

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ**  
**KOORDİNASYON BİRİMİ**



**SEPSİSİN MİKROBİYOLOJİK TANISINDA FARKLI YÖNTEMLERİN**  
**KARŞILAŞTIRILMASI**

**Proje No: TTU-2013-4670**

**Tez projesi, Tıpta Uzmanlık**

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Doç. Dr. M. Altay Atalay

Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

**Araştırmacı:**

Araş. Gör. Dr. Aysun Görkem

Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

2015

KAYSERİ



**T. C.**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SEPSİSİN MİKROBİYOLOJİK TANISINDA FARKLI  
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Aysun GÖRKEM**

**Danışman**

**Doç. Dr. Mustafa ALTAY ATALAY**

**KAYSERİ 2015**



**T. C.**

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SEPSİSİN MİKROBİYOLOJİK TANISINDA FARKLI**

**YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Aysun GÖRKEM**

**Danışman**

**Doç. Dr. Mustafa Altay Atalay**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından**

**TTU-13-4670 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**KAYSERİ 2015**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Duygu Perçin'e, her konuda yardımlarını, bilgilerini ve cömertliğini esirgemeyen, tez çalışmamın devamında ve sonuçlanmasında çok büyük desteğini hissettiğim tez danışmanım Doç. Dr. Mustafa Altay Atalay hocama, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin Kılıç'a ve uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmama klinik anlamda destek olan Prof. Dr. Bilgehan Aygen'e, istatistiksel analizlerde yardımcı olan Prof. Dr. Osman Günay'a teşekkür ederim.

TTU-13-4670 no'lu bu tez projesini maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca anabilim dalımızda beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca dualarını benden esirgemeyen anne ve babama, kardeşlerime, asistanlık ve tez sürem boyunca hep yanımda olan bana varlığıyla huzur veren kıymetli yol arkadaşım, sevgili eşim Dr. Hasan Görkem'e ve dünyalar tatlısı, yaşama sevincim, yavrumuz İpek Sena Görkem'e varlığından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET .....	x
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. TANIMLAR.....	3
2.1.1. Enfeksiyon.....	3
2.1.2. Bakteriyemi .....	4
2.1.3. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIYS veya SIRS).....	4
2.1.4. Sepsis .....	4
2.1.5. Ağır (ciddi) Sepsis.....	4
2.1.6. Septik Şok .....	4
2.1.7. Multipl organ yetmezliği (MODS).....	4
2.2.EPİDEMİYOLOJİ .....	7
2.3. PATOGENEZ .....	7
2.3.1. Mikrobiyal faktörler.....	9
2.3.2. Konağa ait faktörler.....	10
2.3.3. Medyatör salınımı .....	10
2.3.4. Fosfolipid Kaynaklı Medyatörler .....	11
2.3.5. Vasküler Endotel Aktivasyonu .....	11
2.3.6. Sitokinler .....	11

2.3.7. Kompleman Sistemi .....	12
2.3.8. Koagülasyon Faktörleri .....	12
2.3.9. Apoptozis .....	14
2.4. ETYOLOJİ .....	14
2.5. HASTANE KAYNAKLI BAKTERİYEMİ .....	15
2.5.1. Primer bakteriyemi .....	15
2.5.2. Sekonder bakteriyemi .....	16
2.6. KLİNİK BELİRTİ VE BULGULAR .....	16
2.6.1. Sepsiste Organ Yetmezliği .....	16
2.7. SEPSİS TANISI .....	17
2.7.1. Ayırıcı tanıda kullanılan testler .....	17
2.7.2. Sepsis Etkenini Tanımlayıcı Testler .....	19
2.7.2.1. Kan kültürü .....	19
2.7.2.2. Moleküler yöntemler .....	22
2.8. PROGNOZ .....	24
2.9. TEDAVİ .....	25
2.9.1. Destek tedavisi .....	25
2.9.2. Antimikrobiyal tedavi .....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	27
3.1. KULLANILAN BESİYERLERİ .....	29
3.1.1. Kanlı Agar .....	29
3.1.2. Eozin Metilen Blue Agar .....	29
3.1.3. Mueller-Hinton Agar .....	30
3.1.4. Triple Sugar Iron Agar (Acumedia, USA) .....	31
3.1.5. Simmon's Sitrat Agar .....	32
3.1.7. MIO (Motility-indol-ornitin) Besiyeri .....	33

