonu gösteren gaz değişiklikleri var mı diye bakılmalıdır.
- Şişelerin son kullanım tarihleri kontrol edilmeli, günü geçmiş şişeler kullanılmamalıdır.
- Kan kültür setleri farklı anatomik bölgelerden alınmalıdır.
- Kültür için kan venlerden alınmalı, yüksek kontaminasyon riski olan arteriyel ya da venöz kateterlerden kan alınmasından kaçınılmalıdır.
- Örnek alınmadan önce cilt dezenfekte edilmelidir.
- Alınan örnekler bekletilmeden hızla, tercihen iki saat içinde, laboratuvara gönderilmeli, eğer bekletilecekse oda sıcaklığında saklanmalıdır.
- Tüm kan kültür şişelerine hastanın adı, soyadı, alım tarihi, saat, alınan yer yazılmalıdır (Wayne, 2007; www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Blood_Culture_Booklet.pdf).



Resim 2.1. Kan kültür alınma tekniği

2.10.3. Kan Kültürü Sonuçlarını Etkileyen Teknik Değişkenler

2.10.3.1. Kan Kültürü Miktarı

Şişeye inoküle edilen kan miktarı dolaşım sistemi enfeksiyonlarının saptanmasında en önemli faktörlerden biridir (Forbes ve ark., 2007; Bouza ve ark., 2007; Haşçelik, 2008; Gonsalves ve ark., 2009; Paolucci ve ark., 2010; Lin ve ark., 2012). Erişkinlerdeki dolaşım sistemi enfeksiyonlarının, her 10 ml'lik kanda ≤ 1 mikroorganizma ile ortaya çıkabileceği kanıtlanmıştır. Kan kültürünün tanısıl etkinliği ile kültür için alınan kan miktarı arasında doğrudan bir ilişki vardır (Cockerill ve ark., 2004; Bouza ve ark., 2007; Nicolas, 2008; Towns ve ark., 2010; Previsdomini ve ark., 2012). Yetişkinlerden her kültür seti için 20-30 ml kan alınması önerilmektedir (Haşçelik, 2008; Cockerill ve ark., 2004; Koneman ve ark., 2006; Bouza ve ark., 2007; Mancini ve ark., 2010; Paolucci ve ark., 2010; Patel ve ark., 2011). Eğer bir sette iki tane şişe kullanılıyorsa her şişe için 10 ml kan konması yeterlidir (Koneman ve ark., 2006).

Bebeklerde ve küçük çocuklarda dolaşım sistemi enfeksiyonlarının saptanması için kan miktarının önemi son yıllarda belirgin hale gelmiştir. Saptama oranı bir çalışmada 6 ml kanda 2 ml kandakinin iki katı olarak saptanmıştır (Isaacman ve ark., 1996). Çocuklarda düşük düzey bakteriyemi olduğu tespit edilmiş ve bu hasta grubunda dolaşım sistemi enfeksiyonunun tespiti için çocuktaki kan miktarının % 4-4,5'unun alınmasının gerektiği önerilmiştir (Forbes ve ark., 2007; Haşçelik, 2008). Ancak küçük ve prematüre bebeklerde bu miktarı almak mümkün olmayabilir. İnfantlar ve küçük çocuklardan kültür için genellikle 1-5 ml kan alınır (Paolucci ve ark., 2010). Çocuklar için yapılmış özel kan kültür şişeleri mevcuttur (Forbes ve ark., 2007; Paolucci ve ark., 2010).

2.10.3.2. Besiyeri

Kan kültürleri için en çok kullanılan besiyeri soya fasulyesi kazein buyyondur (soybean casein digest broth). Mayalar ve bazı bakterilerin saptanması için beyin

kalp infüzyon sıvı besiyeri de eşdeğer ya da daha iyidir (Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008).

2.10.3.3. Kanın Sıvı Besiyerine Oranı

İnsan kanı içinde bulunan lökositler, kompleman ve lizozim gibi birçok madde mikrobiyal üremeyi inhibe edebilir. Kan örneği alındığı sırada antimikrobiyal tedavi altında olunması da üremeyi etkiler. Kanın sıvı besiyerine oranının en az 1:5 olmasının, muhtemelen doğal inhibitör madde konsantrasyonunu azaltarak ve antimikrobiyal ajanları subinhibitör düzeyine düşürerek teşhisi kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Çiçek ve ark., 2005; Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008). Reçine içeren bazı ticari besiyerleri 1:5 oranından daha az kan:sıvı besiyeri oranına ihtiyaç duyabilir. Bazı firmalar küçük çocuklardan az miktarda kan alınabileceğini göz önünde bulundurarak, 1:5'ten 1:10'a kadar oranlarda kan:sıvı besiyeri oranını sağlamak için, az miktarda sıvı besiyeri ile yapılmış pediatrik kan kültürü şişelerini piyasaya sürmüşlerdir. Bu şişelerdeki sıvı besiyerleri *H. influenza*'nın üremesini arttırmak için X ve V faktörleri ile desteklenmiş ve *Neisseria* türlerinin daha iyi saptanması için sodyum poliaetol sülfonat (SPS) konsantrasyonları azaltılmıştır. Bu şişeler popüler hale gelmesine rağmen bunların konvansiyonel kan kültürü şişelerine göre daha fazla üreme sağladıkları ya da mikroorganizmaları daha erken saptadıklarına dair az sayıda veri bulunmaktadır (Hasçelik, 2008).

2.10.3.4. Antikoagülanlar

Kan kültüründeki üreme kan pıhtılaşması ile azalabilir. Bu nedenle bütün sıvı besiyeri bazlı kan kültürü besiyerleri antikoagülan içerir. Heparin, EDTA ve sitratın antikoagülan olarak kullanımı tavsiye edilmez. Çünkü bazı mikroorganizmaların üremesini engellerler. %0,025-0,05 konsantrasyonundaki SPS en sık kullanılan antikoagülan maddedir (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008). Pıhtılaşmanın inhibe edilmesine ek olarak SPS lizozimi inhibe eder, aminoglikozid antibiyotikleri inaktive eder. Fibrinojen, β -lipoprotein, β 1-C globulin ve diğer serum komponentlerini presipite eder. Kompleman kaskadı ve fagositozu

inhibe eder. SPS'nin bazı olumsuz özellikleri de vardır. *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptobacillus moniliformis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Francisella tularensis* ve *Moraxella catarrhalis*'in üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Besiyerine %1 jelatin eklenmesi SPS'nin bu inhibitör etkilerini engeller (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Pien ve ark., 2007; Hasçelik, 2008). Genel olarak yüksek konsantrasyonda SPS gram pozitif kokların üremesini arttırmış, fakat gram negatif bakterilerin üremesini inhibe etmiştir (Hasçelik, 2008).

2.10.3.5. Antimikrobialerin Nötralizasyon ve İnaktivasyonu

Birçok hasta, kan örnekleri alınmadan önce antimikrobiallerle tedavi edildiğinden ve bu durum da test duyarlılığını azaltacağından, bazı üreticiler bu ajanları bağlayan, absorbe eden ya da bu maddeleri inaktive eden kimyasallar içeren besiyerleri tasarlamışlardır. Bazı besiyeri içerikleri antimikrobiyal ajanları bağlamak veya absorbe etmek için yapılmış katkı maddeleri içermekte, böylece mikroorganizmaların üremesini arttırmaktadır (Paolucci ve ark., 2010; Towns ve ark., 2010). BACTEC kan kültürü sistemi (BD Diagnostics, ABD) küçük cam boncuklar üzerinde antibiyotik bağlayıcı reçine kullanırken, BacT/Alert kan kültürü sistemi (BioMerieux Inc., Fransa) aktif kömür tozu kullanmaktadır. Her iki sistemde de bu katkı maddelerini içeren kültür ortamı, katkı maddesi içermeyen ortama kıyasla özellikle stafilocok ve mayalar gibi çeşitli mikroorganizmaların saptanmasını arttırmış ve antimikrobiyal tedavi alan hastalarda üremeyi arttırmıştır. Öte yandan reçine ve aktif kömür tozu içeren besiyerinde, katkı maddesi içermeyen besiyerine oranla daha fazla koagülaz negatif stafilocok kontaminasyonu saptanabilir (Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008; Roh ve ark., 2012).

2.10.3.6. İnkübasyon Atmosferi

Geleneksel kan kültürü seti bir aerobik ve bir anaerobik olmak üzere iki kan kültürü şişesinden oluşmalıdır. Bir tanesi aerob ve fakültatif anaerobik bakterilerin üremesini sağlayacak, diğeri ise fakültatif organizmalar ve aynı zamanda zorunlu anaerobların

da üremesini destekleyecek şekilde tasarlanmıştır (Çiçek ve ark., 2005; Hall ve Lyman, 2006; Grohs ve ark., 2007). Aerobik kan kültürü şişeleri genellikle şişelerin üst boşluğunda çeşitli mikroorganizmaların üremesini desteklemek için belirli miktarlarda karbondioksit ilave edilmiş ortam içerir. Anaerobik kan kültürü şişelerinin üst boşluğunda ise genellikle karbondioksit ve nitrojen bulunurken oksijen bulunmaz. Son yıllarda zorunlu anaerobların neden olduğu bakteriyemilerin oranındaki düşüş nedeniyle bazı araştırmacılar, kültür setindeki anaerob kan kültür şişelerinin rutin kullanımının gereksiz olduğunu ifade etmişlerdir (James ve Al-Shafi, 2000; Hall ve Lyman, 2006; Grohs ve ark., 2007; Chiarini ve ark., 2008). Bunun yerine daha sık görülen aerobik ve fakültatif anaerobik organizma ve mayaların saptanmasını arttırmak ve yetişkinlerden en az 20 ml kan ile kan kültürü yapılmasını sağlamak için ikinci bir aerob şişenin kullanımını önermektedirler (James ve Al-Shafi, 2000; Koneman ve ark., 2006; Hasçelik, 2008). Anaerobik şişe sadece anaerobik bakteriyemiler için yüksek risk altında olan hastalarda seçici olarak kullanılabilir. Ancak son zamanlarda yapılan bir çalışmada, iki aerobik şişe kullanılmasına kıyasla bir aerobik ve bir anaerobik şişeye yapılan ekimin mikroorganizmaların saptanmasında artış sağladığı bulunmuştur (Patel ve ark., 2011). Sadece aerobik şişelerin ya da daha geleneksel olan aerobik ve anaerobik şişe çiftinin kullanımı hâlâ tartışma konusudur (Hasçelik, 2008; Weinstein ve Doern, 2011).

2.10.3.7. Şişenin Çalkalanması

Şişenin çalkalanması üremeyi artırır ve aerobik şişelerden kan kültürü pozitifliğini hızlandırır. Ticari olarak bulunan bütün sürekli monitorize kan kültür sistemlerinin şişeleri çalkalanmaktadır (Hasçelik, 2008).

2.10.3.8. Pasajlar

Genellikle geleneksel kan kültürü işlemi, bir gecelik inkübasyon sonunda ve kültür negatif olduğu durumda inkübasyon dönemi sonunda Gram boyaması ve aerobik kültür şişelerinin kör pasajını gerektirir. Manuel sistemlerdeki anaerobik kültür

şişelerinin ve cihazlı sistemlerdeki bütün şişelerin kör pasajı gereksizdir (Hasçelik, 2008). Kan kültürü pozitif sinyal verirse pasajlar %5 koyun kanlı agar, MacConkey agar, çikolata agar ve Sabouroud dextroz agara yapılmalıdır.

2.10.3.9. İnkübasyon Süresi

Rutin durumlarda geleneksel kan kültürlerinin 7 günden fazla inkübe edilmesine gerek yoktur. Otomatize kan kültürü sistemleri ile ilgili çalışmalar birçok patojenin saptanmasında 5 günlük inkübasyonun yeterli olduğunu göstermektedir (Bourbeau ve Pohlman, 2001; Bourbeau ve Foltze, 2005; Hall ve Lyman, 2006; Hasçelik, 2008; Weinstein ve Doern, 2011). Bazı araştırmacılar, belirli sistem ve besiyerlerinde 3-4 günlük inkübasyon süresinin yeterli olduğunu savunmaktadır (Reisner ve ark., 1999; Bourbeau ve Pohlman, 2001; Bourbeau ve Foltze, 2005; Hasçelik, 2008). Ancak inkübasyonun süresi standart olarak 5 gün olarak kalmıştır. Enfektif endokardit şüphesinde inkübasyonun süresini uzatmak önerilmekteyse de, standart 5 günlük inkübasyon süresi içinde endokardit dışı dolaşım sistemi enfeksiyonlarının %99,5'i ve endokardit epizodlarının tamamı tespit edilebilmiştir (Hasçelik, 2008; www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Blood_Culture_Booklet.pdf). *Candida* türlerinin saptanmasında da inkübasyon süresinin arttırılmasına gerek olmadığı görülmüştür. Ancak *Candida glabrata* ve *Cryptococcus neoformans* için yayınlanmış veriler yeterli değildir (Hasçelik, 2008).

2.10.4. Kan Kültür Sonuçlarını Etkileyen Klinik Uygulamalar

2.10.4.1. Cilt Antisepsisi ve Kontaminasyonun Önlenmesi

Kan kültürünün pozitif çıkmasının kontaminasyondan ziyade enfeksiyonun bir delili olması, kan alınırken uygulanan cilt antisepsisinin etkinliğine ya da kan kateterden alınıyorsa bu kateterin antisepsisinin etkinliğine bağlıdır. Katatere bağlı bakteriyemilerin en önemli etiyolojik ajanı ve aynı zamanda en sık kan kültürü kontaminantı olan KNS'lerin kan kültürü kontaminantı olarak üremesi, hem klinisyeni yanlış yönlendirir hem de gereksiz masrafa neden olur (Trautner ve ark.,

2002; Weinstein, 2003; Hall ve Lyman, 2006; Gonsalves ve ark., 2009). En sık kontaminant olan KNS, bağışıklığı baskılanmış hastalarda ve intravasküler kateteri olan hastalarda primer patojen olmaya başlamıştır (Weinstein 2003; Hall ve Lyman, 2006; Gonsalves ve ark., 2009). Kontaminasyonun azalması hem mikrobiyoloji laboratuvarları için hem de sağlık sistemi için anahtar bir konudur (Hasçelik, 2008). Bakteriyel kontaminantlar ile oluşan yanlış pozitif sonuçlar, gereksiz antibiyotik kullanımına, hastanede kalış süresinin uzamasına ve dirençli mikroorganizmaların seçilmesine neden olur (Trautner ve ark., 2002; Hall ve Lyman, 2006; Gonsalves ve ark., 2009; Previsdomini ve ark., 2012).

Kan kültürlerinde en sık üreyen kontaminantlar insanın doğal mikrobiyal florasında bulunan mikroorganizmalardır ve kan kültür kontaminasyon oranını azaltmada en önemli faktör dikkatli cilt temizliğidir. Yetersiz cilt antisepsisi ile ilişkili olarak kan kültür kontaminasyonundan sorumlu organizmalar, KNS, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus anthracis* dışındaki *Bacillus spp.*, *Micrococcus spp.* ve viridans streptokoklardır. (Weinstein MP, 2003; Çiçek ve ark., 2005).

Kontaminasyon oranının (kontamine kan kültür set sayısı/toplam olarak alınan kan kültür sayısı) <%3 olması, iyi kan kültürü alınması için referans değer olarak kabul edilmektedir (Weinstein 2003; Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008; Towns ve ark., 2010; Weinstein ve Doern, 2011).

2.10.4.2. Kültürü Yapılmış Kan Örneklerinin Sayısı

Kültür için alınan 20 ml kanın kullanıldığı geleneksel kan kültür sistemleri ve sürekli monitorize kan kültür sistemleri ile yapılan çalışmalarda, yetişkinlerde iki ya da üç kan kültür seti ile dolaşım sistemi enfeksiyonlarının saptanacağı gösterilmiştir (Çiçek ve ark., 2005; Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Lee ve ark., 2007; Hasçelik, 2008; Mancini ve ark., 2010; Towns ve ark., 2010; Weinstein ve Doern, 2011; Patel ve ark., 2011). Tek kan kültür seti alınmasının önüne geçilmelidir. Tek örnek için alınan kan, bazı enfeksiyonların teşhisi için yetersiz olacaktır (Patel ve ark., 2011; www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Blood

_Culture_Booklet.pdf). 20 ml kan alınarak oluşturulan üç set ile bakteriyemilerin %99'u, iki set ile bakteriyemilerin %88'i, bir set ile bakteriyemilerin %80'i tespit edilebilmektedir (Lee ve ark., 2007; Patel ve ark., 2011). Genelde çoğu laboratuvar her set için iki kan kültür şişesini kullanmaktadır. Ancak üç kan kültür şişesinden oluşan iki set patojenlerin tespit edilmesini daha da arttırır (Patel ve ark., 2011). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) klavuzuna göre iki kan kültür şişesinden oluşan iki set ile bakteriyemilerin %90-95'i, iki kan kültür şişesinden oluşan üç set ile bakteriyemilerin %95-99'u tespit edilebilir (Towns ve ark., 2010). KNS, viridans grup streptokok veya difteroidlerin tek kan kültüründe üremesi genelde kontaminasyonu düşündürür. Fakat bazen bu durum klinik olarak önemli enfeksiyonları da işaret edebilir. Bu gibi durumlarda pozitif sonucu yorumlamak zordur (Hasçelik, 2008; Gonsalves ve ark., 2009). Antibiyotik tedavisi alan hastalarda, her biri 16-20 ml kan alınarak oluşturulan üç şişeden oluşan iki kan kültür seti veya ikinci gün iki set kültür alınması önemli etiyolojik ajanların tespitini sağlar. Kültür sisteminin bu şekilde uygulanması inkübasyon dönemi uzun olan organizmaların üremesini sağlar (Forbes ve ark., 2007; Patel ve ark., 2011). İki ya da üç set kültür alınmış ancak 24 saat inkübasyon sonrası kültürler hala negatifse ve hasta hâlâ septik ise 2-3 ilave kültür seti alınabilir (Lee ve ark., 2007; www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Blood_Culture_Booklet.pdf). Subakut bakteriyel endokardit durumunda üç kültür seti alınıp sonuç negatif olursa ertesi gün tekrar iki ya da üç set kültür alınması organizma tespit oranını arttırır (Çiçek ve ark., 2005; Towns ve ark., 2010).