3.1.8. Bile Esculin Agar .....	34
3.1.9. PYR (L-pyrolidonyl-beta-naphthylamide) Agar .....	35
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR VE DİĞER GEREÇLER .....	36
3.3. BAKTERİ İZOLASYONU VE TANIMLANMASI .....	36
3.3.1. Konvansiyonel yöntemler .....	36
3.3.1.1. Gram boyama .....	37
3.3.1.2. Katalaz testi .....	37
3.3.1.3. Koagülaz testi .....	38
3.3.1.4. Basitrasin duyarlılık testi .....	38
3.3.1.5. Trehaloz mannitol testi .....	38
3.3.1.6. Safrada erime testi .....	39
3.3.1.7. Optokine duyarlılık testi .....	39
3.3.1.8. CAMP testi .....	39
3.3.1.9. Safralı eskülinli agar testi .....	40
3.3.1.10. PYR hidrolizi testi .....	40
3.3.1.11. Biyoşimik testler .....	40
3.3.1.11.a. TSI besiyerinin değerlendirilmesi .....	40
3.3.1.11.b. Sitrat besiyerinin değerlendirilmesi .....	41
3.3.1.11.c. MIL ve MIO besiyerlerinin değerlendirilmesi .....	41
3.3.2. Phoenix otomatize sistemi .....	41
3.3.3. Moleküler yöntemler .....	41
3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI .....	53
3.4.1. Disk difüzyon testi .....	53
3.4.2. Phoenix otomatize sistemi .....	53
4. BULGULAR .....	54
5. TARTIŞMA .....	60

6. SONUÇLAR.....	69
7. KAYNAKLAR.....	70



## KISALTMALAR

ACCP	: Amerika Göğüs Hastalıkları Uzmanları Koleji
ARDS	: Erişkin Solunum Yetmezliği Sendromu
AT III	: Antitrombin 3
CRP	: C-Reaktif Protein
°C	: Santigrad derece
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DIC	: Dissemine Intravasküler Coagülopati
EMB	: Eozin Metilen Blue
EPCR	: Endotel Protein C Reseptörü
G-CSF	: Granülosit Koloni Stimulan Faktör
HIV	: Human Immunodeficiency Virüs
INR	: Uluslararası normalizasyon oranı
IL	: Interlökin
IL-1 $\beta$	: Interlökin 1 beta
IFN $\gamma$	: Interferon gama
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KKY	: Konjestif Kalp Yetmezliği
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
LPS	: Lipopolisakkarit
MHA	: Müller Hinton Agar
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleks
MIL	: Motility-indol-lysine
MIO	: Motility-indol-ornitin
MODS	: Çoklu Organ Yetmezlik Sendromu
NNIS	: Nosocomial Infections Surveillance
NF- $\kappa$ B	: Nükleer Faktör kappa B
PAF	: Trombosit Aktive Eden Faktör
PG	: Prostaglandin
PCT	: Prokalsitonin

PCR	: Polymerase Chain Reaction
PYR	: L-pyrolidonyl-beta-naphthylamide
PRR <sub>s</sub>	: Pattern Recognition Receptors
SCCM	: Yoğun Bakım Topluluğu
SİYS veya SİRS	: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
TCR	: T hücre reseptörü
TFPI	: Doku faktör yolu inhibitörü
TLR	: Toll-like reseptör
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
TSI	: Triple Sugar Iron
TXA <sub>2</sub>	: Tromboksan A <sub>2</sub>
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS uluslararası sepsis tanımları konferansında (2012) kabul edilen kriterler.....	6
<b>Tablo 2.</b>	Sepsis oluşumunda predispoze faktörler.....	8
<b>Tablo 3.</b>	Sepsis tanısı alan olguların altta yatan hastalıkları .....	54
<b>Tablo 4.</b>	Predispozan faktörler .....	55
<b>Tablo 5.</b>	Sepsis ataklarının geliştiği klinikler ve sepsis şiddeti.....	55
<b>Tablo 6.</b>	Sepsis atakları sırasında mikrobiyolojik olarak dokümanite edilmiş enfeksiyon odakları.....	56
<b>Tablo 7.</b>	Mikroarray yöntemi ile rutin sonuçların uyumu.....	57
<b>Tablo 8.</b>	Mikroarray yöntemi ile rutin yöntemler arasındaki farklı sonuçlar.....	58
<b>Tablo 9.</b>	Mikroarray yöntemi ile rutin sonuçların direnç uyumu.....	58
<b>Tablo 10.</b>	Mikroarray yöntemi ile rutin sonuçların ortalama süreleri.....	59

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Verigene Processor SP.....	45
Şekil 2. Ekstraksiyon tepsisini yükleme .....	46
Şekil 3. Pipet ucu .....	46
Şekil 4. Pipet ucu kabı düzeneğini yükleme .....	47
Şekil 5. Çekmece kelepçesini indirme .....	48
Şekil 6. Kartuşun kapağını çıkarma .....	49
Şekil 7. Kartuşa vurma .....	49
Şekil 8. Kartuşu yerleştirme.....	50
Şekil 9. Örneğin Yüklenmesi.....	50
Şekil 10. Hedeflerin seçimi.....	51
Şekil 11. Ekstraksiyon tepsi .....	51
Şekil 12. Substratın çıkarılması .....	52

# SEPSİSİN MİKROBİYOLOJİK TANISINDA FARKLI YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

## ÖZET

**Amaç:** Sepsis ciddi seyirli enfeksiyonlardan biri olup, yüksek mortalite ve morbidite sebebidir. Tanının hızla konarak tedaviye başlanması önemlidir. Bu çalışmada sepsisin tanısında mikroarray tabanlı bir yöntem ile rutin kan kültürü yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinde servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan gelen, tekniğine uygun olarak alınmış kan kültürleri BacT/Alert3D (bioMerieux, Fransa) otomatize kan kültürü sisteminde inkübe edildi. Üreme olduğu saptanan 52 kan kültürü şişesinden uygun besiyerlerine alt kültürler yapıldı ve rutin tanımlama testleri uygulandı. Üreme olan şişelerden aynı anda mikroarray yöntemi ile çalışılması amacıyla 1ml kan alındı ve saati not edilerek Verigene sisteme ( Nanosphere, Inc., Northbrook, IL, USA ) yerleştirildi. On iki Gram-pozitif bakteri ve 3 direnç genini tespit eden Verigene Gram-pozitif kan kültürü ( BC-GP ) testi ve 9 Gram-negatif bakteri cins/türü ve 6 antibiyotik direnç genini tespit eden Verigene Gram-negatif kan kültürü ( BC-GN) testi kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen 31'i kadın (% 59,6), 21'i erkek (% 40,4) hastanın yaş ortalaması 45.78 (0-89) idi. Hastaların % 74'ü nozokomiyal % 26'sı toplum kaynaklı sepsis tanısı aldı. Sepsis atağı sırasında laboratuvara gönderilen kan kültürlerinin rutin sonuçları mikroarray yöntemi sonuçları ile karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında istatistiksel olarak yüksek oranda (%96) uyum olduğu görüldü. Aynı zamanda sonuçlanma süreleri ortalamaları bakımından karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (  $p < 0.001$  ).