Her septik epizodda rutin olarak üç setten fazla kan kültürü alınması kontaminant ve klinik olarak önemli izolatlar arasında ayırım yapmaya yardım etmemektedir. Bundan dolayı 24 saat içerisinde rutin olarak üç kan kültüründen fazla kültür alınması pozitif sonuçlarda anlamlı bir artışa sebep olmamakta, maliyeti ve laboratuvarın iş yükünü arttırmakta ve hastada hastane kaynaklı anemiye (flebotominin sebep olduğu) neden olmaktadır (Çiçek ve ark., 2005; Koneman ve ark., 2006; Bouza ve ark., 2007).

2.10.4.3. Kan Kùltürlerinin Alınma Zamanı ve Kan Hacmi

Kan alınma zamanı diğer faktörler kadar önemli değildir. Çünkü organizmaların çoğu kana sürekli ve sabit oranda bırakılırlar. Kan örneklerinin tümünün aynı anda alınması ya da aralıklarla alınması arasında fark saptanamamıştır (Li ve ark., 1994; Forbes ve ark., 2007; Paolucci ve ark., 2010). Bakteriyemiler üşüme titreme ile ilişkilendirilmiş olsa da genellikle bakteriyemi ateşten önce oluşur ve kan kùltürü alma isteğini başlatan ise ateştir. Ancak mikroorganizmalar ateş yükselmeden 30-60 dakika önce kanda en fazla buldukları için en iyi kan alınma zamanı üşüme titremelerin başladığı ateşin ortaya çıkmasından önceki zamandır (Sümerkan, 1998; Riedel ve ark., 2008). Bazı otoriteler kùltür için kan alımının birbirini izleyen aralıklarla yapılmasını önermişlerse de bazı çalışmalarda belirli aralıklarla alınan kan örneklerinde üreme açısından bir fark olmadığı gösterilmiştir (Çiçek ve ark., 2005; Haşçelik, 2008; Paolucci ve ark., 2010). Kan alma zamanına hastanın klinik durumu ve olası tanıya göre karar verilmelidir. Sepsiste ve genel durumu stabil olmayan bir hastada tedavinin başlayabilmesi için kan kùltürünün hemen alınması gerekir. Stabil olan bir hastada subakut enfektif endokarditten şüphelenilirse aralıklı olarak birden çok kan örneği alınabilir (Haşçelik, 2008).

Otoriteler organizma tespiti için kan alınma zamanının değil toplam hacmin önemli olduğu sonucuna varmışlardır (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Gonsalves ve ark., 2009). Alınan kan hacmi arttıkça bakteriyemi tespit şansı artmaktadır (Bouza ve ark., 2007; Patel ve ark., 2011). Alınan fazladan her bir ml kan için bakteriyemi tespit şansı %3-5 artmaktadır (James ve Al-Shafi, 2000; Bouza ve ark., 2007). Kan miktarının az olması yalancı negatif sonuçlar alınmasına neden olabilir (Gonsalves ve ark., 2009). Antibiyotik tedavisi verilen hastalarda kan kùltürü bir sonraki dozdan hemen önce alınmalıdır (www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Blood_Culture_Booklet.pdf; Çiçek ve ark., 2005).

Kan kùltürlerinin tekrarlanma standartlarıyla ilgili rehberler yoktur. İlk kùltür sonuçlarına göre, tekrarlanmış kùltür sonuçlarının analizi yapıldığında, kontaminant veya negatif kùltürü olan hastaların tekrar kùltürlerinin pozitif olmadığı görülmüştür

(Tabriz ve ark., 2004; Çiçek ve ark., 2005). Ayrıca tekrar kültürleri pozitif olan pek çok hastada da aynı patojen izole edildiği saptanmıştır. Bir görüş birliğine varıp onaylanıncaya kadar tekrar kültürlerinin şu kriterlere bağlı olarak alınması önerilmiştir:

1. Yeni septik epizod. Örneğin ateş paterni içinde yeni bir ateş veya sepsisle uyumlu yeni hemodinamik değişiklikler olması.
2. Şüpheli endokardit.
3. *S. aureus* bakteriyemisi, kandidemi ve gram negatif basillerin sebep olduğu bakteriyemilerde kan kültür pozitifliğinin izlenmesi.
4. *S. aureus*, *Enterococcus* spp., gram negatif basil veya diğer güç tedavi edilen mikroorganizmaların sebep olduğu endokardit veya diğer endovasküler enfeksiyonlarda tedaviye cevabın doğrulanması.
5. Bazı vakalarda periferik ven ve kateter girişinden antibiyotiğe başlamadan önce alınmış kan kültürleri ile intravasküler kateter ilişkili bakteriyeminin tanısını doğrulamak (Tabriz ve ark., 2004; Çiçek ve ark., 2005).

Şu durumlarda ise tekrar kültürlerinin alınması gereksizdir:

1. Yeni bulgular olmadan devam eden ateş
2. Enfeksiyöz olmayan etiyojiye dayandırılan yeni bir ateş
3. Sepsisi destekleyen klinik bulgular olmaksızın lökositoz
4. Sistemik bulgular ve semptomlar olmaksızın kolonizasyon veya fokal enfeksiyon (Tabriz ve ark., 2004; Çiçek ve ark., 2005).

2.10.5. Kan Kültürü Sistemleri

2.10.5.1. Manuel Sistemler

Piyasada üç manuel kan kültürü sistemi bulunmaktadır.

1. Septi-Chek (BD Diagnostics, ABD)

2. Oxoid Signal (Remel Inc., İngiltere)
3. Isolator (Wampole laboratuvarları, ABD)

2.9.10.1.1. Septi-Chek Sistemi (BD Diagnostics, ABD)

Geleneksel kan kültürlerine iş gücü azaltıcı bir alternatif olarak geliştirilmiştir ve pasajların manuel olarak yapılması gereklidir. Şeffaf plastik silindir içindeki agar kaplanmış raketin geleneksel sıvı besiyeri içeren kültür şişesine tutturulması sonucunda klasik Castenada şişelerine benzer iki fazlı sistemden meydana gelir (Resim 2.2.) Şişeler çalkalamalı ya da çalkalamasız inkübe edilir ve makroskobik olarak günde bir ya da iki kez mikrobiyal üreme varlığı incelenir. Birçok Septi-Chek sıvı besiyeri içeriği vardır. Agar bölmesi, çikolata agar, MacConkey agar ve malt agar olarak üç agar içerir (Koneman ve ark., 2006; Haşcelik, 2008). Mantar ve mikobakteriler için de özel agarlar eklenebilir. Şişeyi açmadan ya da iğne kullanmadan pasaj yapılmasını sağlar ve büyük miktarda buyyonun pasajı yapılmış olur. Septi-Chek sistemi *S. pneumoniae*'nin tespitini arttırır (Forbes ve ark., 2007).



Resim 2.2 Septi-Chek sistemi iki fazlı kan kültür şişeleri

2.9.10.1.2. Oxoid Signal (Remel Inc., İngiltere)

Tek şişede manuel kan kültür sistemidir ve geleneksel kan kültürlerine iş gücü azaltıcı bir alternatif olarak geliştirilmiştir. Kan, geleneksel şekilde şişenin içine inoküle edildikten sonra, şişenin üzerine şeffaf plastik sinyal ünitesi bağlanır. Şişenin boynunun üzerinden kayan bir üst plastik kol, bu sinyal ünitesine sıkıca tutunur. Ünitenin içinde bulunan uzun iğne, kan-sıvı besiyeri karışım düzeyinin altına uzanır.

Eğer şişenin içinde mikrobiyal üreme gerçekleşirse oluşan karbondioksit şişenin üst boşluğunda toplanır. Bu atmosfer basıncını arttırarak kan-sıvı besiyeri karışımını iğnenin içinden şeffaf plastik sinyal silindirin içine doğru iter ve günlük olarak şişeleri inceleyen mikrobiyoloji uzmanı tarafından gözle belirlenebilir (Resim 2.3.) Sadece bir besiyeri içeriği piyasaya sürülmüştür. Normale göre daha fazla yalancı pozitif sonuç vermektedir (Koneman ve ark., 2006; Hasçelik, 2008).

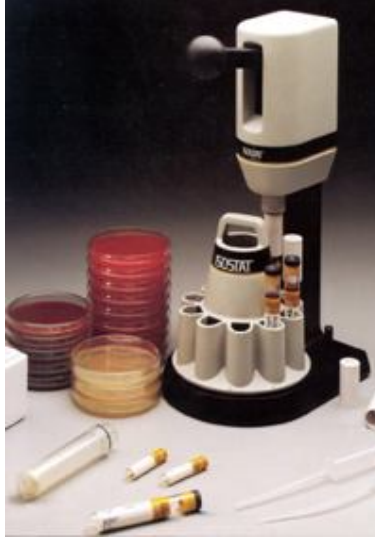


Resim 2.3 Oxoid Signal kan kültür sistemi şişe örneği

2.10.5.1.3. Isolator Kan Kültürü Sistemi (Lizis Santrifügasyon Sistemi) (Wampole laboratuvarları, ABD)

Kültür ortamı olarak sıvı besiyeri kullanmayan tek ticari sistemdir. Bu sistem lizis santrifügasyon prensibine dayanır. Kan, kan hücrelerini eritici solüsyon olarak saponin, köpürmeyi engelleyen polipropilen glikol, antikoagülan olarak SPS, koagülasyon ve kompleman kaskadını inhibe etmeyi sağlayan kalsiyum iyon şelasyonu için EDTA ve kan işlenmesindeki santrifüj basamağı esnasında tampon görevi gören florokarbon içeren isolator tüpe inoküle edilir (Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008). Kan lize ve santrifüj edildikten sonra, tüp isostat sisteminin içine yerleştirilir (Resim 2.4.) (Hasçelik, 2008). Isolator rutin bakteriyel patojenlerin saptanması için kullanılabilir. Ancak örneklerin 8 saat içinde hazırlanmaması durumunda anaeroblar, *Haemophilus* türleri, *Listeria monocytogenes* ve pnömokokların saptanmasında sistemin duyarlılığının azaldığı tespit edilmiştir

(Forbes ve ark., 2007; Haşcelik, 2008). Mayaların, dimorfik mantarların, mikobakterilerin ve *Bartonella* türlerinin saptanmasında iyi bir sistemdir (Haşcelik, 2008; Weinstein ve Doern, 2011). *S. pneumoniae*, diğer streptokoklar, *Pseudomonas aeruginosa* ve anaerob izolasyonunda diğer sistemler kadar iyi değildir (Haşcelik, 2008; Weinstein ve Doern, 2011).



Resim 2.4 Isolator kan kültürü sistemi

2.10.5.2. Sürekli Monitorize Otomatik Kan Kültür Sistemleri

Ticari olarak satışta bulunan bütün sürekli monitorize kan kültür sistemlerinin birçok ortak özelliği vardır (Haşcelik, 2008). Manuel ve ilk otomatik sistemlerde olduğu gibi bu sistemler aynı zamanda peritoneal sıvı gibi diğer steril vücut sıvılarından mikroorganizmaların üremesini saptamak için de kullanılmıştır (Forbes ve ark., 2007).

Cihazlı sistemler şunlardır:

1. BacT/Alert sistemi (BioMerieux Inc, Fransa)
2. BACTEC sistemi (BD Diagnostics, ABD)
3. Versa-TREK sistemi (Thermo Scientific, ABD)

2.10.5.2.1. BacT/Alert Sistemi (BioMerieux Inc., Fransa)

İlk sürekli monitorize kan kültür sistemidir ve ilk kez 1990 yılında piyasaya sürülmüştür. Sistem 1999 yılında orijinalinden daha az yer kaplayan ve teknisyenin manipulasyonunu kolaylaştıran dokunmatik ekranlı bilgisayarı ile BacT/Alert 3D olarak yenilenmiştir (Resim 2.5.). Her inkübatör modülü 120 ya da 240 kültür şişelik bir kapasiteye sahiptir (Koneman ve ark., 2006; Hasçelik, 2008). Her şişenin alt kısmında, kan-sıvı besiyeri karışımından şişenin içindeki karbondioksit miktarını gösteren karbondioksite-yarıgeçirgen membran ile ayrılmış kolorimetrik karbondioksit sensörü bulunur (Thorpe ve ark., 1990; Reisner ve ark., 1999; Saito ve ark., 2004; Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008). İnkübatör ünitesinde, her şişenin konulduğu ünitenin altında ışık veren ve ışık algılayan diyotlar vardır (Hasçelik, 2008). Bölmelere şişeler alt kısmı aşağıda olacak şekilde yerleştirilir ve her bölme inkübatör, çalkalayıcı ve dedektör olarak görev yapar. Her bölme horizontal rafları olan iki diziden oluşur ve yavaş şekilde ileri geri sallanır Sensör tarafından. 10 dk aralarla renk değişikliği ölçülür (Thorpe ve ark., 1990; Koneman ve ark., 2006). Mikroorganizma üremesi ve metabolizma sonucu karbondioksit oluşması, yansıyan ışık miktarını değiştirir, şişenin algılayıcısı renk değiştirir. Oluşan karbondioksitin erimesi ile serbest hidrojen iyonu oluşur. Serbest hidrojen iyonu sensörde renk değişikliği yapar (mavi-yeşil-sarı). Yansıtmadaki değişiklik cihaz tarafından ölçülür. Bilgi cihazın bilgisayarına aktarılır (Thorpe ve ark., 1990; Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007). Bilgisayarın pozitif kültür tespit edildiğinde sonucu bildirmek için çok sayıda algoritması vardır. Bunlar,

- 1- Yansıtma belli bir eşiğin üzerine çıktığında,
- 2- Cihaz karbondioksit düzeyinde doğrusal bir artış tespit ettiğinde,
- 3- Karbondioksit üretim seviyesinde bir artış olduğunda bildirilir.

Sistem şişelerinin birçok besiyeri içeriği mevcuttur.

- 1- 40 ml'lik katkılı triptik soya buyyonu içeren standart aerobik (SA) ve anaerobik (SN) besiyerleri: 10 ml'ye kadar kan alabilmektedirler.

2- Beyin-kalp katı parçaları eklenmiş peptonla zenginleştirilmiş triptik soya buyyonu, ve kandaki antimikrobiyallere ve diğer indirgeyici maddelere bağlanarak onları inaktive eden aktif kömür tozu içeren 30 ml'lik aerobik FAN (FA) ve 40 ml'lik anaerobik FAN (FN) besiyerleri

3- Fazla miktarda kan alınamayan çocuk ve yaşlı hastalar için piyasada bulunan, beyin-kalp katı parçaları eklenmiş pepton ile zenginleştirilmiş triptik soya buyyonu ve aktif kömür tozu içeren daha düşük hacimli (20 ml) FAN besiyeri

Genel olarak sistem, elde edilen sonuç ve mikroorganizmaların tanısındaki hız açısından diğer ticari sürekli monitorize kan kültür sistemlerine benzerdir. BacT/Alert besiyerleri şu anda, cam şişelerle aynı performans özelliklerini gösteren şeffaf, kırılmaya dirençli plastik şişelerde sunulmaktadır (Resim 2.6) (Mirrett ve ark., 2005; Petti ve ark., 2005; Grohs ve ark., 2007; Hasçelik, 2008).



Resim 2.5 BacT/Alert 3D kan kültür sistemi



Resim 2.6 BacT/Alert kan kültür plastik şişeleri

2.10.5.2.2. BACTEC 9000 (BD Diagnostics, ABD)

Sistem, üç cihaz seçeneği sunmaktadır: 9240 cihazının üretici modülü 240 şişe alırken, 9120 cihazında her modül 120 şişe almaktadır. Küçük laboratuvarlar için firma 50 şişe içeren tezgah üstü 9050 cihazını satmaktadır (Daxboeck ve ark., 2004; Hasçelik, 2008).

BACTEC sistemi BacT/Alert sistemine benzer şekilde her kültür şişesinin dibinde bir karbondioksit algılayıcısı içermektedir. Fakat BacT/Alert'ten farklı olarak BACTEC sistemi mikroorganizmaların üremesini saptamak için floresan duyarlı bir mekanizma kullanmaktadır (Cockerill ve ark., 1997; Reisner ve ark., 1999; Qion ve ark., 2001; Koneman ve ark., 2006; Karahan ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Hasçelik, 2008; bd 2009; Mancini ve ark., 2010). Karbondioksit membran sadece karbondioksite geçirgendir. İyon, besiyeri içeriği ve kana geçirgen değildir (Nolte ve ark., 1993). Karbondioksit miktarı arttığında, buna bağlı olarak floresanstaki artış cihaz tarafından saptanmaktadır (Nolte ve ark., 1993; Cockerill ve ark., 1997; Durmaz ve ark., 2003; Koneman ve ark., 2006; Hasçelik, 2008). Oluşan karbondioksit sensör içine difüze olunca çözünür ve hidrojen iyonu oluşur. Hidrojen iyonu pH'yı azaltır ve sensörden floresans artışına neden olur (Nolte ve ark., 1993; Forbes ve ark., 2007). Buradaki ana tanımlama kriteri, floresans miktarındaki artmadır (Hasçelik, 2008). Bu sistemde de şişeler 10 dakikada bir monitorize edilir (Resim 2.7.) (Nolte ve ark., 1993; Koneman ve ark., 2006; BD, 2009).



Resim 2.7 BACTEC kan kültür sistemi

BACTEC sistemi birçok besiyeri içeriğine sahiptir.

1- 40 ml soya fasulyesi kazein digest buyyonu içeren standart aerobik ve anaerobik besiyeri

2- 25 ml soya fasulyesi kazein digest buyyon ve antibiyotik bağlayan reçineli cam boncuklar içeren standart aerobik ve anaerobik plus besiyeri

3- 40 ml soya fasulyesi kazein digest buyyonu ve litik madde içeren anaerobik litik besiyeri

4- Çocuk hastalar için geliştirilmiş 40 ml soya fasulyesi kazein digest buyyon ve antibiyotik bağlayan reçineli cam boncuklar içeren reçineli besiyeri

5- Mantarlar ve mikobakterileri ileri şekilde saptamak için geliştirilen fakat aynı zamanda bakteriyel patojenleri de üretebilen Myco/F-Lytic besiyeri (Resim 2.8)

5 ml alan çocuk şişeleri hariç bütün BACTEC şişeleri, 10 ml'ye kadar kan alabilmektedir. Sistem diğer cihazlı sistemler ile hem hassasiyet hem de pozitif kültürlerin belirlenmesindeki hız açısından benzerdir (Hasçelik, 2008).



Resim 2.8 BACTEC kan kültür şişeleri

2.10.5.2.3. Versa-TREK (Trek Diagnostic System, Amerika) (ESP Sistemi)

Diğer ticari sistemler ile aynı teknolojiyi kullanmaktadır. Bazı yönlerden BacT/Alert ve BACTEC sisteminden farklılık göstermektedir. Bu sistemde, şişeler cihaza yerleştirildikten sonra şişenin başlık boşluğunda mikroorganizmalar tarafından üretilen veya tüketilen gazlarda (oksijen, hidrojen, nitrojen ve karbondioksit) oluşan basınç değişiklikleri dönüştürücü ile takip edilir (Resim 2.9) (Reisner ve ark., 1999; Koneman ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Haşcelik, 2008). Aerobik (REDOX1) şişeler her 12 dk'da, anaerobik (REDOX2) şişeler her 24 dk'da bir kontrol edilir. Basıncın zamana karşı değerleri, üreme eğrileri elde etmek için kullanılır ve pozitif kültürler cihazın algoritmalarına göre belirlenir. Aerobik şişelerdeki kan-buyyon karışımı her şişede bulunan ufak paslanmaz çelik karıştırma çubuğu ile yapılır. Anaerobik şişeler ise diğer iki sistemde aerobik kültürlerde olduğu şekilde karıştırılır. Versa-TREK sisteminde aerobik şişede temel kültür besiyerine soya kazein-pepton buyyon eklenmiştir ve anaerobik şişede modifiye proteaz-pepton buyyon yer almaktadır (Resim 2.10) (Haşcelik, 2008).



Resim 2.9 Versa-TREK kan kültür sistemi



Resim 2.10 Versa-TREK kan kültür şişeleri

Otomatize kan kültür sistemlerinin üreme saptama yöntemleri, aldıkları şişe sayısı, test döngü sayıları ve çalkalama hızları birbirinden farklıdır. Tablo 2.1’de otomatize sistemlerin bu özellikleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.1 Ticari olarak mevcut olan sürekli monitörize kan kültür sistemlerinin özellikleri

Sistem	Üremeyi saptayan yöntem	Modül kapasitesi (şişe sayısı)	Test Döngüsü (dk)	Çalkalama tipi / hızı
BacT/Alert 240	Karbondioksit, Kolorimetrik	240	10	Sallama/34
BacT/Alert 120	Karbondioksit, Kolorimetrik	120	10	Sallama/34
BacT/Alert 3D	Karbondioksit, Kolorimetrik	240	10	Sallama/34
BACTEC 9240	Karbondioksit, Floresans	240	10	Sallama/30
BACTEC 9120	Karbondioksit, Floresans	120	10	Sallama/30

BACTEC 9050	Karbondioksit, Floresans	50	10	Devamlı rotasyon
Versa-TREK	Manometrik	96-240	12 aerobik 24 anaerobik	Vorteksleme aerobik
Versa-TREK	Manometrik	528	12 aerobik 24 anaerobik	Vorteksleme aerobik

2.11. Dolaşım Sistemi Enfeksiyonlarının Hızlı Tanısında Yeni Teknolojiler

Bakteriyel ve fungal dolaşım sistemi enfeksiyonu insan sağlığı için önemli bir tehdittir. Sepsisli hastalarda mortalite oranı %35-60 arasındadır (Riedel ve ark., 2008; Stefani, 2009). Septik şokta mortalite saatler içinde artmaktadır. Uygun antimikrobiyal tedavinin erken başlaması ağır bakteriyel ve fungal enfeksiyonlardaki mortalite ve morbiditeyi azaltmada tek ve en önemli faktördür. Etkin tedavideki her saatlik gecikme yaşama şansında %7,6'lık azalma ile ilişkilidir. Etkin antibiyotik tedavisinin birinci saatte başlanması ciddi sepsiste sağkalım oranını arttırmaktadır. (Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010; Tsalik ve ark., 2010; Kaleta ve ark., 2011). Bu nedenle kandaki mikrobiyal patojenlerin hızlı tespiti ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması hayati öneme sahiptir (Peters ve ark., 2006; Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010; Kaleta ve ark., 2011).

Dolaşım sistemi enfeksiyonlarının tanısında altın standart olan sürekli monitorize kan kültür sistemleri, Gram boyama, subkültür yapılması ve biyokimyasal ve immunolojik identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılması için mikroorganizmaların üretilmesini sağlar (Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010; Tsalik ve ark., 2010; Kaleta ve ark., 2011). Bununla birlikte, kültür temelli mikrobiyolojik tanı prosedürleri yavaş ve zor üreyen mikroorganizmalar için sınırlı duyarlılığa sahiptir. (Peters ve ark., 2004; Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010) Ayrıca antibiyotik alan hastalarda duyarlılığı düşüktür (Fenollar ve Raoult 2007; Miller ve ark., 2011). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi nükleik asit amplifikasyonuna dayalı hızlı teknolojiler ya da

spesifik patojenler için geliştirilen hibridizasyon problemleri, akım sitometrisi, protein karakterizasyonu temeline dayalı kütle spektrofotometrisi vb. yöntemlerle saatler hatta dakikalar içinde patojen mikroorganizmaların identifikasyonu yapılabilmektedir. Hızlı teknolojilerin mortalite, morbidite, ekonomik yük ve gereksiz antibiyotik kullanımının azalmasına katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (Peters ve ark., 2004; Klouche ve ark., 2008; Wallet ve ark., 2009; Mancini, 2010; Tsalik ve ark., 2010; Kaleta ve ark., 2011).

Patojenlere spesifik nükleik asit ve proteinlerin tespitine yönelik testler, tespit süresinin kısalması, duyarlılığın artması ve antibiyotik ve antimikotik tedavi alanlarda baskılayıcı etkiyi azaltıcı etkiye sahiptir. Ancak moleküler teknikler günümüzde tek tanı yöntemi olmaktan ziyade kan kültürlerine paralel olarak kültürü yapılamayan organizmalar ve kültür sonuçları elde edilmeden önce bazı ilaç dirençlerinin anahtar belirteçlerinin gösterilmesi için kullanılmaktadır. Tüm ilaç dirençleri hâlâ belirlenememekte, ancak metisilin, vankomisin ve karbapenem dirençleri moleküler teknikler ile bakılabilmektedir (Peters ve ark., 2006; Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010; Matsuda ve ark., 2011).

Bakteriyel ve fungal primerler kullanarak korunmuş hedef DNA bölgelerinin tespiti ile tür düzeyinde tanımlama 20 yıl önce tanımlanmış ancak zahmetli olmaları ve karmaşık teknolojileri nedeni ile rutin tetkikler içine girememişlerdir (Klouche ve ark., 2008). Son zamanlarda daha hızlı, standardize edilmiş, bazen doğrudan klinik materyale uygulanabilen, seçilmiş antimikrobiyal direnç genlerinin tespiti de yapılabilen multipleks PZR yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak, kandan direkt olarak çalışılan Septifast (Roche, Basel, İsviçre) ve VYOO (SIRS-Lab, Jena, Almanya) ve pozitif kan kültürlerinden çalışılan Hyplex Bloodscrean (BAG, Lich, Almanya) verilebilir (Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010). Tıbbi önemi olan bakteri ve mantarların identifikasyonu için kullanılan bir başka yaklaşım, değişik spektrofotometrik yöntemler kullanılarak yapılan proteomik profillemesidir. “Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight, Mass Spectrometry” (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi [MALDİ-TOF MS]) ile patojenik mikroorganizmanın

tipik protein profili belirlenerek bakterinin cins ve tür düzeyinde hızlı ve güvenilir identifikasyonu yapılabilir (Klouche ve ark., 2008; Mancini ve ark., 2010).

Kültür metodlarına karşı nükleik asit ya da proteomik temelli patojen tespit teknolojilerinin seçimi öncesinde dikkate alınması gereken bazı önemli noktalar vardır. Bunlar arasında yöntemlerin patojen tespit oranları, canlı ve ölü organizmaları ayırt edebilme yeteneği, antimikrobiyal duyarlılık testi yapılabilmesi, sonuç alma zamanı, metodun teknik karışıklığı, toplam maliyet, zaman ve emek yer alır (Klouche ve ark., 2008).

Kandan mikrobiyal patojenlerin direkt nükleik asit temelli tespit ve identifikasyonu dolaşım sistemi enfeksiyonlarının hızlı tanısı için umut verici testlerdir (Klouche ve ark., 2008; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010). Halen pahalı ve teknik olarak dikkat gerektiren teknolojiler olmasına rağmen etkene yönelik multipleks PZR, patojen mikroarray ve proteomik profillemeye enfeksiyöz hastalık tanısında önemli ve hızlı yöntemler olup yüksek verimlilikte tanısal araç geliştirilmesinde umut vaat etmektedir (Klouche ve ark., 2008). Üç faktör dolaşım sistemi enfeksiyonlarının rutin tanısında moleküler tekniklerin tek başına uygulanmasına engel olmaktadır:

- 1- Yüksek kontaminasyon riski, enfeksiyondan sonra nükleik asitin uzun süre devamlılığı ve geçici bakteriyemi varlığı,
- 2- Düşük bakteriyel yük ve kesin bakteri ve mantar tespiti için sınırlı analitik sensitivite,
- 3- Rutin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yokluğudur (Klouche ve ark., 2008).

Yöntemin geniş bir yelpazede patojen identifikasyon yeteneği olması, standart kültür bazlı identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarının yerine konulamaz. Fakat dolaşım sistemi enfeksiyonlarının tanısındaki gelişmelerde yardımcı olarak kullanılabilir (Klouche ve ark., 2008).

Dolaşım sistemi enfeksiyonlarının hızlı tanısından en fazla yarar sağlayacak hastalar; yüksek bakteriyel yükten dolayı pediatrik hastalar, nötropenikler, transplantasyon ya da yoğun bakım hastaları ve yavaş üreyen/kültürü yapılamayan ya da intrasellüler bakteri ve mantar ile oluşabilecek enfeksiyon için yüksek risk taşıyan hastalardır (Klouche ve ark., 2008).

Moleküler yöntemler patojenleri tanıya eder ve tür düzeyinde bilgi verir. Otomasyon moleküler analizlerde, hız ve verimliliği artırır, kontaminasyon kontrolünü sağlar ve emek ihtiyacını azaltır. Yeni moleküler teknikler yeni buluşlara neden olabilir ve yeni patojenler bulunabilir (Clarridge, 2004; Woo ve ark., 2008).

2.11.1. 16S rRNA Gen Dizi Analizi

Bakteriyel patojenlerin fenotipik yöntemlerle tanıfikasyonu, izolatlar atipik biyokimyasal özellikler gösteriyorsa, biyokimyasal olarak inaktiflerse, üretilmeleri zor veya geç oluyorsa ya da mümkün değilse, tanı için harcanan zaman hasta açısından önemli ise oldukça zor bir süreç haline gelebilir (Drauncourt ve ark., 2000; Woo ve ark., 2008).

Günümüzde moleküler yöntemler, bakteriyel tanıfikasyon için fenotipik testlere yardımcı olarak kullanılmaktadır. En iyi yöntem DNA-DNA hibridizasyon teknikleri olmakla birlikte; yöntem zaman alıcı, zor ve pahalı olduğu için 16S rRNA gen dizisinin analizi kullanılmaktadır (Janda ve Abbott, 2007). 16S rRNA geni, bütün bakterilerde birden fazla kopya halinde bulunan ileri derecede korunmuş bir bölgedir. 16S rRNA geni üzerinde rastgele oluşan değişiklikler, türlerin birbirinden ayrıldığı zamanı doğru bir şekilde yansıtır. Araştırmalar için kullanılabilir büyüklüktedir (yaklaşık 1500 bp). İyi korunmuş ve heterojen bölgeler taşır. Korunmuş bölgeler, tüm bakterilerde aynı gen bölgesinin amplifikasyonunu sağlayan PZR primerleri oluşturulmasını sağlar. Diğer yandan, dizi farklılığı gösteren bölgeler izolatları, cins veya tür düzeyinde sınıflandırmayı sağlar (Janda ve Abbott, 2007; Petti, 2007). 16S rRNA dizi analizi yeni patojenlerin keşfinde, yeni cins ve türlerin belirlenmesinde, taksonomik güncellemelerin yapılmasında, kültürde üretilmeyen, biyokimyasal

olarak inaktif olan, nazlı veya yavaş üreyen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan veya oluşturulma ihtimali olan enfeksiyonlarda etken belirlenmesinde, antibiyotik tedavisi alan hastalarda etkenin belirlenmesinde, steril örneklerde etkenin hızlı bir şekilde belirlenmesinde, biyokimyasal profilleri belli bir bakteri türü ile eşleşmeyen izolatlarda, ticari sistemlerle düşük olasılıklı eşleşmeler veren izolatlarda, insanlarda enfeksiyon oluşturduğuna dair sınırlı bilgi bulunan türlerin tespiti durumunda cins ve tür identifikasyonunun sağlanmasında kullanılabilir (Drauncourt ve ark., 2000; Woo ve ark., 2008). Yöntemin çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Seçici olmadığından örnekte bulunan herhangi bir bakteriyi (kültürde üretilmeyen biyokimyasal olarak inaktif olan, nazlı veya yavaş üreyen, üremek için özel gereksinimleri olan, hasarlanmış veya canlılığını kaybetmiş) identifiye edebilir. Hızlı sonuç verir. Standart tanı testlerinin negatif bulunduğu durumlarda alternatif bir tanı aracıdır. Antibiyotik tedavisi başlanan hastalarda 16S rRNA dizi analizi ile pozitif sonuç alınması olasılığı PZR ve kültüre oranla istatistiksel olarak daha anlamlıdır. Nükleotid dizisinin değerlendirilmesi fenotipik özelliklere kıyasla daha net ve kesin sonuç verir. Modern cihazlardan elde edilen sekans elektroferogramları, elektronik formatta arşivlenebilir ve daha sonra yapılacak laboratuvar ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir. Dezavantajları arasında, pahalı olması, teknik donanım ve deneyimli personel gerektirmesi, bazı tür ve alt türlerin ayrımını sağlayacak yeterli ayırım gücüne sahip olmaması sayılabilir. Bazı bakteriler (*Campylobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium* türleri), 16S rRNA analizi ile sadece cins düzeyine kadar tanımlanabilmektedir. Bunun nedeni, tür içi değişkenliğin az olması, belli bir cins içerisindeki farklı türlerin 16S rRNA gen dizilerine veritabanında yeterince yer verilmemesi, belli bir cins içindeki türleri birbirinden ayıracak yeterince doğrulayacak biyokimyasal test bulunmaması veya organizmanın bilinen bir tür içinde henüz isimlendirilmemiş bir tür olması gibi nedenler olabilir. Yöntem uygulanması için standart klavuzlar yoktur ve sonuçların değerlendirileceği veri tabanı bulunmamaktadır. Mikroorganizmaların 16S rRNA dizi analizi ile doğru bir şekilde isimlendirilebilmesi için; veritabanlarında o organizmaya ait güvenilir dizilerin yer alması ve bu dizilere doğru isimlerin verilmiş olması gereklidir. GenBank gibi herkesin kullanımına açık veritabanlarında, denetleme ve güncelleme yapılmaması nedeniyle mevcut verilerdeki hata payları

yüksektir. Veritabanına kaydedilen standart suşların doğru isimlendirilmemesi, isimlendirme ve taksonomide yapılan değişikliklerin veritabanına yansıtılmaması durumunda yanlış isimlendirme ortaya çıkmaktadır (Petti, 2007; Woo ve ark., 2008).

16S rRNA analizi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bakterilerin identifikasyonu için rutin yöntemlerle beraber kullanılabilir yararlı bir yöntemdir. Ancak, analiz uygulamaları ve sonuçlarının yorumlanması için genel kabul görmüş bir kılavuz ve tamamlanmış 16S rDNA dizi veritabanı bulunmamaktadır (Drauncourt ve ark., 2000).

2.11.2. ITS Gen Dizi Analizi

Mantarlar da klasik yöntemler ile biyokimyasal olarak, morfolojik görünüm ve mikroskopik incelemeler ile tiplendirilmektedir. Mantarlar gibi ökaryotik hücrelerde de bakteriyel 16S rRNA gen bölgesi gibi rDNA gen bölgesi tanımlanmıştır. Önemli mantarların gen bölgeleri bakteriler kadar iyi sistematize edilmemiştir. Ancak moleküler teknikler ile mantarların hızlı tespit ve tanısı yapılabilmektedir. 18S, 5.8S ve 28S bölgesinde bulunan ITS1 ve ITS2 bölgeleri bu amaçla kullanılabilir. 18S ile 5.8S bölgesi arasında ITS1, 5.8S ile 28S bölgesi arasında ITS2 yer almaktadır. ITS bölgeleri *Candida*, *Aspergillus*, kriptokok gibi önemli türleri tanımlamada kullanılabilir (Petti, 2007; Bellemain ve ark., 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Borik asit (H_3BO_3 , Amresco, Amerika)

DNA pürifikasyon kiti, Roche High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya)

dNTP karışımı (200mM stok, Vivantis, Malezya)

Etidyum bromid (Amresco, Amerika)

Etilen diamin tetra asetik asit, EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, Merck, Almanya)

Fungal ITS1 ve ITS4 primer dizileri (Biomer, Almanya)

Litikaz (İmmuno Yeast Lytic Enzyme – *Arthrobacter luteus*- MP Biomedicals Inc.)