**Sonuç:** Verigene kan kültürü testlerinin sık karşılaşılan patojenler için uygun ve doğru bir yöntem olduğu belirlendi. Ayrıca bu yöntemin hastaların tedavi sürelerini azaltma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varıldı. Sepsis tanısının sık konulduğu, antibiyotik kullanımının yaygın olduğu bölümlerde klinisyene hızlı sonuç verebilmesi büyük avantajdır. Rutinde bu sistemin kullanımının önündeki en büyük engel yüksek maliyeti olarak görülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kan kültürü, mikroarray yöntemi, sepsis

# COMPARISON OF DIFFERENT METHODS IN THE MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF SEPSIS

## ABSTRACT

**Aim:** Sepsis, is one of the severe infectious diseases and is the cause of high mortality and morbidity. It is important to diagnose rapidly and start therapy. In this study, we aimed to compare results of routine blood tests and a method which is microarray based in diagnosis of sepsis.

**Materials and Methods:** We incubated blood cultures with BacT/Alert3D (bioMerieux, Fransa) automated blood culture system which are taken technically correct from patients who are taking medical care services and intensive care units in Erciyes University Medical School. Subcultures were made to appropriate media from 52 growth-detected blood cultures and routine identification tests were applied. At the same time we took 1 ml blood sample from growth-detected blood cultures and studied with Verigene system ( Nanosphere, Inc., Northbrook, IL, USA ) by recording time. We evaluated the results using Verigene Gram-positive bacteria blood culture tests ( BC-GP ) which can detect 12 Gram-positive bacteria and 3 drug resistance gene and Verigene Gram-negative bacteria blood culture tests ( BC-GN ) which can detect 9 Gram-negative bacteria and 6 drug resistance gene.

**Results:** Thirty-one female patients (59.6 %) and 21 male patients (40.4%) were included in this study and the mean age was 45.78 (0-89) years. 74% of patients were diagnosed with nosocomial sepsis and 26% were diagnosed with community acquired sepsis. When we compared the routine blood culture test results taken in the sepsis attack with the microarray method results, statistically high rate (96%) of coherence was found. Meanwhile when we compared the average completion time between these tests we found a statistically significant difference (  $p < 0.001$  ).

**Conclusion:** We determined that Verigene blood culture tests are convenient and accurate for the commonly encountered pathogens. Also concluded that this method have the potential for reducing the duration of the treatment of patients. It is an important advantage of this test can provide fast results to clinicians in the departments where sepsis is diagnosed and antibiotic therapy is used commonly. The biggest challenge of this method is its high cost for using routinely.

**Key Words:** Blood culture, microarray method, sepsis

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakteriyemi ve/veya sepsis, en ciddi seyirli enfeksiyon türlerinden biri olup, yüksek mortalite ve morbidite ile seyrederek. Spesifik etkenin saptanması için geçen süre içerisinde genellikle, rehberlerde önerilen ampirik tedavi protokolleri uygulanır. Ancak etkene yönelik tedaviye ne denli hızlı başlanır ise prognozun o denli iyi olduğu birçok çalışma ile desteklenmiştir. Bakteriyemi geçici bir tablo olabileceği gibi, klinik anlamda en uç nokta sayılabilen, genellikle çoklu organ yetmezliğine neden olan sepsis ( SIRS; systemic inflammatory response syndrome ), septik şok tablosuna ilerleyebilir (1).

Kanda bakteri bulunması bakteriyemi olarak ifade edilirken, bakteriyemi tablosunun uzun süreli devamı sonucu, immünolojik mekanizmaların da olaya katılmasıyla beliren tablo sepsis olarak tanımlanır. Sepsis toplum kaynaklı veya hastane kaynaklı (nozokomiyal) olarak ikiye ayrılır. Bir hastanın hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra alınan kan kültürlerinde klinik olarak anlamlı kan kültür pozitifliği nozokomiyal bakteriyemi olarak isimlendirilir (2). Bakteriler, virüsler, mantarlar, parazitler sepsise neden olabileceği gibi, ağır travma veya pankreatit gibi noninfeksiyöz olaylarda da gelişebilmektedir (3).

Sepsis, septik şok ve organ yetmezliği gibi sepsis ile ilgili klinik tabloların gerçek insidansını vermek zordur. Buna rağmen, sepsis görülme sıklığında son yıllarda birçok ülkede önemli artışlar olduğu dikkati çekmektedir. ABD’de yılda 70.000-300.000 sepsis olgusu görüldüğü ve yaklaşık 250.000 olgunun sepsis nedeniyle kaybedildiği belirtilmektedir (3). Sepsise bağlı ölümlerde yaş, enfeksiyon etkeni, enfeksiyonun kazanıldığı yer ve altta yatan primer hastalık önemlidir (4).