Magnezyum klorür, $MgCl_2$ (50mM, Vivantis, Malezya)

Moleküler agaroz (Vivantis, Malezya)

Moleküler büyüklük belirteci (Bio Basic Inc. 50 Loading 50 – 1000 bp DNA Marker H_2 , Bio Basic, Kanada)

Moleküler büyüklük belirteci (O'Range Ruler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litvanya)

Sekans temizleme kiti, Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter Genomics, Amerika)

Sığır serum albümini, BSA (moleküler çalışma için, 1mg/ml, Fermentas, Litvanya)

Sodyum hidroksit, NaOH (Merck, Almanya)

Sodyum sitrat, Natrium citricum neutrale, $Na_3C_6H_5O_7 + 5 \frac{1}{5} H_2O$ (Merck, Almanya)

Taq DNA Polimeraz (Vivantis, Malezya)

10 X Taq Tampon, 10 X Vi BufferA ($MgCl_2$ 'süz) 50 mM KCl, 100mM Tris HCl, (pH 9.1 at 20 C°), % 0,1 Triton™ X-100 (Vivantis, Malezya)

Trisma base ($NH_2C(CH_2OH)_3$, Sigma, Amerika)

Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3$ -HCl, Applichem, Danimarka)

Yükleme solüsyonu (6X O'Range DNA Loading Dye, Fermentas, Litvanya)

16S rRNA fD1, 800R ve 610R primer dizileri (Biomer, Almanya)

3.1.2. Araçlar

Buzdolabı (Regal, Türkiye)

Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)

Elektroforez güç kaynağı (EC Apparatus corporation EC 250-90, Amerika)

Elektroforez tankı (Thermo EC340 Minicell primo, Amerika)

Enjektör 2,5 ml'lik (Aysset, Türkiye)

Eppendorf tüpleri 1,5 ml (Neptüne CLP, Meksika)

Etüv (Heraeus, Almanya)

Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada)

Hassas terazi (Sartorius, Almanya)

Kuru ısıtıcı blok (Techne DR-1 Block DB2A, İngiltere)

Manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya)

Mikrodalga fırın (Beko, Türkiye)

Otomatik pipetler (Thermo, Amerika)

pH metre (Hanna, Portekiz)

Steril 200 µl PZR tüpü (Thermo, Amerika)

Steril 200 µl pipet uçları (Thermo, Amerika)

Steril 1000 µl pipet uçları (Thermo, Amerika)

Soğutmalı mikrosantrifüj cihazı (Hermle Z233 MK-2, Almanya)

Su banyosu (Techne, İngiltere)

Termal döngü cihazı (Techne TC-412, İngiltere)

UV transilluminatör (Vilber-Lourmat TFX-20M, Fransa)

Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

Alkali Yıkama Solüsyonu

0,5 M NaOH

0,05 M Nasitrat

Tris-EDTA (TE) Tamponu pH=8

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

TBE (Tris-Borik asit-EDTA) 10X pH=8

890 mM Tris HCl

890 mM Borik asit

20 mM EDTA

TBE 0.5X

100 ml 10X TBE tamponu 1900 ml distile su ile sulandırılır.

3.2. Yöntemler

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Tanı ve Araştırma Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2.1. Kan Kültürleri

Çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından Mart 2005 ile Ağustos 2008 tarihleri arasında toplanan 218 tane yalancı pozitif kan kültür şişesi kullanılmıştır. Bu kan kültür şişeleri, BACTEC (BD Diagnostics, ABD) otomatize kan kültür cihazında üreme sinyali veren ancak rutin mikrobiyolojik incelemeler için kanlı agar, MacConkey agar, çikolata agar ve saboraud dekstroz agara yapılan ekim sonrasında üreme saptanamayan şişelerdir. Şişelerin hepsi, çalışma tarihine kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çalışmaya alınan yalancı pozitif kan kültür şişelerinden başka, standart suş olarak *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 inoküle edilen kan kültür şişeleri ile, cihazda üreme sinyali verip Gram pozitif ve Gram

negatif bakteri ve *Candida* spp. üremesi tespit edilen ikişer adet kan kültür şişesi pozitif kontroller olarak çalışmaya alınmıştır. İnokulasyon yapılmamış iki kan kültür şişesi negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Kan Kültür Şişelerinden DNA Ekstraksiyonu

Çalışmaya alınan 218 tane kan kültür şişesinden olası bakteri ve mantar DNA'sının elde edilmesi için iki ayrı yöntemle DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA ekstraksiyonunda, literatürde belirtilen alkali yıkama/lizis metodu kullanıldı (Millar ve ark., 2000).

Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu:

1. Kan kültür şişesinden 500 µl kan 1,5 ml'lik steril tüpe alındı. Üzerine 1000 µl alkali yıkama solüsyonu eklendi ve karışım 10 dakika kuvvetle çalkalandı.
2. 13000 xg'de 5 dakika santrifüjlendi.
3. Üstteki sıvı döküldü ve çökelti üzerine 500 µl 0,5 M Tris-HCl eklenip vortekslendi.
4. Tekrar 13000 xg'de 5 dakika santrifüjlendi.
5. Üstteki sıvı atıldı ve Tris-HCl ile yıkama işlemi tekrarlandı (3 ve 4. basamaklar).
6. Çökelti üzerine 100 µl TE tamponu eklendi.
7. Tüp 100 °C'de 1 saat inkübe edilip -20 °C'de 30 dakika donduruldu. 100 C°de çözdürüldükten sonra kısaca vortekslendi.
8. 7. Basamaktaki kaynatma-dondurma işlemi bir kez daha tekrarlandı.
9. 13000 xg'de 15 dakika santrifüjlendi.
10. Üstte oluşan sıvı kısım temiz bir tüpe alınıp PZR yapılana dek -20 °C'de saklandı.

Fungal DNA Ekstraksiyonu:

1. 1-5. Basamaklar bakteriyel DNA ekstraksiyonunda belirtilen şekilde yapıldı.
2. Çökelti üzerine 500 µl TE ve 5 µl litikaz (0,5 mg/ml) eklendi ve 30 °C'de 1 saat inkübe edildi.

3. Bakteriyel DNA ekstraksiyonundaki 7-10. basamaklar uygulandı.

3.2.3. PZR Protokolü

3.2.3.1. Örneklerin Hazırlanması

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen DNA'lar bakteriyel 16S ribozomal RNA geni ve fungal ITS gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonu için şablon olarak kullanıldı.

3.2.3.2. Primerlerin Seçilmesi

PZR işleminde bakteriyel 16S rRNA geninin amplifikasyonu için universal fD1, 800R primerleri; fungal ITS bölgesinin amplifikasyonu için ITS1 ve ITS4 primerleri kullanıldı. Bu primerler ile yapılan PZR işlemi sonunda bakteri için 800 bç ve mantar için 500 bç'lik ürün oluşmaktadır. Bakteriyel 16S rRNA geni sekans analizi için fD1 ve 610R primerleri kullanılmıştır. Primer dizileri tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 PZR ve sekans analizinde kullanılan primerler

Gen	Primer	Bç büyüklüğü
16S rRNA	fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')	~ 800
	800R (5'-GAG TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3')	
	610R (5'-TAC CGC GGC TGC TGG CAC-3')	~ 600
Fungal ITS	ITS1 (5'-TTC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')	~ 500
	ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')	

3.2.3.3. PZR Amplifikasyonu

Bakteriyel 16S rRNA geninin amplifikasyonu için PZR karışımı, toplam hacim 50 µl olacak şekilde 10X PZR tamponu (50 mM KCl, 100mM Tris HCl, % 0,1 TritonTM X-100), 1.5 U Taq DNA polimeraz, 50 pmol fD1 ve 800R primerleri, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP'nin herbirinden, %0,5 BSA (1mg/ml) ve 7,5 µl DNA şablonu

içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon işlemi otomatik termal döngü cihazında (Techne TC-412, İngiltere) şu şartlar altında gerçekleştirilmiştir: 94 °C’de 5 dakika ilk denatürasyonu takiben “touchdown” PZR protokolü uygulanmıştır. 2 siklus 94 °C’de 1 dakika denatürasyon, 58 °C’de 1 dakika bağlanma, 72 °C’de 1 dakika uzama; 2 siklus 94 °C’ de 1 dakika denatürasyon, 56 °C’de 1 dakika bağlanma, 72 °C’de 1 dakika uzama; 35 siklus 94 °C’de 1 dakika denatürasyon, 54 °C’de 1 dakika bağlanma, 72 °C’de 1 dakika uzama uygulanmış, 72 °C’de 7 dakika son uzamayı takiben elde edilen PZR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur.

Bakteri PZR Karışımı

dH ₂ O	→ 25,45 µl
10X Tampon	→ 5 µl
50 mM MgCl ₂	→ 1,5 µl
2000µM dNTP stok	→ 5 µl
20 pmol fD1 primeri	→ 2,5 µl
20 pmol 800R primeri	→ 2,5 µl
5U/µl Taq DNA Polimeraz	→ 0,3 µl
1mg/ml BSA	→ 0,25 µl
<u>DNA</u>	<u>→ 7,5 µl</u>
Toplam hacim	→ 50 µl

Bakteri PZR Programı

İlk denatürasyon	94 C°’de 5 dakika	
Denatürasyon	94 C°’de 1 dakika	} 2 siklus
Bağlanma	58 C°’de 1 dakika	
Uzama	72 C°’de 1 dakika	
Denatürasyon	94 C°’de 1 dakika	} 2 siklus
Bağlanma	56 C°’de 1 dakika	
Uzama	72 C°’de 1 dakika	

Denatürasyon	94 C°'de 1 dakika	}	35 siklus
Bağlanma	54 C°'de 1 dakika		
Uzama	72 C°'de 1 dakika		
Son Uzama	72 C°'de 7 dakika		
Saklama	4 C°'de en fazla 24 saat		

Fungal ITS bölgesi amplifikasyonu için uygulanan PZR analizi için PZR karışımı toplam hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 10X PZR tamponu , 1.5 U Taq DNA polimeraz, 50 pmol ITS1 ve ITS4 primerleri, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP'nin herbirinden, %0,5 BSA (1mg/ml) ve 7,5 µl fungal DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. PZR işlemi otomatik termal döngü cihazında şu şartlar altında gerçekleştirilmiştir: 94 °C'de 5 dakika ilk denatürasyonu takiben toplam 35 siklus olacak şekilde 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika bağlanma ve 72 °C'de 1,5 dakika uzama uygulanmış, 72 °C'de 5 dakika son uzamayı takiben oluşan PZR ürünleri%2 agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur.

Fungal PZR Karışımı

dH ₂ O	→ 25,45 µl
10X Tampon	→ 5 µl
50mM MgCl ₂	→ 1,5 µl
2000µM dNTP stok	→ 5 µl
20 pmol ITS1 primeri	→ 2,5 µl
20 pmol ITS4 primeri	→ 2,5 µl
5U/ml Taq Polimeraz	→ 0,3 µl
1 mg/ml BSA	→ 0,25 µl
<u>DNA</u>	→ 7,5 µl
Toplam hacim	→ 50 µl

Fungal PZR Programı

İlk Denatürasyon	94 C°'de 5 dakika		
Denatürasyon	95 C°'de 1 dakika	}	35 siklus
Bağlanma	55 C°'de 1 dakika		
Uzama	72 C°'de 1,5 dakika		
Son Uzama	72 C°'de 5 dakika		
Saklama	4 C°'de en fazla 24 saat		

3.2.3.4. PZR Ürünlerinin Değerlendirilmesi

Elde edilen PZR ürünlerinin 10 µl'si, 2µl yükleme solüsyonu (6X O'range DNA Loading Dye, Fermentas, Litvanya) ile karıştırılarak 0,5X TBE ile hazırlanan ve 10 mg/ml etidyum bromid ile boyanan %2'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez işlemi, 100V altında 2 saatte gerçekleştirildi. Jel, UV transilluminatör (Vilber-Lourmat TFX-20M, Fransa) altında incelendi. PZR ürününün büyüklüğü, DNA büyüklük belirteci (Bio Basic Inc. 50 Loading 50 – 1000 bp DNA Marker H₂ veya Fermentas O'Range Ruler 50 bp DNA Ladder) bantları ile karşılaştırılarak değerlendirildi ve fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntüldü.

3.2.4. PZR Ürünlerinin Sekans Analizi İçin Temizlenmesi

Bant görülen PZR ürünleri, DNA pürifikasyon kiti (High Pure, Roche, Almanya) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda temizlendi. Bunun için,

1. 100 µl PZR ürünü üzerine 500 µl bağlama tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.
2. Temiz mikrosantrifüj tüpü içine filtre tüpü yerleştirildi ve bu karışım filtre üzerine aktarıldı.
3. 30-60 saniye 13000 xg'de santrifüjlendi.
4. Filtre tüpünün alt kısmında mikrosantrifüj tüpü içinde biriken sıvı döküldü ve filtre yeniden yerleştirildi.
5. 500 µl yıkama tamponu eklendi ve 13000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi.
6. Altta sıvı döküldü ve 200 µl yıkama tamponu eklendi.

7. Tekrar 13000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi.
8. Filtre tüpü yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.
9. 50-100 µl elusyon tamponu eklendi ve 13000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi.
10. Temizleme sonrasında elde edilen DNA'lar DNA dizi analizinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.2.5. DNA Dizi Analizi

3.2.5.1. Sekanslama Döngüsü

DNA sekans işlemine başlamadan önce sekans döngüsü yapıldı. Temizlenmiş PZR ürünü 94 °C'de 4 dakika denatüre edilerek zincirler birbirinden ayrıldı. Daha sonra toplam hacim 20 µl olacak şekilde 5 µl premiks (içeriği aşağıda yazılı), 3,2 pmol primer, 50-100 ng'lık 5 µl pürifiye PZR ürünü ve kalan miktarı da 8 µl ddH₂O konularak sekanslama karışımı hazırlandı. Premiks (Beckman Coulter GenomeLab DTCS Quick Start Kit, ABD), 10X sequencing reaction buffer, dNTP karışımı, ddUTP Dye Terminator, ddGTP Dye Terminator, ddCTP Dye Terminator, ddATP Dye Terminator, DNA polimeraz enziminden oluşmaktadır. Hazırlanan karışım PZR cihazına konularak 94 °C'de 3 dakika ilk denatürasyonu takiben 34 döngü olacak şekilde 96 °C'de 20 saniye denatürasyon 48 °C'de 20 saniye yapışma ve 60 °C'de 4 dakika uzama olacak şekilde sekans döngüsü gerçekleştirildi.

3.2.5.2. Ürünlerin Temizlenmesi ve Sekans Cihazına Yüklenmesi

Sekans döngüsünden alınan örnekler Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter, Amerika) sekans temizleme kiti ile temizlendi. Bunun için, "AB gene plak" (Beckman Coulter, Amerika) içine konulan 20 µl PZR ürününün üzerine, içinde manyetik boncuk bulunan "Agencourt CleanSEQ" solüsyonundan 20 µl ve %85'lik etanolden 62 µl eklendi ve 7-8 defa pipetaj yapıldı. Bu plak, manyetik boncukları tutmayı sağlayan mıknatıslı "SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) plak" üzerinde, üzerine bastırılarak 10 dakika beklendi ve "SPRI plak" üzerinde manyetik boncuklara dokunmadan, pipetle alkol uzaklaştırıldı. Tekrar %85'lik alkolden 100 µl

eklendi ve 3 dakika üzerine bastırılarak beklendi. Alkol tekrar uzaklaştırıldı. “AB gene plak” “SPRI plak” üzerinden alındı ve ters çevrilip oda koşullarında 10 dakika kurutma işlemi gerçekleştirildi. Üzerlerine 40 µl taze örnek yükleme solüsyonu (Sample loading solution, SLS: formamid içerir) eklendi ve kuyucukların içi temizleninceye kadar pipetaj yapılarak örneğin iyice çözünmesi sağlandı. Çözünen örnekler “AB gene plak”tan “Beckman sample plak” (Beckman Coulter, Amerika) üzerine aktarıldı. Örneklerin üzerine birer damla mineral yağ damlatıldı ve diğer kuyucuklar da SLS ile dolduruldu. Beckman tampon plağının (Beckman Coulter, Amerika) dörtte üçü dolacak şekilde tampon eklenip plak CEQ 8000 (Beckman Coulter, Amerika) otomatik dizi analizi cihazına yüklendi. Cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı ile sonuçların çıktıları (elektroferogram) elde edildi.

3.2.5.3. Sekans Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Analiz sonucunda elde edilen nükleotid dizileri, elektroferogramların gözle değerlendirilmesi ile kontrol edildi. Her iki yönde yapılan sekans analiziyle elde edilen diziler eşleştirildi. Doğrulanmış diziler, internette yer alan BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) kullanılarak Gen bankasında kayıtlı dizilerle karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Cebeci Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mart 2005 ile Ağustos 2008 tarihleri arasında gelen 218 yalancı pozitif sinyal veren şişe kullanılmıştır. Bu süre içinde laboratuvara toplam 53942 kan kültür şişesi gelmiştir. Bu şişelerin 46453 tanesinde (%86) üreme olmamıştır. Geri kalan 7489 şişe (%14) pozitif üreme sinyali vermiştir. Bu 7489 şişenin 7271 (%97,1) tanesinde pasajlarda üreme gözlenmiş, 218 tanesinde (%2,9) rutin mikrobiyolojik incelemeler sonucu üreme olmamıştır. Yalancı pozitiflik oranı tüm şişeler içinde %0,4, gerçek pozitiflik oranı %11,1'dir.

Üniversal bakteriyel 16S ribozomal RNA gen bölgesi için yapılan PZR işlemi sonucunda 218 örneğin altı tanesinde (%2,75) ürün gözlenmiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1 Üniversal bakteriyel 16S rRNA gen bölgesi için yapılan PZR fotoğrafı. [M: Moleküler büyüklük belirteci (O'Range Ruler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litvanya)], NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol

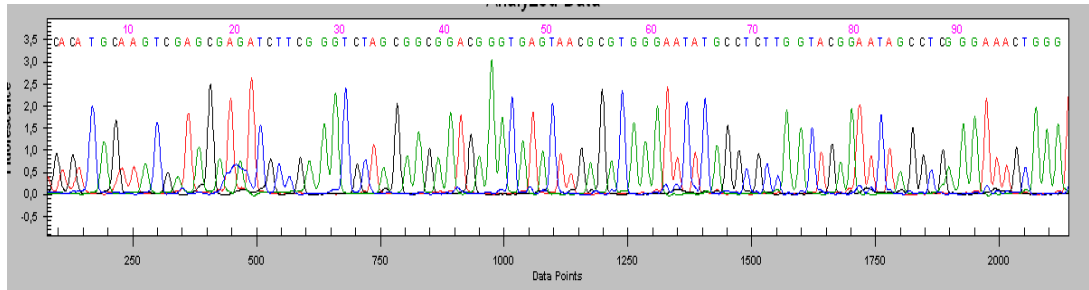
Fungal "internal transcribed spacer" (ITS) gen bölgesi için yapılan PZR işlemi sonucunda 218 örneğin hiçbirinde bant elde edilmemiştir (Resim 4.2).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 NK PK



Resim 4.2 Fungal ITS gen bölgesi için yapılan PZR fotoğrafı. [M: Moleküler büyüklük belirteci (O'Range Ruler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litvanya)], NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol

Üniversal bakteriyel 16S ribozomal RNA iki yönlü bölgesi için yapılan PZR işlemi sonucunda bant elde edilen altı tane örneğin DNA dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotid dizileri internette yer alan BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) kullanılarak Gen bankasında kayıtlı dizilerle karşılaştırıldı.



Resim 4.3 Bir örneğe ait DNA dizi analizi elektroferogram görüntüsü.

Karşılaştırma sonucunda elde edilen eşleşmeler aşağıda verilmiştir.

1. örnek (369 baz)

- 353/371 uyumlulukla (%96) *Actinomyces odontolyticus* ATCC 17982,
- 352/371 uyumlulukla (%95) *Actinomyces odontolyticus* F0309,
- 322/356 uyumlulukla (%91) *Jonesia denitrificans* DSM 20603 olarak bulundu.

2. örnek (407 baz)

- 402/407 uyumlulukla (%99) *Campylobacter coli*,
- 402/407 uyumlulukla (%99) *Campylobacter jejuni*,
- 397/407 uyumlulukla (%98) *Campylobacter lari* olarak bulundu.

3. örnek (443 baz)

- 430/447 uyumlulukla (%97) *Paracoccus denitrificans*,
- 426/445 uyumlulukla (%96) *Rhodobacter capsulatus*,
- 422/448 uyumlulukla (%95) *Rhodobacter sphaeroides* olarak bulundu.

4. örnek (315 baz)

- 288/310 uyumlulukla (%93) *Hoeflea phototrophica*,
- 294/319 uyumlulukla (%93) *Mesorhizobium spp.*,
- 293/318 uyumlulukla (%93) *Mesorhizobium loti*,
- 294/320 uyumlulukla (%92) *Brucella abortus* olarak bulundu.

5. örnek (88 baz)

- 87/88 uyumlulukla (%99) *Haemophilus influenza*,
- 85/87 uyumlulukla (%98) *Haemophilus parasuis*,
- 85/87 uyumlulukla (%98) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* olarak bulundu.

6. örnek (397 baz)

- 365/395 uyumlulukla (%93) *Cellulomonas flavigena*,
- 365/398 uyumlulukla (%92) *Sanguibacter keddiei*,
- 360/397 uyumlulukla (% 91) *Janibacter spp.* olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

Bakteriyemi ve sepsis yüksek mortalite ve morbiditeyle seyreden, erken tanı konulup tedavi edildiğinde mortalite oranlarının azaldığı klinik bir tablodur. Bakteriyeminin hızlı tanısı, olası etkenin izolasyonu, antimikrobiyallere duyarlılığının saptanarak gerekli tedavinin düzenlenmesi ve sağkalım açısından önem taşır (Obara ve ark., 2011). Bakteriyemiye bağlı mortalite oranları merkezden merkeze değişmekle beraber %12-80 arasında olup ortalama %35 civarındadır (Erbay ve ark., 2003; Mehli ve ark., 2007; Paolucci ve ark., 2010). Bu hastalarda hızlı ve doğru antibiyotik tedavisi önemli olup, yetersiz tedavi mortalite riskini 5 kat arttırmaktadır (Pletz ve ark., 2011; Bloos ve ark., 2012).

Dolaşım sistemi enfeksiyonlarının yaklaşık %30-40'da kan kültürleri pozitif bulunur (Klouche ve ark., 2008; Towns ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda kan kültürlerinin pozitiflik oranı %14 bulunmuştur. Luzzaro ve ark.'nın çalışmasında pozitiflik oranı %18,1 olarak bulunurken, ülkemizde yapılan çalışmalarda bu oran %8,6-32,95 arasında bildirilmiştir (Demir ve ark., 2003; Durmaz ve ark., 2003; Sucu ve ark., 2005; Yüce ve ark., 2005; Sevim ve ark., 2007; Kurtoğlu ve ark., 2008; Wilke ve Azak, 2011). Pozitiflik oranının düşük olmasının nedeni enfeksiyonun lokal olması, yetersiz miktarda kan alınması, kan kültürünün uygun zamanda alınmaması, hastanın kültür alınmadan önce antibiyotik kullanması olabilir. Özellikle çocuk acile başvuran hastalardan kan kültürü alınmasının rutin bir yaklaşım olması da pozitiflik oranının düşük olmasına açıklar. Yavaş üreyen mikroorganizmalar, bazı zor üreyen bakterilerde, bakteriyel ve mantar yükü düşük olduğunda, önceden antimikrobiyal ve antimikotik tedavi alanlarda pozitiflik oranı azalabilir (Peters ve ark., 2004; Fenollar ve Raoult, 2007; Klouche ve qrk., 2008; Casalta ve ark., 2009; Jarvinen ve ark., 2009; Ecker ve ark., 2010; Mancini ve ark., 2010).

Kan kültür sistemlerinde yalancı pozitif sinyal verme oranı % 0,3-10,4 arasında değişmektedir (Nolte ve ark., 1993; Smith ve ark., 1995; Cockerill ve ark., 1997; Ziegler ve ark., 1998; Qian ve ark., 2001; Demir ve ark., 2003; Durmaz ve ark., 2003; Daxboeck ve ark., 2004; Sucu ve ark., 2005; Mehli ve ark., 2007). Bizim

çalışmamızda da 7489 üreme sinyali veren şişeden 218'i (%2,9) yalancı pozitif olarak değerlendirildi. Bu dönem içerisinde değerlendirilen tüm şişeler dikkate alındığında yalancı pozitiflik oranı %0,4 idi.

Kan hücrelerinin ürettiği CO₂ miktarındaki artma ya da lökosit düzeylerinin yüksek olması, otomatize kan kültür sistemlerinde yalancı pozitif sinyal oluşmasına neden olabilir (Nolte ve ark., 1993; Qian ve ark., 2001; Daxboeck ve ark., 2004). Ayrıca üremesi yavaş ve zor olan ya da kültürü yapılamayan mikroorganizmalarla anaerobik mikroorganizmaların varlığı da yalancı pozitif sinyale neden olabilir. *S. pneumoniae* gibi bazı bakteriler parçalanmaya yatkındır ve sinyal varlığına rağmen pasajlarda üreme olmayacağı için yalancı pozitif sinyal olarak değerlendirilir (James ve Al-Shafi, 2000; Qian ve ark., 2001; Marlowe ve ark., 2003; Karahan ve ark., 2006). Kan kültür şişelerinin fabrikasyon aşamasında çevrede bulunabilen ve insanlarda enfeksiyon yapmayan mikroorganizma DNA'ları ile kontamine olması ile DNA fragmanlarının şişelerde bulunması sonucu da cihaz pozitif sinyal vermiş olabilir (Fredricks ve Relman, 1998; Karahan ve ark., 2006). Kültürlerin pozitif sinyal verip pasajlarda üreme olmamasının bir başka nedeni antibiyotik kullanımı ile bakterilerin L-formuna dönüşmesi olabilir (Karahan ve ark., 2006).

PZR'da etken tespit edilip kan kültürünün negatif olmasının nedeni kültürün antibiyotik alımı sonrası alınması olabilir. Ancak kültür pozitif olup PZR negatif sonuçlar da olabilir. Bunun nedeni hasta örneğinde bulunan inhibitör maddelerin etkisidir (Tsalik ve ark., 2010). DNA ekstraksiyonu sırasında kullanılan etanol de PZR'nın negatif çıkmasına neden olabilir (Tsalik ve ark., 2010). PZR sırasında lökosit sayısının 30.000/mm³ ve üzerinde olması PZR'yi inhibe edebilir. Bunun nedeni bakteriyel DNA/insan genomik DNA oranının düşük olmasıdır (Jordan ve Durso, 2005; Wallet ve ark., 2010).

Kan kültürleri, nispeten uzun sürede sonuç alınmasına rağmen sepsis tanısında altın standarttır (Sevim ve ark., 2007; Gaibani ve ark., 2009; Bauer ve Reinhart, 2010; Paulocci ve ark., 2010; Tsalik ve ark., 2010; Wallet ve ark., 2010; Pletz ve ark., 2011; Bloos ve ark., 2012). Örnekler, cihaz sinyal vermediği sürece beş güne kadar

sistemde tutulmaktadır (Tsalik ve ark., 2010; Obara ve ark., 2011). Üreme olan kan kültüründen patojenlerin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması yaklaşık 24-72 saat sürmektedir (Dierkers ve ark., 2009; Paulocci ve ark., 2010; Tsalik ve ark., 2010; Wallet ve ark., 2010; Hettwer ve ark., 2011; Obara ve ark., 2011; Lodes ve ark., 2012). Bu gecikme nedeniyle sepsis tanısını klinisyenler sıklıkla klinik semptomlara göre koymakta ve antibiyotik tedavisine klinik duruma göre başlamaktadırlar (Lehmann ve ark., 2010; Wolk ve Dunne, 2011). Gram boyama sonuçlarına göre klinisyen tedaviyi yönlendirmektedir. Ancak geniş spektrumlu ampirik tedavi, mortalite hızının artmasına ve antibiyotik direncine neden olmaktadır. (yavaş, zor üreyen, kültürü yapılamayan organizmalar ve polimikrobiyal etken varlığında süre daha da uzamaktadır) (Wolk ve Dunne, 2011). Yavaş ve zor üreyen organizmalarla ortaya çıkan bakteriyemilerde, invaziv fungal enfeksiyonlarda ve kan almadan önce antibiyotik tedavisi alanlarda kan kültürlerinin duyarlılığı düşüktür (Gaibani ve ark., 2009; Paolucci ve ark., 2010; Pletz ve ark., 2011). Yenidoğanlarda az miktarda kan alınması ve buna bağlı bakteriyel yük düşüklüğünden duyarlılığı düşüktür (Gaibani ve ark., 2009). Pozitiflik oranı alınan kan miktarı, antibiyotik tedavisi, steril şartlarda alınması ve transport şartlarından etkilenir (Bloos ve ark., 2012).

Kan kültürlerinde etken mikroorganizmanın tespiti için moleküler tekniklerin kullanımı ile, zor ve yavaş üreyen organizmalar için duyarlılık ve özgülüğün artırılması, kısa sürede sonuç alınması ve antibiyotiklerin inhibitör etkisinin ekarte edilmesi amaçlanmaktadır (Dierkers ve ark., 2009; Gaibani ve ark., 2009; Lilienfeld-Toal ve ark., 2009; Tsalik ve ark., 2010; Pletz ve ark., 2011; Bloos ve ark., 2012). Kültürden bağımsız moleküler teknikler kültürde yavaş ve zor üreyen bakteri ve mantar enfeksiyonlarında tanıda yardımcıdır (Bauer ve Reinhart, 2010).

Konvansiyonel yöntemlerle moleküler yöntemlerin kan kültürlerinde mikroorganizma tespit etme oranlarını araştıran çalışmalarda genel olarak moleküler yöntemler ile daha fazla mikroorganizma tespit edilmiştir (Tablo 5.1.)

Tablo 5.1 Çeşitli çalışmalarda konvansiyonel yöntemler ile moleküler yöntemlerin mikroorganizma tespit etme oranları

Moleküler yöntemler (%)	Konvansiyonel yöntemler (%)	Kaynak
33	20,4	Mancini ve ark., 2008
27,4	21	Dierkers ve ark., 2009
88	37	Westh ve ark., 2009
34,7	16,5	Bauer ve Reinhart, 2010
25	12,8	Lehhman ve ark., 2010
27	15	Obara ve ark., 2011
30,2	14,5	Bloos ve ark., 2012
39,9	20,3	Lodes ve ark., 2012

Öte yandan kan kültürünün PZR'a avantajı üreme tespit edilince antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesidir (Westh ve ark., 2009; Paolucci ve ark., 2010; Pletz ve ark., 2011).

Çalışmalar sonucunda PZR'nın, kan kültürlerine ilave olarak kullanılabileceği sonucu çıkmıştır (Westh ve ark., 2009; Hettwer ve ark., 2011; Bloos ve ark., 2012). PZR kan kültürlerine ilave olarak enfeksiyonda hızlı identifikasyonda kullanılabilir (Tsalik ve ark., 2010). Moleküler teknikler kan kültürlerinin yerine konulamaz, çünkü antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasına olanak vermez (Gaibani ve ark., 2009; Pletz ve ark., 2011). PZR, kültür negatif vakalarda etkili antibiyotik tedavisinin erken başlanması için klinik olarak yararlı olabilir (Obara ve ark., 2011).

Yalancı pozitif sinyal veren otomatize sistemlerde kan kültürlerinden PZR ile DNA bakılması çeşitli literatürlerde önerilmektedir (Qian ve ark., 2001; Daxboeck ve ark., 2004; Karahan ve ark., 2006; Jordan ve ark., 2009; Wallet ve ark., 2010). Qian ve ark. (2001) çalışmalarında yalancı pozitif sinyal veren şişelerde 16S rDNA ile araştırma yaptıklarında hiçbirinde bakteri tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Marlowe ve ark., (2003) yalancı pozitif sinyal veren şişelerde DNA prob yöntemi ile bakteri tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Daxboeck ve ark. (2004) yalancı pozitif sinyal veren şişelerde bakteriyel 16S rDNA ve fungal 18S rDNA yöntemi ile bakteri tespit edememişlerdir. Karahan ve ark. (2006) çalışmalarında bakteriyel PZR ile yalancı pozitif sinyal veren şişelerin %9,6'sında bakteri tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da yalancı pozitif sinyal veren şişelerin %2,75'inde PZR ile bakteri tespit edilmiştir.

Çalışmamızda yalancı pozitif sinyal veren 218 şişenin altısında (%2,75) bakteriyel 16S rRNA PZR ve DNA dizi analizi yöntemleri ile bakteri identifiye edilmiştir. Sekans analizi sonrası yaptığımız karşılaştırmalar ile birer şişede *Actinomyces odontolyticus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Paracoccus denitrificans*, *Brucella abortus*, *Haemophilus influenza* ve *Cellulomonas flavigena* varlığı tespit edilmiştir. Bu bakterilerin pasajlarda ürememesinin nedeni hastaların antibiyotik almasına bağlı olarak bakterilerin L-forma dönüşmesi veya üremelerinin inhibe olmuş olması olabilir. Rutin olarak kullanılan besiyerleri L-form bakterileri üretmekte yetersiz kalmaktadır. Başka bir neden de anaerobik veya mikroaerofilik şartlarda inkübasyon yapılmaması olabilir.

Sekans analizi sonucu identifiye edilen *Actinomyces*, *Campylobacter* ve *Haemophilus* türleri anaerobik ya da mikroaerofilik şartlarda inkübasyon yapılmamasına ve özel besiyerlerine ekim yapılmamasına bağlı, *Brucella* ise yavaş ve zor üreme özelliği, yeterli süre inkübe edilmemesi ve özel besiyerlerine ekim yapılmaması ya da kan kültür şişelerinin besiyeri özelliğine bağlı olarak ürememiş olabilir.

PZR ile negatif bulduğumuz şişelerde de mikroorganizma olabilir. PZR'ı inhibe eden inhibitör varlığı, yüksek lökosit sayısına bağlı olarak hedef DNA/total DNA oranının düşüklüğü vb. durumlar mikroorganizma olduğu halde negatif sonuçlara neden olabilir.

Actinomyces odontolyticus anaerobik, fakültatif anaerob, sporsuz, kapnofilik, hareketsiz, gram pozitif bir bakteridir (Cone ve ark., 2003; Lau ve ark., 2004). Ağızda diş yüzeylerinde, diş plaklarında görülebilir. Fırsatçı bir patojendir. Müköz membranlardan yayılabilir. Ayrıca rahim içi araç kullanan kadınların genital sisteminden ve protezlerden de izole edilmiştir. Diş absesi olan kişilerde kana yayılım olabilir ve geçici bakteriyemi görülebilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış, kemoterapi alan, organ transplantasyonu yapılan kişilerde bakteriyemi yapabilir (Cone ve ark., 2003; Sarkonen ve ark., 2005). *Actinomyces* türleri daha çok Brucella agar gibi anaeroblar için selektif besiyerlerinde ürer. Kanlı agarda da anaerob şartlarda inkübe edilirse üreme olur (Cone ve ark., 2003). *Actinomyces odontolyticus* tespit ettiğimiz hastanın immunsupresif olup olmadığını bilemediğimiz ve hastada alta yatan bir durum var mı gösterilemediği için gerçekten etken mi yoksa diş tedavisi vb. bir müdahaleyi takiben gelişen geçici bakteriyemi sırasında mı tespit edildiğinin ayrımını yapmak mümkün olmamıştır.