Rutin laboratuvarda bakteriyeminin spesifik tanısı, etkenin kan kültüründe üretilmesiyle konmaktadır. Bu tanı yöntemi halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Kan kültüründe etkenin saptanabilmesi için en gelişmiş sistemlerde dahi belirli bir süreye gereksinim vardır. Süre dışında, örneğin alınma zamanı, hastaların antibiyotik alıyor olması, izolasyonları zor olan bakteriler gibi sebeplere bağlı olarak her zaman etkenin saptanmasının mümkün olmaması gibi bazı faktörler kan kültürü testlerinin başlıca dezavantajlarıdır. Bununla beraber kan kültüründe etkenin saptanarak, duyarlılık testlerinin çalışılması yaklaşık 2-5 günlük bir süre gerektirdiğinden, günümüzde spesifik etkeni aynı gün içerisinde saptayabilen ve saptanan etkenin majör direnç paternlerinin çalışılabileceği moleküler testler de kullanıma sunulmuştur (3).

Sepsis tanısının ivedilikle konup, tedaviye başlanması ile prognoz arasında, erken tanı, erken tedavi, iyi prognoz şeklinde bir korelasyon vardır.

Bu çalışmada sepsisin erken tanısında mikroarray tabanlı bir yöntemin rutin kan kültürü yöntemleri ile karşılaştırılması ve erken tanının kliniğe katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

Sepsis Yunanca'da çürüme ve kokuşma anlamına gelmektedir. Tarihi olarak sepsis konakta patojen mikroorganizmanın veya onun biyolojik olarak aktif ürünlerinin varlığı anlamına gelmektedir. Ateş ve hipotansiyon gibi klinik sekellere yol açan inflamatuvar cevabın gelişmesinde, oluşan bu ürünler etkilidir (5). Endotel kaybının yanı sıra dolaşım sistemi fonksiyonları ve hücre içi homeostazis bozulmaktadır.

Sepsis, bir çok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar gidebilen öldürücü bir enfeksiyon hastalığıdır (3). Organ disfonksiyonu ve ölüm sebebi, hücre hipoksisi ve apoptozdur.

Sepsise eşlik eden klinik tabloyu ilk kez, M.Ö. 400 yılında tanımlayan Hippocrates, "akut bir hastalıkta ekstremitelerin soğuması kötü bir belirtidir" ifadesini kullanmıştır (1). Bu tanımlamadan yaklaşık 24 asır sonra günümüzde, sepsis fizyopatolojisindeki gelişmelere karşın, terminolojideki karmaşanın sürdüğü gözlenmektedir. 1991 yılında Society of Critical Care Medicine ve American Collage of Chest Physicians'ın konsensus toplantısında enfeksiyon, bakteriyemi, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), sepsis, septik sok ve multipl organ disfonksiyon sendromuna (MODS) ilişkin evrensel tanımlamalar geliştirilmiştir (6).

### 2.1. TANIMLAR

**2.1.1. Enfeksiyon:** Mikroorganizmaların varlığına ya da bunların normalde steril olan konak dokusuna invazyonuna karşı oluşan inflamatuvar yanıtla karakterize bir mikrobiyal fenomendir.

**2.1.2. Bakteriyemi:** Kanda canlı bakterinin bulunması durumudur.

**2.1.3. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SİYS veya SİRS):** Değişik ciddi klinik bulgularla kendini gösteren sistemik inflamatuvar yanıtıdır. Bu yanıt aşağıdaki durumların iki ya da daha fazlasıyla kendini gösterir:

- Vücut ısısı;  $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$  ya da  $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı;  $>90$  atım/dk
- Solunum sayısı;  $>20$ /dk ya da  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg
- Beyaz küre sayısı;  $>12.000$  hücre/ $\text{mm}^3$ ,  $<4000$  hücre/ $\text{mm}^3$  ya da  $>10$  immatür hücre formlarının görülmesidir.