Campylobacter türleri hareketli, gram negatif, kıvrık basillerdir (Guevera ve ark., 1994; Cruz ve ark., 2010). 42 °C'de, özel besiyerlerinde %5-10 CO₂ içeren mikroaerofilik ortamda ürerler. Anaerobik kan kültürlerinde daha iyi üreme gösterirler. Etken olabildiği halde kan kültüründe tespit edilememesinin nedeni 42 °C yerine 37 °C'de inkübe edilmesi olabilir (Morris ve ark., 2008). *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* türleri sağlıklı insanlarda gastroenterit etkenidir, bakteriyemiye neden olmazlar. Ancak *C. jejuni*'nin çok yaşlı ve çok gençlerde bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde (hematolojik malignite ve solid organ tümörü olanlarda) bakteriyemi yaptığı gösterilmiştir (Shandera ve ark., 1992; Guevera ve ark., 1994; Morris ve ark., 2008; Pacanowski ve ark., 2008; Cruz ve ark., 2010). *C. Jejuni*, gastroenterit sonrası bu predispozan faktörler varlığında intestinal mukazaya penetre olup bakteriyemi yapabilir (Guevera ve ark., 1994; Morris ve ark., 2008). Gastroenteritli hastalarda normalde kan kültürü alınmadığı için gastroenterit sırasında ortaya çıkması muhtemel geçici bakteriyemi esnasında kan kültürünün alınmış olması nedeniyle bu bakteri tespit edilmiş olabilir (Shandera ve ark., 1992; Morris ve ark., 2008; Pacanowski ve ark., 2008; Cruz ve ark., 2010). Ya da örnek

alınırken hastadan enjektörlerin kontaminasyonu nedeni ile mikroorganizma kan kültürüne bulaşmış olabilir (Morris ve ark., 2008).

Brucella spp. yavaş ve zor üreyen, hareketsiz, küçük, gram negatif, fakültatif intrasellüler bir kokobasildir (Bannatyne ve ark., 1997; Yagupsky, 1999; Yagupsky, 2004). Kan kültürlerinde üremesi 30 güne kadar gecikebilir (Bannatyne ve ark., 1997; Bilgehan, 2004; Sümerkan ve ark., 2001). Pasajlarda üremesi de uzun zaman alır ve yalancı negatif sonuçlar alınabilir (Ruiz ve ark., 1997; Yagupsky, 1999; Sümerkan ve ark., 2001). Kan kültüründe üremesini, düşük CO₂ düzeyi ve kan kültüründe bulunan SPS azaltabilir (Ruiz ve ark., 1997; Sümerkan ve ark., 2001). *Brucella* şüphelenilen vakalarda kültür pasajları %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmelidir. İntrasellüler olduğu için lizis yöntemi ile daha kolay tespit edilebilir (Yagupsky, 2004). Subakut ve kronik hastalık sırasında ve hasta antibiyotik alıyorsa kültürleri negatif olabilir (Debeaumont, 2005). Kanda düşük konsantrasyonda bulunduğu zaman kan kültürlerinde tespiti zorlaşır (Mantur ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda bu hastanın sekans analizinde ilk olasılıklar olarak *Hoeflea phototrophica* ve *Mesorhizobium* spp. eşleşmesi saptanmıştır. *Mesorhizobium* spp. Gram negatif, aerobik, hareketli, sporsuz basillerdir. Bitkiler üzerinde bulunurlar ve insanlarda enfeksiyon yaptıkları gösterilmemiştir (Jarvis ve ark., 1997). *Hoeflea phototrophica* gram negatif, aerobik, küçük, hareketli basillerdir. Yüzeylelerden tespit edilmiştir. İnsanlarda enfeksiyon yaptıkları gösterilmemiştir (Biebl ve ark., 2006). Ancak bu bakterilerin insanlarda hastalık etkeni olmayıp çevre kontaminantı olduğunu düşündüğümüz için *Brucella* türünün etken olabileceğini düşündük.

Bir şişede 88 bazlık kısa bir dizi karşılaştırmamıza rağmen yüksek uyumlulukla *Haemophilus influenzae* olarak tanımlanması nedeniyle etken olarak kabul edilmiştir. *H. influenzae* küçük, pleomorfik, gram negatif, kokobasil yapısında fakültatif anaerob olarak üreyebilen bir mikroorganizmadır. Üremek için X (protoporfirin IX) ve V (nikotinamid adenin dinükleotid) faktörlerine ihtiyaç gösterir. Çikolata agarda ya da kanlı agarda diğer bakterilerin etrafında satellit olarak, %5 CO₂'li ortamda yavaş ve zor ürer. Normalde çocukların üst solunum yolu florasında bulunur ve solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olur. Nadiren, kafa travması

geçiren ve bağışıklık sistemi baskılanmış çocuklarda, yenidoğanlarda ve bazen de sağlıklı çocuklarda septisemi yapabilir (Ito ve ark., 2011). *H. Influenzae tipb* için yapılan aşılama ile enfeksiyonları genelde azalmıştır. Ancak tiplendirilemeyen *H. influenzae* ile oluşan enfeksiyonlara karşı aşı etkili değildir ve bu tipler bakteriyemi ile ilişkili bulunmuştur (Ito ve ark., 2011; Rubach ve ark., 2011). Antibiyotik alımı sonrası kültürde tespit oranı azalır. Kan kültür şişesinin içeriği de üremesini etkileyebilir. Bazı türleri kan kültürü içindeki antikoagülanlara duyarlıdır. Ayrıca şişelerde CO₂ basıncı yüksek olursa üremesi engellenebilir (Jamal ve ark., 2005). *H. influenzae* da geçici bakteriyemi yapabilir ve bu dönemde kültürlerde tespit edilebilir (Matsuda ve ark., 2005).

Paracoccus denitrificans ve *Cellulomonas flavigena* çevre kontaminantıdır. *Cellulomonas flavigena* gram pozitif, hareketsiz ve korineform yapıdadır. Aerobik ortamda 30 C°'de ürer (Abt ve ark., 2010). Bitkilerde *Paracoccus denitrificans*, gram negatif, hareketsiz, koktur. *Micrococcus denitrificans* olarak da isimlendirilir. Toprakta, canlı ve cansız eşyalar üzerinde bulunabilir (Siddavattam ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz bu mikroorganizmaların çevre kontaminantı olduğunu ve dolaşım sistemi enfeksiyonu etkeni olmadıklarını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın başında amaçlarımızdan biri yalancı pozitif sinyal veren şişelerin ait olduğu hastaların dosyalarını incelemek ve geliştireceğimiz risk skorlama sistemi üzerinden yüksek/düşük risk taşıyan hastalarda moleküler yöntemler ile sonuçların değerlendirilmesine karar vermeyi sağlamaktı. Ancak örneklerimizin toplanmaya başladığı tarihten sonra hastanemizin kayıt sisteminin üç defa değişmesi ve arşivde hasta dosyalarının düzgün saklanmaması nedeni ile hasta bilgilerine verimli bir şekilde ulaşamadık. Bu nedenle sonuçlarımızı skorlama sistemi ile ilişkilendirmeyi başaramadık.

Çalışmamızda hasta dosya bilgilerine ulaşamadığımız için bu etkenleri tespit ettiğimiz hastalarda altta yatan bağışıklık sistemi baskılanması durumu ya da altta yatan/yandaş hastalıkları hakkında fikir sahibi olmadık. Bilgilere ulaşabilseydik

gerçekten bakteriyemi etkenleri mi yoksa geçici bakteriyemi sırasında mı bu mikroorganizmaları saptadık tartışılabilir.

Üniversal bakteriyel primerleri ile moleküler testlerde bakteri varlığını tespit etmemize rağmen üniversal mantar primerleri ile mantar varlığını tespit edemedik. Bu nedenle üniversal mantar primerleri ile mantar varlığının araştırılması gereksizdir.

Kandan mikrobiyal patojenlerin direkt nükleik asit temelli tespit ve identifikasyonu dolaşım sistemi enfeksiyonlarının hızlı tanısı için umut vericidir. Patojenlere spesifik nükleik asit amplifikasyon testleri, tespit süresinin kısılması, duyarlılığın artması ve antibiyotik ve antimikotik tedavi alanlarda baskılayıcı etkiyi azaltıcı etkiye sahiptir. Ancak moleküler teknikler günümüzde tek tanı yöntemi olmaktan ziyade kan kültürlerine paralel olarak kültürü yapılamayan organizmalar ve kültür sonuçları elde edilmeden önce bazı ilaç dirençlerinin gösterilmesi için kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler patojenleri tanımlar ve tür düzeyinde bilgi verir. Yeni moleküler teknikler yeni buluşlara neden olabilir ve yeni patojenler bulunabilir.

Kan kültürlerinde moleküler yöntemler ile mikroorganizma araştırmak pahalı ve emek yoğun bir iştir. Deneyimli personel ve laboratuvarında özel donanım gerektirir. Birden fazla yalancı pozitif sinyal veren hastalarda ve immün yetmezlikli/özel konaklarda moleküler yöntemler ile şişelerde mikrobiyal DNA araştırılabilir. Tek yalancı pozitif şişe olması durumunda moleküler testler maliyeti artırır. Bu hastalarda moleküler testler yerine, hastanın antibiyotik almadığı dönemde ilave kan kültürlerinin alınması, ilave subkültürler yapılarak şüphelenilmesi durumunda hücre duvarını kaybetmiş L-form bakterileri tespit etmek için hipertonic besiyerlerine ekim yapılması ve anaerobik şişelerin kan kültür setlerine eklenmesi yararlı olabilir.

Sonuç olarak moleküler yöntemlerin seçilmiş vakalarda kan kültürlerine ilave olarak kullanılmasının yararlı olabileceğini ve mortalite oranlarını, gereksiz antibiyotik kullanımını ve maliyet artışını azaltacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Cebeci Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mart 2005 ile Ağustos 2008 tarihleri arasında gelen 53.942 kan kültür şişesi arasından yalancı pozitif sinyal veren 218 şişe kullanılmıştır.
- 2- Kan kültürlerinde gerçek üreme oranı %11,1 bulunmuştur.
- 3- Yalancı pozitiflik oranı %0,4'tür.
- 4- Üniwersal bakteriyel 16S ribozomal RNA gen bölgesi için yapılan PZR işlemi sonucunda 218 örneğin altı tanesinde (%2,75) ürün gözlenmiştir.
- 5- Fungal "internal transcribed spacer" (ITS) gen bölgesi için yapılan PZR işlemi sonucunda 218 örneğin hiçbirinde bant elde edilmemiştir.
- 6- Üniwersal bakteriyel 16S rRNA gen bölgesi için yapılan PZR işlemi sonucunda bant elde edilen altı tane örneğin DNA dizi analizi sonucunda *Actinomyces odontoyticus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Paracoccus denitrificans*, *Brucella abortus*, *Haemophilus influenza* ve *Cellulomonas flavigena* identifiye edilmiştir.
- 7- *Actinomyces odontoyticus*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Brucella abortus*, *Haemophilus influenzae* enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilirken *Paracoccus denitrificans* ve *Cellulomonas flavigena*'nın çevre kontaminantı olduğu düşünülmüştür.
- 8- Sonuç olarak, üç yıl içinde laboratuvara gönderilen tüm şişelerin %0,007'sinde, üreme sinyali verenlerin yaklaşık %2'sinde konvansiyonel yöntem ile tespit edilemeyen klinik açıdan anlamlı olabilecek mikroorganizma varlığı gösterilmiştir.
- 9- Kan kültürlerinin anaerobik ya da mikroaerofilik ortamda inkübe edilmemesi, anaerobik şişe kullanılmaması, özel besiyerlerine ekim yapılmaması bu mikroorganizmaların tespitine engel olmuş olabilir.

Birden fazla yalancı pozitif sinyal veren hastalarda ve altta yatan immün yetmezliği olan seçilmiş hastalarda moleküler yöntemler ile şişelerde bakteri varlığı araştırılabilir.

ÖZET

Yalancı Pozitif Üreme Sinyali Veren Otomatize Kan Kültür Şişelerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi İle Bakteri ve Mantar Varlığının Araştırılması

Dolaşım sistemi enfeksiyonları antimikrobiyal ve destekleyici tedavilere rağmen morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri olmaya devam etmektedir. Bu nedenle erken tanısı ve uygun tedavi edilmesi klinik açıdan önemlidir. Kan kültürleri dolaşım sistemi enfeksiyonlarının tanısında altın standart yöntemdir. Bununla birlikte, kan kültürlerinin değeri yavaş ya da zor üreyen veya kültürü yapılamayan mikroorganizmalarda, antibiyotik tedavisi alanlarda, mikroorganizma yükü düşük olduğunda azalır. Bu nedenle moleküler tanı yöntemleri vb. daha hızlı, duyarlı ve özgül testler bu enfeksiyonların tanısında giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır.

Bu çalışmada otomatize kan kültür cihazında üreme sinyali veren ancak rutin mikrobiyolojik inceleme sonucunda üreme görülmeyen (yalancı pozitif sinyal veren) kan kültür şişelerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak bakteri ve mantar varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, Mart 2005-Ağustos 2008 tarihleri arasında toplanan 53942 kan kültür şişesinden, BACTEC (BD Diagnostics Systems, Amerika) otomatize kan kültür cihazında üreme sinyali veren ancak rutin mikrobiyolojik ekimler sonrasında üreme saptanamayan 218 “yalancı pozitif” şişe alınmıştır.

Şişelerde bakteri ve mantar DNA'sının varlığı bakteriyel 16S ribozomal RNA geni ve fungal ITS gen bölgesinin nükleik asit amplifikasyonu ve DNA dizi analizi ile araştırılmıştır.

218 örneğin altısında bakteri DNA'sı tespit edilmiş, hiçbir şişede mantar DNA'sı saptanmamıştır.

Bu altı tane örneğin DNA dizi analizi sonucunda *Actinomyces odontolyticus*, *Campylobacter coli/jejuni*, *Paracoccus denitrificans*, *Brucella abortus*, *Haemophilus influenza*, *Cellulomonas flavigena* tanımlanmıştır. Bunlardan *Actinomyces odontolyticus*, *Campylobacter coli/jejuni*, *Brucella abortus*, *Haemophilus influenza* etken olarak değerlendirilirken, *Paracoccus denitrificans* ve *Cellulomonas flavigena* kontaminant olarak düşünülmüştür. Sonuç olarak, üç yıl içinde laboratuvara gönderilen şişelerin %0,007'sinde, üreme sinyali verenlerin yaklaşık %2'sinde klinik açıdan anlamlı konvansiyonel yöntem ile tespit edilemeyen mikroorganizma varlığı gösterilmiştir. Dolaşım sistemi enfeksiyonlarının tanısında moleküler yöntemlerin kullanılması maliyet ve iş yükü bakımından anlamlı değildir. Ancak özellikle hastalarda gerekli durumlarda bu yöntemlere başvurulabilir.

Anahtar Sözcükler: Dolaşım sistemi enfeksiyonu, PZR, 16S rRNA, ITS, bakteri, mantar, sekans analizi, BACTEC.

SUMMARY

Evaluation of the Presence of Bacterial and Fungal DNA in Subculture-Negative Automated Blood Culture Bottles with Positive Signals

Early diagnosis and treatment is important for bloodstream infections which are among the leading causes of morbidity and mortality in all age groups. Blood culture is the gold standard method in the diagnosis of bloodstream infections. However, the value of blood culture decreases for slow growing microorganisms, microorganisms that cannot be cultured, and for patients under antimicrobial treatment and with low microorganism load. To overcome these difficulties, more sensitive and specific tests such as molecular methods are increasingly used. The purpose of this study was to evaluate the presence of bacterial and fungal DNA by using polymerase chain reaction and DNA sequencing analysis in the blood culture bottles giving signal of reproduction in automated blood culture device but found to be sterile after performing subcultures (false positives).

For this purpose, 218 false positive BACTED (BD Diagnostics Systems, America) automated blood culture bottles out of 53942 blood culture bottles collected between March 2005 and August 2008 were evaluated by bacterial 16S rRNA and fungal ITS region PCR and sequence analysis.

None of the bottles contained fungal DNA. In 6 of the false positive bottles (2.8%), bacterial DNA was determined. DNA sequence analysis of these 6 specimens yielded the following bacteria: *Actinomyces odontolyticus*, *Campylobacter coli/jejuni*, *Paracoccus denitrificans*, *Brucella abortus*, *Haemophilus influenza*, and *Cellulomonas flavigena*. *A. odontolyticus*, *C. coli/jejuni*, *B. abortus*, and *H. influenzae* were regarded as ethiological agents. On the other hand *P.denitrificans* and *C. flavigena* were regarded as environmental contaminants. As a result, in only 2% of positive bottles, and 0.007% of all bottles clinically relevant bacteria were identified by molecular methods.

Using molecular methods for the diagnosis of bloodstream infections is expensive, and labour-intensive. Its value would be limited for bottles with more than one pathogen. However, these methods can be used especially for patients with certain clinical conditions.

Key Words: Bloodstream infection, PCR, 16S rRNA, ITS, bacteri, fungus, sequence analysis, BACTEC.

KAYNAKLAR

Abt B., Foster B., Lapidus A., Clum A., Sun H., PukallR., Lucos S., Del Rio TG., Nolan M. et all. (2010). Complete Genome sequence of *Cellulomonas flavigena* Type strain. Standards in Genomic Sciencens, 3(1): 15-25.

Adeyemi AI., Sulaiman AA, Soloman BB., Chinedu OA., Victor IA. (2010). Bacterial Blood system Infections in HIV-Infected Adults Attending a Lagos Teaching Hospital. Journal Health Popul Nutr, 28(4). 318-326.

Akalın H. (2007). Sepsis: Tanımlar, Tanı, Etyoloji ve Epidemiyolojide Yeni Gelişmeler. III. Ulusal Yoğun Bakım Enfeksiyonları Sempozyumu.

Atia A., Raiyani T., Patel P., Patton R., Young M. (2012). *Clostridium Perfringes* Bacteremia Caused by Choledocholithiasis in The Absence of Gallbladder Stones. World Journal Gastroenterology, 18(39): 5632-5634.

Aygün D., Utku T., Dikmen Y., Mete B., Demirkıran O., Murtezaoğlu A., Ürkmez S., Yılmaz M., Öztürk R. (2002). Yoğun Bakım Ünitesinde Kan Kültüründen İzole Edilen Mikroorganizmalar. Flora Dergisi, 7: 94-98.

Bauer M., Reinhart K. (2010). Molecular Diagnostics of Sepsis-Where are We Today?. International Journal of Medical microbiology, 300:411-413.

Gaibani P., Rossini G., Ambretti S., Gelsomino F., Pierro AM., Varani S., Paolucci M., Landini MP., Sambri V. (2009). Blood Culture Systems: Rapid Detection-How and Why?. International Journal of Antimicrobial Agents, 34S: 513-515.

BD. (2009/07). Bactec Plus Aerobic/F ve Plus Anaerobic/F Culture Vials (Kültür Flakonları).

Beebe JL., Koneman EL. (1995). Recovery of Uncommon Bacteria from Blood: Association with Neoplastic Disease. *Clinical Microbiology Review*, 8:336.

Bellermain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kausrud H. (2010). ITS as an Environmental DNA Barcode for Fungi: An in Silico approach Reveals Potential PCR Biases. *BMC Microbiology*, 10: 189-197.

Biebl H., Tindall BJ., Pukall R., Lünsdorf H., Allgaier M., Döbler IW. (2006). *Hoeflea phototrophica* sp. nov., a Novel Marine Aerobic Alphaproteobacterium That Forms Bacteriochlorophyll a. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 821-826.

Bilgehan H. (2009). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Barış Kitabevi 5. Baskı: Ankara.

Bloos F., Sochse S., Kortgen A., Pletz MW., Lehmann M., Straube E., Riedemann NC., Reinhart K., Bauer M. (2012). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Assay for Pathogen Detection in Septic Patients under Routine Condition: An Observational Study. *Plos One*, 7:9.

Bourbeau PP., Pohlman JK. (2001). Three Days of Incubation May Be Sufficient for Routine Blood Cultures with Bact/Alert FAN Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2079-2082.

Bourbeau PP., Foltzer M. (2005). Routine Incubation of Bact/Alert FA and FN Blood Culture Bottles for More than 3 Days May Not Be Necessary. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 2506-2509.

Bouza E., Sousa D., Rodriguez-Creixems M., Lechuz JG., Munoz P. (2007). Is the Volume of Blood Cultured Still a Significant Factor in the Diagnosis of Bloodstream Infections?. *Journal of clinical Microbiology*, 45: 2765-2769.

Carroll KC., Weinstein MP., Çeviren: Gülşen Haşçelik. (2008). Mikroorganizmaların Saptanması ve Tanımlanmasında Manuel ve Otomatik Sistemler. In: *Klinik Mikrobiyoloji, Manuel of Microbiolgy* (ed. Murray PR, Baron EJ, Jaroensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Çeviri Editörü: Ahmet Başustaoglu). 9. baskı. Atlas Kitapçılık. Ankara. Cilt 1, 192-196.

Carvalho PRA., Trotta EA. (2003). Advances in Sepsis Diagnosis and Treatment. *Journal Pediatr*, 79: 195-204.

Chen YM., Hsueh PR. (2012). Changing Bacteriology of Abdominal and Surgical Sepsis. *Current Opinion Infectious Diseases*, 25(5): 590-595.

Chen HM, Chung PW., Yu YJ., Tai WL., Kao WL., Chien YL., Chiu CH. (2003) Antimicrobial Susceptibility of Common Bacterial Pathogens Isolated from a New Regional Hospital in Southern Taiwan. *Chang Gung Med J*, 26(12): 889-896.

Chiarini A., Palmeri A., Amato T., Immordino R., Distefano S., Giammanco A. (2008). Detection of Bacterial and Yeast Species with the Bactec 9120 Automated System with Routine Use of Aerobic, Anaerobic and Fungal Media. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 4029-4033.

Clarridge JE. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 840-862.

Cockerill III FR., Reed GS., Hughes JG., Torgerson CA., Vetter EA., Harmsen WS., Dale JC., Roberts GD., Ilstrup DM., Henry NK. (1997). Clinical Comparison of BACTEC 9240 Plus Aerobic/F Resin Bottles and the Isolator

Aerobic Culture System for Detection of Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1469-1472.

Cockerill III FR., Wilson JW., Vetter EA., Goodman KM., Torgerson CA., Harmsen WS., Schleck CD., Ilstrup DM., Washington II JA., Wilson WR. (2004). Optimal Testing Parameters for Blood Cultures. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 1724-1730.

Cone LA., Leung MM., Hirschberg J. (2003). *Actinomyces odontolyticus* Bacteremia. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 1629-1632.

Cosgrove SE., Sakoulas G., Perencevich EN., Schwaber J., Karhmer AW. (2003). Comparison of Mortality Associated with Methicilin Resistant and Methicilin Susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A Meta-Analysis. *Clinical Infectious diseases*, 36: 53-59.

Crump CA., Ramadhani HO., Morrissey AB., Msuya LJ., Yang L., Chow SC., Morpeth SC., Reyburn H., Njau BN., Shaw AV., Diefenthal HC., Bartlett JA., Shoo JF., Schimona W., Cunningham CK., Kinabo GD. (2011). Invasive bacterial and Fungal Infections Among Hospitalized HIV-Infected and HIV-Uninfected Children and Infants in Northern Tanzania. NIH Public Access, *Tropical Medicine in Health*, 16(79): 830-837.

Çiçek A., Kuzucu Ç., Durmaz B. (2005). Kan Kültürü Sonuçlarının Değerlendirilmesinde Etkili Olan Faktörler. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 12(4): 277-280.

Daxboeck F., Dornbusch HJ., Krause R., Assadran O., Wenisch C. (2004). Verification of false-positive Blood Culture Results Generated by the BACTEC 9000 Series by Eubacterial 16s rDNA and Panfungal 18r rDNA Directed Polymerase Chain Reaction (PCR). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48:1-3 *Bacteriology*.

Debeaumont C., Falconnet PA., Maurin M. (2005). Real-Time PCR for Detection of *Brucella* spp. DNA in Human Serum Samples. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 24: 842-845.

Demir M., Kaleli İ., Cevahir N., Mete e., Şengül M. (2003). İki Yıllık Kan Kültür Sonuçlarının Değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*, 17(3): 297-300.

Dierkers C., Ehrenstein B., Siebig S., Linde HJ., Reishl U., Salzburger B. (2009). Clinical impact of a Commercially Available Multiplex PCR System for Rapid Detection of Pathogens in Patients with Presumed Sepsis. *BMC Infectious Diseases*, 9:126.

Doğanay M. (1996). Sepsis. In: *İnfeksiyon Hastalıklarında*. (ed. Willke Topçu A., Söyletir G., Doğanay M.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 473-486.

Doğanay M. (1998). Nosokomiyal Sepsis: Önemi ve Tanımlar. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2: 179-181.

Drauncort M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral JP., Raoult D. (2000). 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 3623-3630.

Durmaz G., Us T., Aydınlı A., Kiremitçi A., Kiraz N., Akgün Y. (2003). 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 819-821.

Ecker DJ., Sampath R., Li H., Massire C., Mattnews HE., Toleno D., Hall TA., Blyn LB., Eshoo MW., Ranken R., Hofstadler SA., Tang Y. (2010). New

Tecology for Rapid Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 10(4): 399-415.

Erbay A., Sayılır K., Çolpan A., Akıncı E., Balaban N., Bodur H. (2003). Kan Kültürlerinde Üreme saptanan 380 Olgunun Değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi*, 16: 25-30.

Fenollar F., Raoult D. (2007). Molecular Diagnosis of Bloodstream infections Caused by Non-cultivable Bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 7-15.

Flayhart D., Borek AP., Wakefield T., Dick J, Carroll KC. (2007). Comparison of Bactec Plus Blood Culture Media to BacT/Alert FA Blood Culture Media for Detection of Bacterial Pathogens in Samples Containing Therapeutic Levels of Antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 816-821.

Forbes BA., Sohm DF., Weissfeld AS. (2007). Bloodstream Infections. In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Twelfth Edition. USA: Mosby. 778-797.

Fredricks DN., Relman DA. (1998). Improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR Inhibitor Sodium Polyanetolsulfonate. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2810-2816.

Gaibani P., Rossini G., Ambretti S., Gelsomino F., Pierro AM., Varani S., Paolucci M., Landini MP., Sambri V. (2009). Blood Culture Systems: Rapid Detection- How and Why. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34S: 13-15.

Gdoura R., Pereyre S., Frikha I., Hammami N., Clerc M., Sahnoun Y., Bebear C., Daoud M., Barbeyrac B., Hammami A. (2002). Culture-Negative Endocarditis Due to *Chlamydia Pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 718-720.

Gonsalves WI., Cornish N., Moore M., Chen A., Varman M. (2009). Effects of Volume and Site of Blood Draw on Blood Culture Results. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 3482-3485.

Grohs P., Mainardi JL., Podglajen I., Hanras X., Eckert C., Buu-Hoi A., Varon E., Gutmann L. (2007). Relevance of Routine Use of the Anaerobic Blood Culture Bottle. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2711-2715.

Gueuera CL., Gonzales J., Peria P. (1994). Bacteraemia Caused by *Campylobacter* spp. *Journal of Clinical Pathology*, 47: 174-175.

Hadler JL., Petit S., Mandour M., Cartter ML. (2012). Trends in Invasive Infection with Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*, Connecticut USA, 2001-2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(6). 917-924.

Hall KK., Lyman JA. (2006). Updated Review of Blood Culture Contamination. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 788-802.

Hansen WLJ., Bruggeman CA., Wolffs PFG. (2009). Evaluation of New Preanalysis Sample Treatment Tools and DNA Isolation Protocols To Improve Bacterial Pathogen Detection in Whole Blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 2629-2631.

Hettwer S., Wilhelm J., Schürmann M., Ebel H., Hammer D., Amoury M., Hofmann F., Oehme A., Wilhelms D., Kekule AS., Klöss T., Werdan K. (2011). Microbial Diagnostics in Patients with Presumed Severe Infection in the Emergency Department. *Springer-Verlog*, 48: 517-526.

Ifantidou AM., Diamantidis MD, Tseliki G., Angelou AS., Christidou P., Papa A., Pentilos D. (2010). *Corynebacterium jeikeum* Bacteremia in a Hemodialyzed Patient. *International Journal of Infectious Diseases*, 14: 265-268.

Isaacmen DJ., Karasic RB., Reynolds EA., Kost SI. (1996). Effect of Number of Blood Cultures and Volume of Blood on Detection of Bacteremia in Children. *The Journal of Pediatrics*, 128: 190-195.

Ito T., Shibota H., Nokazowa M., Myokai M., Ikegaya K., Tsuchiyo K., Kamimaki T. (2011). Meningitis and Septicemia Caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae* in a Previously Healthy 2 Year Old Girl. *Journal of Infectious Chemother* 17: 559-562.

Jamal W., Tamaray G., Pozhoor A., Rotimi VD. (2005). Comparative Evaluation of BacT/Alert 3D and Bactec Systems for the recovery of Pathogens Causing Bloodstream Infections. *Medical Principles and Practice*, 15: 223-227.

James PA., Al-Shafi KM. (2000). Clinical Value of Anaerobic Blood Culture: A Retrospective Analysis of Positive Patient Episodes. *Journal of Clinical Pathology*, 53: 231-233.

Janda JM., Abbott SL. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 2761-2764.

Jansen GJ, Mooibroek M, Idema J, Harmsen HJM, Welling GW, Degener JE. (2000). Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 814-817.

Jarvinen A., Laakso S., Piiparinen P., Aittakorpi A., Lindfors M., Huopaniemi L., Piiparinen H., Maki M. (2009). Rapid Identification of Bacterial Pathogens Using a PCR and Microarray Based Assay. *BMC Microbiology*, 9: 161.

Jarvis BDW., Berkum PV., Chen WX., Nour SM., Fernandez MP., Cleyet-Marel JC., Gillis M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mezorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 895-898.

Jordan JA., Durso MB. (2005). Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detecting Bacterial DNA Directly from Blood of Neonates Being Evaluated for Sepsis. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7: 575-581.

Jordan JA., Jones-Laughner J., Durso MB. (2009). Utility of Pyrosequencing in Identifying Bacteria Directly from Positive Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 368-372.

Kaleta EJ., Clark AE., Johnson DR., Gamage DC., Wysocki VH., Cherkaoui A., Schrenzel J., Wolk DM. (2011). Use of PCR Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Rapid Identification of Bacterial and Yeast Bloodstream Pathogens from Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 345-353.

Karahan ZC., Mumcuoğlu İ., Güriz H., Tamer D., Balaban N., Aysev D, Akar N. (2006). PCR Evaluation of false-positive Signals from Two Automated Blood-Culture System. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 53-57.

Karchmer AW. (2000). Nosocomial Bloodstream Infections: Organisms, Risk Factors and Implications. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4): 139-143.

Karchmer Aw., Boyer As. (2008). Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolving Clinical Challenge. *Clinical Infectious diseases*, 46: 342-343.

Kaya S., Arıdoğan CB., etin H., Demirci M. (2007). ocuk Hastalardan Alınan Kan Kültürlerinde reyen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Direnleri. Fırat Tıp Dergisi, 12: 34-36.

Keuehnert MJ., Hill HA., Kupronis BA., Tokers JL., Solomon SL., Jernigen DB. (2005). Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* Hospitalizations, United States. Emerging Infectious Diseases, 11(6): 868-872.

Klouche M., Schröder U. (2008). Rapid Methods for Diagnosis of Bloodstream Infections. Clin. Chem. Lab. Med., 46(7): 888-908.

Koneman E., Winn Jr W., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. (2006). Infections of Blood. In: Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology . Sixth edition. USA: Lippincott Williams Wilkins. 97-110.

Kurtoğlu MG., Bozkurt H., Tuncer O., Keşli R., Berktaş M. (2008). Distribution, Optimal Detection Time and Antimicrobial Susceptibility Rates of The Microorganisms Isolated from Blood Cultures over a 4-Year Time Period in a Turkish University Hospital and a Review of The International Literature. The Journal of International Medical Research, 36: 1261-1272.

Lau SKP., Woo PCY., Fung AMY., Chan K., Woo GKS., Yuen K. (2004). Anaerobic, Nonsporulating, Gram Positive Bacilli Bacteremia Characterized by 16S rRNA Gene Sequencing. Journal of Medical Microbiology, 53: 1247-1253.

Lee A., Mirrett S., Reller LB., Weinstein MP. (2007). Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures are Needed?. Journal of Clinical Microbiology, 45: 3546-3548.

Lehmann LE., Herpichboehm B., Kost GJ., Kollef MH., Stüber F.(2010). Cost and Mortality Prediction Using Polymerase Chain Reaction Pathogen Detection in Sepsis: Evidence from Three Observational Trials. *Critical Care*,14: R186.

Li J., Plorde JL., Carlson LG. (1994). Effects of Volume and Periodicity on Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:2829.

Lilienfeld-Toal M., Lehmann LE., Roadts AD., Hohn-Ast C., Orlopp KS., Marklein G., Purr I., Cook G., Hoeft A., Glasmacher A., Stüber F. (2009). Utility of a Commercially Available Multiplex Real-Time PCR Assay to Detect Bacterial and fungal Pathogens in Febrile Neutropenia. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 2405-2410.

Lin HH., Liu YF., Tien N., Ho CM., Hsu LN., Lu JJ. (2012). Evaluation of the Blood Volume Effect on the Diagnosis of Bacteremia in Automated Blood Culture Systems. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 1-5.

Lockhard PB., Brennan MT., Sasser HC., Fox PC., Paster BJ., Bahrani-Mougeot FK. (2008). Bacteremia Associated With Tooth Brushing and Dental Extraction. *NIH Public Access*, 117 (24): 3118-3125.

Lodes U., Bohmeier B., Lippert H., König B., Meyer F, (2012). PCR-Based Rapid Sepsis Diagnosis Effectively Guides Clinical Treatment in Patients with New Onset of SIRS. *Langenbecks Arch Surgery*, 397: 447-455.

Luzzaro F., Viganò EF., Fossati D., Grossi A., Sala A., Sturla C., Saudelli M., Toniola A. (2002). Prevalence and Drug Susceptibility of Pathogens Causing Bloodstream Infections in Northern Italy; A Two-Year Study in 16 Hospitals. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 21(12): 840-855.

Mancini N., Clerici D., Diotti R., Perotti M., Ghidoli N., Marco D., Pizzorno B., Emrich T., Bruoni R., Ciceri F., Clement M. (2008). Molecular Diagnosis of

Sepsis in Neutropenic Patients with Haematological Malignancies. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 601-604.

Mancini N., Corletti S., Ghidoli N., Cichero P., Bruoni R., Clementi M. (2010). The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 23: 235-251.

Mantur BG., Mulimani MS., Bidari LH., Akki AS., Tikore NV. (2008). Bacteremia is a Unpredictable as Clinical Manifestations in Human Brucellosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 12: 303-307.

Mao E., Clements A., Feller E. (2011). *Clostridium Septicum* Sepsis and Colon Carcinoma: Report of 4 Cases. *Case Reports in Medicine*, 2011:248453.

Marlowe EM., Hogan JJ., Hindler JF., Andruszkiewicz I., Gordon P., Bruckner DA. (2003). Application of an rRNA Probe Matrix for Rapid Identification of Bacteria and Fungi from Routine Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 53: 1247-1253.

Matsuda K., Sakata Y., Tan H., Kimura K., Matsuishi T. (2005). Transient *Haemophilus influenzae Type b* Bacteremia in a Healthy Child. *Kurume Medical Journal*, 52: 53-56.