#### **2.1.4. Sepsis**

Enfeksiyona sistemik inflamatuvar cevap sepsis olarak isimlendirilir. Enfeksiyon sonucu SIRS bulgularının iki veya daha fazlasının bulunmasıdır.

#### **2.1.5. Ağır (ciddi) Sepsis**

Sepsis ile birlikte organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonun bulunması durumudur. Hipoperfüzyon veya perfüzyon bozukluğunda, laktik asidoz, oligüri veya mental durumda akut değişiklikler bulunabilir. Sepsise bağlı hipotansiyon ise sistolik kan basıncının  $90\text{ mmHg}$ 'nin altına düşmesi veya diğer nedenler olmaksızın, bilinen sistolik kan basıncının  $40\text{ mmHg}$ 'den daha fazla düşmesidir.

#### **2.1.6. Septik Şok**

Sepsis bulgularına ek olarak yeterli sıvı tedavisine rağmen, hipotansiyon ile birlikte perfüzyon bozukluğu belirtilerinin (laktik asidoz, oligüri, akut mental değişiklik) devam etmesi durumudur. Perfüzyon bozukluğu belirlendiği zaman inotropik veya vazopressör ilaç alanlarda hipotansiyon olmayabilir. Bu hastalar yine de septik şokta kabul edilir.

#### **2.1.7. Multipl organ yetmezliği (MODS)**

Sepsis, septik şok ile birlikte bozulmuş organ fonksiyonu, erişkin solunum yetmezliği sendromu (ARDS), böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve yaygın damar içi pıhtılaşma (dissemine intervasküler koagülasyon; DIC) gibi klinik durumların bulunmasıdır (6).

ACCP/SCCM uzlaşı konferansındaki (1992) tanımlar üzerinde tartışmalar olması sonucunda, sepsis fizyopatolojisini daha iyi yansıtan tanımlara ihtiyaç olduğundan 2001 yılında ve 2012 yılında Society of Critical Care Medicine (SCCM), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), American College of Chest Physicians (ACCP), American Thoracic Society (ATS) ve Surgical Infection Society (SIS) katılımıyla uluslararası sepsis tanımları konferansı yapılmıştır (Tablo 1). 2001 konferansı sonucunda 1992 tanımları geçerli olmakla birlikte, özellikle klinik çalışmalara alınan hastaları daha iyi tanımlamak ve sınıflamak amacı ile bazı eklemeler düşünülmüştür. Ayrıca sepsis tanı kriterleri arasına C-reaktif protein, prokalsitonin, laktik asit, kreatinin, bilirubin gibi birçok biyokimyasal ölçütte artışın da dahil edilmesi önerilmiştir (7). 2012 konferansı sonucunda ise 2001 konferansında kabul edilen kriterler üzerinde ufak değişiklikler yapılmıştır (8).

**Tablo 1.** SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS uluslararası sepsis tanımları konferansında (2012) kabul edilen kriterler (8)

### **Enfeksiyon**

Gösterilmiş veya şüphe edilen enfeksiyon ve aşağıdakilerden bazıları:

#### **Genel parametreler**

Ateş (vücut ısısı  $>38.3^{\circ}\text{C}$ ) veya hipotermi (vücut ısısı  $<36^{\circ}\text{C}$ )

Kalp atım hızı  $>90/\text{dk}$  veya yaş için normal değerden  $>2$  standart sapma

Takipne  $>30/\text{dk}$

Mental durum değişikliği

Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte  $>20\text{ml/kg}$ )

Hiperglisemi (diyabetin olmadığı durumlarda plazma glukozu  $>110\text{mg/dl}$  veya  $7,7\text{ mM/I}$ )

#### **Enflamatuvar parametreler**

Lökositoz (beyaz küre sayısı  $>12000/\text{mm}^3$ )

Lökopeni (beyaz küre sayısı  $<4000/\text{mm}^3$ )