Matsuda K., Iwaki KK., Garcia-Gomez J., Hoffman J., Inderlied CB., Mason WH., Iwaki Y. (2011). Bacterial Identification by 16S rRNA Gene PCR-Hybridization as a Supplement to Negative Culture Results. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 2031-2034.

Mehli M., Gayyurhan ED., Zer Y., Akgün S., Akın FEÖ., Balcı İ. (2007). Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Kan Kültürlerinden İzole

Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi*, 21(3): 141-145.

Memiş D., Gürsoy O., Taşdoğan M., Süt N., Kurt İ., Türe M., Karamanhoğlu B. (2007). High C-Reactive Protein and Low Cholesterol Levels are Prognostic Markers of Survival in Severe Sepsis, *Journal of Clinical Anesthesia*, 19: 186-191.

Millar BC., Kiru X., Moore JE., Earle JAP. (2000). A Simple and Sensitive Method to Extract Bacterial, Yeast and Fungal DNA From Blood Culture Material. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 139-147.

Miller NS., Rogan D., Orr BL., Whitney D. (2011). Comparison of BD Bactec Plus Blood Culture Media to Versa TREK Redox Blood Culture Media for Detection of Bacterial Pathogens in Simulated Adult Blood Cultures Containing Therapeutic Concentrations of Antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 1624-1627.

Mirrett S., Reller LB., Petti CA., Woods CW., Varizoni B., Sivadas R., Weinstein MP. (2003). Controlled Clinical Comparison of BacT/Alert Standard Aerobic Medium with BACTEC Standard Aerobic Medium for Culturing Blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2391-2394.

Mirrett S., Joyce MJ., Reller LB. (2005). Validation of Performance of Plastic Versus Glass Bottles for Culturing Anaerobes from Blood in Bact/Alert SN Medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 6150-6151.

Mirrett S., Hanson KE., Reller LB. (2007). Controlled Clinical Comparison of VersaTREK and BacT/Alert Blood Culture Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 299-302.

Mylotte JM., Tayara A. (2000). Blood culture: Clinical Aspects and Controversies. *European Journal Clinical Microbial Infectious Diseases*, 19 (3): 157-163

Morris GAJ., Ikumapayi VN., Antonio M., Howie SRC., Adegloba A. (2008). A Novel *Campylobacter jejuni* Sequence Type from a Culture-Negative Patient in the Gambia. *Plos One*, 3: 1-6.

Nicola FG. (2008). Assessing How Many Blood Cultures are Needed for Detecting Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1155-1156.

Nolte FS., Williams JM., Jerris RC., Morello JA., Leitch CD., Matushek S., Schwabe LD., Dorigan F., Kocka FE. (1993). Multicenter Clinical Evaluation of a Continuous Monitoring Blood Culture System Using Fluorescent-Sensor Technology (BACTEC 9240). *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 552-557.

Obara H., Aikawa N., Hasegawa N., Hori S., Ikedo Y., Kobayashi Y., Murata M., Okamoto S., Takeda J., Tarabe M., Sakakura Y., Ginbo M., Kitajima M., Kitagoura Y. (2011). The Role of a Real-Time PCR Technology for Rapid Detection and Identification of Bacterial and Fungal Pathogens in Whole-Blood Samples. *Journal Infectios Chemother*, 17: 327-333.

Ortiz E., Sande MA. (2000). Routine Use of Anaerobic Blood Cultures: Are They Still Indicated? *The American Journal of Medicine*, 108: 445-447.

Öksüz L., Genç L., Gürel S., Öngen B., Gürler N. (2003). 2002 Yılında Kan Kültürlerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Direnç Oranları. *Aknem Dergisi*, 17: 89.

Özyurt M., Albay A., Yıldırım ST., Başusta A., Gün H. (1998). BacT/Alert Otomatize Kan Kültür Sistemi ile İki Yıllık Dönemde Alınan Sonuçlar: Retrospektif Bir Çalışma. *İnfeksiyon Dergisi*, 12: 323-328.

Pacanowski J., Lalande V., Lacombe K., Baudraa C., Lesprit P., Legrand P., Trystram D., Kassis N., Arlet G., Moinardi J., Doucet-Populaine F., Girard PM, Leynord JL. (2008). *Campylobacter* Bacteremia Clinical Features and Factors Associated with Fatal Outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 47: 790-796.

Paolucci M., Landini MP., Sambri V. (2010). Conventional and Molecular Techniques for the Early Diagnosis of Bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36S: 6-16.

Patel R., Vetter EA., Harmsen WS., Schleck CD., Fadel HJ., Cockerill III FR. (2011). Optimized Pathogen Detection With 30- Compared to 20- Milliliter Blood Culture Draws. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 4047- 4051.

Peters RPH., Agtmael MA., Danner SA., Savelkoul PHM., Vandembroucke-Grauls CMJE. (2004). New Developments in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *Lancet Infectious Diseases*, 4: 751-760.

Peters RPH., Savelkoul PHM., Simoons-Smith AM., Danner SA., Grauls C., Agtmael M. (2006). Faster Identification of Pathogens in Positive Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridization in Routine Practice. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 119-123.

Petti CA., Mirrett S., Woods CW., Reller LB. (2005). Controlled Clinical Comparison of Plastic and Glass Bottles of BacT/ALERT FA Medium for Culturing Organisms from Blood of Adult Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1960-1962.

Petti CA. (2007). Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44: 1108-1114.

Pien BC., Sundaram P., Raof N., Costa SF., Mirrett S., Woods CW., Reller LB., Weinstein MP. (2010). The Clinical and Prognostic Importance of Positive Blood Cultures in Adults. *The American Journal of Medicine*, 123(9): 819-828.

Pien BC., Mirrett S., Crews BR., Reller LB., Woods CW. (2007). Controlled Clinical Comparison of Bact/Alert Standart Aerobic and Standard Anaerobic Blood Culture Bottles Inoculated Directly or After Transport in Sodium Polyanethol Sulfonate Tubes. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1357-1358.

Pieboji JG., Koulla-Shiro S., Ngassam P., Adiogo D., Njine T., Ndumbe P. (2004). Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacilli Isolates from Inpatients and Outpatients at Yaounde Central Hospital. *Journal Infectious Diseases*, 8: 147-154.

Plaller MA, Diekema DJ. (2004). Twelve Years of Fluconazole in Clinical Practice: Global Trends in Species Distribution and Fluconazole Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida*. *Eur Soc C in Microbiol Infectious Disease IO(Suppl I): II*.

Pletz MW., Wellinghousen N., Welte T. (2011). Will Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Diagnostics Improve Outcome in Septic Patients? A Clinical View. *Intensive Care Medicine*, 37: 1069-1076.

Previsdomini M., Gini M., Cerutti B., Dolina M., Perin A. (2012). Predictors of Positive Blood Cultures in Critically Ill Patients: A Retrospective Evaluation. *Clinical Science CMJ*, 53: 30-39.

Qion Q., Tang YW., Kolbert CP., Torgerson CA., Hughes JG., Vetter EA., Harmsen WS., Montgomery SO., Cockerill III FR., Persing DH. (2001). Direct Identification of Bacteria from Positive Blood Culture by Amplification and Sequencing of the 16s rRNA Gene: Evaluation of BACTEC 9240 Instrument

True-Positive and False-Positive Results. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3578-3582.

Rebelo M., Pereira B., Lima J., Decq-Mota J., Vieira JD., Costa JN. (2011). Predictors of in Hospital Mortality in Elderly Patients with Bacteraemia Admitted to an Internal Medicine Ward. *International Archives of Medicine*, 4: 33.

Regules JA., Carlson MD., Wolf SE., Murray CK. (2007). Analysis of Anaerobic Blood Cultures in Burned Patients. *Elsevier Burns*, 33: 561-564.

Reimer LG., Wilson ML., Weinstein MP. (1997). Update of Bacteremia and Fungemia. *Clinical Microbiology Reviews*. 10: 444-465.

Reisner BS., Woods GL. (1999). Times to Detection of Bacteria and Yeasts in BACTEC 9240 Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2024-2026.

Riedel S., Bourbeau P., Swartz B., Brecher S., Carroll KC., Stamper PD., Dunne WM., McCardle T., Walk N., Fiebelkorn K., Sewell D., Richter SS., Beekmann S., Doern GV. (2008). Timing of Specimen Collection for Blood Cultures from Febrile Patients with Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1381-1385.

Roh KH., Kim JY., Kim HN., Lee HJ., Sohn JW., Kim MJ., Cho Y., Kim YK., lee CK. (2012). Evaluation of BACTEC Plus Aerobic and Anaerobic Blood Culture Bottles and BacT/Alert FAN Aerobic and Anaerobic Blood Culture Bottles for the Detection of Bacteremia in ICU Patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73: 239-242.

Rubach MP., Bender JM., Mottice S., Hansen K., Weng Hc., Korgenski K., Doly JA., Pavia AT. (2011). Increasing Incidence of Invasive Haemophilus influenza Disease in Adults, Utah, USA. *Emergency Infectious Diseases* 17(9): 1645-1650.

Rebello M., Pereira B., Lima J., Decq-Mota J., Vieira JD., Costa JN. (2011).

Ruiz J., Lorente I., Perez J., Sımarro E., Martinez-Campos L. (1997). Diagnosis of Brucellosis by Using Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2417-2418.

Saito T., Inuma Y., Takakura S., Fujihara N., Kudo T., Ichiyoma S. (2004). Can BacT/Alert FA and FN Blood Culture Bottles Increase the Recovery of Microorganisms in the Clinical Laboratory?. *Journal Infec. Chemother*, 10: 343-347.

Sarkonen N., K n nen E., Eerola E., K n nen M., Jousimies-Somer H., Laine P. (2005). Characterization of *Actinomyces* species Isolated from Failed Dental Implant Fixtures. *Anaerobe* II, 231-237.

Seifert H. (2009). The Clinical Importance of Microbiological Findings in the Diagnosis and Management of Bloodstream Infections. *Clinical Infectious Disease*, 48: 238-245.

Sevim S.,  zt rk  .,  o kuner A.,  zgen  O., Avcı M. (2007). Bactec kan K lt r Sistemi ile  zole edilen Mikroorganizmaların Değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 21(3): 135-140.

Shondora WX., Tormey MP., Blaser MJ. (1992). An Outbreak of Bacteremic *Campylobacter jejuni* Infection. *The Mount Sınai Journal of Medicine*, 59: 53-56.

Siegman-Igra Y., Fourer B., Orni-Wasserlauf R., Golan Y., Noy A., Schwartz D. (2002). Reappraisal of Community-Acquired Bacteremia: A Proposal of a New

Classification for the Spectrum of Acquisition of Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 34: 1431-1439.

Smith JA., Bryce EA., Ngui-Yan JH., Roberts FJ. (1995). Comparison of BACTEC 9240 and BacT/Alert Blood Culture Systems in a Adult Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1905-1908.

Stefani S. (2009). Diagnostic Techniques in Bloodstream Infections: Where are We Going?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34: 9-12.

Su L., Han B., Liu C., Liang L., Jiang Z., Deng J., Yan P., Jia Y., Feng D., Xie L. (2012). Value of Soluble TREM-1, Procalcitonin and C Reactive Protein Serum Levels as Biomarkers for Detecting Bacteremia Among Sepsis Patients with New Fever in Intensive Care Units: A Prospective Cohort Study. *BMC Infectious Diseases*, 12: 157-167.

Sucu N., Çaylan R., Aydın K., Yılmaz G., Boz GA., Köksal İ. (2005). Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Kan Kültürlerinin Prospektif Olarak Değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 39: 455-464.

Sümerkan B. (1998). Nosokomiyal Sepsis: Etyoloji ve Mikrobiyolojik Tanısı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2: 182-187.

Sümerkan B., Gökahmetoğlu S., Esel D. (2001). Brucella Detection in Blood: Comparison of the BacT/Alert Standard Aerobic Bottle, BacT/Alert FAN Aerobic Bottle and BacT/Alert Enhanced FAN Aerobic Bottle in Simulated Blood Culture. *Clinical Infectious diseases*, 7: 369-393.

Tabriz MS., Riederer K., Baran Jr J., Khatib R. (2004). Repeating Blood Cultures During Hospital Stay: Practice Pattern at a Teaching Hospital and Proposal for Guidelines. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 624-627.

Tacconelli E., Karchmer AW., Yokoe D., Agota E. (2004). Preventing the Influx of Vancomycin Resistant Enterococci into Health Care Institutions, by Use of a Simple Validated Prediction Rule. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 964-970.

Thorpe TC., Wilson ML., Turner JE., Diguseppi JL., Willert M., Mirrett S., Reller LB. (1990). BacT/Alert: an Automated Colorimetric Microbial Detection System. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 1608-1612.

Towns ML., Jarvis WR., Hsueh P. (2010). Guidelines on Blood Cultures. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 43(4): 347-349.

Trautner BW., Clarridge JE., Darouiche RO. (2002). Skin Antisepsis Kits Containing Alcohol and Chlorhexidine Gluconate or Tincture of Iodine are Associated with Low Rates of Blood Culture Contamination. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 23(7): 397-401.

Trevino S., Ross D. (2007). Bacteremia and Sepsis. In: *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Textbook of Diagnostic Microbiology* (ed. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G). Third edition. Saunders Elsevier, 995-1008.

Tsalik EL., Jones D., Nicholson B., Waring L., Liesenfeld O., Park LP., Glickman SW., Caron LB., Langley RJ., Velkingburg JC., Coirns CB., Rivers EP., Otero RM., Kingsmore SF., Lalani T., Fowler VG., Woods CW. (2010). Multiplex PCR to Diagnose Bloodstream Infection in Patients Admitted from the Emergency Department with Sepsis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 26-33.

Urgancı K., Sayek İ. (2005). Sepsis ile ilgili tanımlamalar. In: *Yoğun bakım dergisi*, 5(2): 75-79.

Ustaoğlu A., Gün H. (1998). Kan Kültürleri Hakkında Bilmemiz Gerekenler. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2: 15-19.

Wallet F., Nseir S., Baumann L., Herwegh S., Sendid B., Boulo M., Roussel-Delvallez M., Durocher AV., Courcol RJ. (2010). Preliminary Clinical Study Using a Multiplex Real-time PCR Test for the Detection of Bacterial and Fungal DNA Directly in Blood. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 774-779.

Wayne PA. (2007). Principles and procedures for blood cultures. Approved Guideline. CLSI, M47-A, Vol:27, No:17.

Weinstein MP. (1996). Current Blood Culture Methods and Systems: Clinical Concepts, Technology and Interpretation of Results. *Clinical Infectious Disease*, 23: 40-46.

Weinstein MP., Towns ML., Quartey SM., Mirrett S., Reimer LG., Parmigiani G., Reller LB. (1997). 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. *Clinical Infectious Disease*, 24: 584-602.

Weinstein MP. (2003). Blood Culture Contamination: Persisting Problems and Partial Progress. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2275-2278.

Weinstein MP., Doern GV. (2011). A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 26-29.

Westh H., Lisby G., Breyse F., Böddinghaus B., Chomerat M., Gant V., Goglio A., Roglio A., Schuster H., Stuber F., Wissing H., Hoelt A. (2009). Multiplex Real-Time PCR and Blood Culture for Identification of Bloodstream Pathogens in Patients with Suspected Sepsis. *Clinical Microbiology Infectious*, 15: 544-551.

Willke A., Azak E. (2011). Kan Kültüründen Üreyen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları: Üç Yıllık Sonuçlar, *Ankem dergisi*, 25.

Wolk DM., Dunne WM. (2011). New Technologies in Clinical microbiology. *Journal of Clinical microbiology*, 49: 62-67.

Woo PCY., Lau SKP., Teng JLL., Tse H., Yuen KY. (2008). Then and Now: Use of 16S rDNA Gene Sequencing for Bacterial Identification and Discovery of Novel Bacteria in Clinical Microbiology. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14: 908-934.

Varma JK., McCorthy KD., Tasaneeyapan T., Monkong P., Kimerling ME., Buntheoun E., Sculier D., keo C., Phanuphak P., Teeratakulpisarn N., Udomsantisuk N., Dung NH., Lan NTN., Yen NTB., Cain KP. (2010). Bloodstream Infections Among HIV Enfected Outpatients, Southeast Asia. *Emerging Infectious diseases*, 16(10): 1569-1575.

Venkatesh M, Flores A, Luna RA, Versalovic J. (2010). Molecular Microbiological Methods in the Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*, 8(9): 1037-1048.

Vetter E., Torgerson C., Feuker A., Hughes J., Harmsen S., Schleck C., Horstmeier C., Roberts G., Cockerill III F. (2001). Comparison of the BACTEC Myco/F Lytic Bottle to the Isolator Tube, BACTEC Plus Aerobic F/Bottle and BACTEC Anaerobic Lytic/10 Bottle and Comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/Bottle to the Isolator Tube for Recovery of Bacteria, Mycobacteria and Fungi from Blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 4380-4386.

Von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G. (2001). Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus Aureus* Bacteremia. *N. England Journal Medical*, 344: 11-16.

Yagupsky P. (1999). Detection of *Brucellae* in Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3437-3442.

Yagupsky P. (2004). Use of the Bactec Myco/F Lytic Medium for Detection of *Brucella melitensis* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2207-2208.

Yurtsever SG., Baran N, Afşar İ., Yalçın MA., Kurultay N., Türker M. (2006). İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Klinik Dergisi*, 19: 56-59.

Yüce P., Demirdağ K., Kalkan A., Özden M., Denk A., Kılıç SS. (2005). Kan Kültürlerinde İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*, 19: 17-21.

Zhao Y., Park S., Kreiswirth BN., Ginocchio CC., Veyret R., Laayoun A., Troesch A., Perlin DS. (2009). Rapid Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification –Molecular Beacon Platform To Detect Fungal and Bacterial Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 2067-2078.

Ziegler R., Johnscher I., Martus P., Lenhardt D., Just HM. (1998). Controlled Clinical Laboratory Comparison of Two Supplemented Aerobic and Anaerobic Media Used in Automated Blood Culture Systems to Detect Bloodstream Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 657-661.