$>10\%$  immatür formun olduğu normal beyaz küre sayısı

Plazma CRP'nin normal değerden  $>2$  standart sapma

Plazma prokalsitonin (PCT) değerinin normal değerden  $>2$  standart sapma

#### **Hemodinamik parametreler**

Arteriyel hipotansiyon (sistolik kan basıncının  $<90\text{ mmHg}$ , ortalama arteriyel basıncın  $<70\text{ mmHg}$  veya sistolik kan basıncının yetişkinlerde  $>40\text{ mmHg}$  düşmesi veya yaşa göre normal değerden  $<2$  standart sapma olması)

#### **Organ disfonksiyon parametreleri**

Arteriyel hipoksemi ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 <300$ )

Akut oligüri (en az 2 saat idrar çıkışı  $<0.5\text{ mL/kg}^{-1}\text{h}^{-1}$  veya  $45\text{ mL/I}$ )

Kreatininde  $\geq 0,5\text{ mg/dl}$  artış

Koagülasyon anormallikleri (internasyonal normalizasyon oranı (INR)  $>1.5$  veya aktive parsiyel tromboplastin zamanı  $>60\text{ s}$ )

İleus (bağırsak seslerinin olmaması)

Trombositopeni (trombosit sayısı  $<100000/\text{mm}^3$ )

Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin  $>4\text{ mg/dl}$  veya  $70\text{ mmol/I}$ )

#### **Doku perfüzyon parametreleri**

Hiperlaktatemi ( $>1\text{ mmol/l}$ )

Kapiller doluşta azalma veya deride renk değişikliği

## **2.2.EPIDEMİYOLOJİ**

Olgu tanımlarında farklı kriterler ve hesaplamalarda farklı yöntemler kullanılması nedeni ile epidemiyolojide farklı rakam ve oranlarla karşılaşılmaktadır. Bununla birlikte sepsis ve ağır sepsis olgularında bir artış olduğunu söylemek mümkündür (9).

Sepsis insidansının artışında rol oynayan faktörler: 1. HIV ile enfekte kişiler, kanserler, yaşlılık ve organ transplant hastaları gibi sepsise zemin hazırlayan duruma sahip hastaların yaşam sürelerinde ve insidansında artış 2. İntravasküler kateterler ve üriner kateterler gibi tıbbi protezlerin kullanımının artması ve 3. Virülan ve çoğul dirençli patojenlerin seçilmesine zemin hazırlayan antimikrobiklerin yaygın ve uygun olmayan şekilde kullanımını içerir (10).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'inde her yıl yaklaşık 500.000 yeni olgu bildirilmekte olup, kaba ölüm oranı % 35'tir. Yeni tahminlere göre yılda 751.000 yeni sepsis olgusunun görüldüğü, 250.000'inin ölümlle sonuçlandığı düşünülmektedir (11). Sepsis insidansında ise % 13.7 oranında artış izlenmiştir. Genel nüfusa göre hesaplandığında 100.000 nüfus için 1979 yılında 82.7 olan olgu sayısı, 2000 yılında 240.4 olarak bulunmuştur (12).

Avrupa'da 2002 yılında yapılan, 24 ülkeyi ve 198 yoğun bakım ünitesini kapsayan bir çalışmada toplam 3147 hasta çalışmaya alınmış ve sepsis insidansı %37.4 olarak bulunmuştur (13).

Ülkemizde yoğun bakım ünitelerinde yapılan çalışmalarda ise nozokomiyal bakteriyemi ve sepsis insidansı %7.6 – 17.2 arasında bildirilmektedir (14-16).

## **2.3. PATOGENEZ**

Sepsis mikroorganizmanın konak defansı ile etkileşimi sonucu oluşan karmaşık bir olaydır. Sepsisin şiddetini mikroorganizmanın virülans faktörleri ve konağın immün yanıtı belirler. Sepsis için predispozan faktörler Tablo 2' de özetlenmiştir (3).

**Tablo 2.** Sepsis oluşumunda predispoze faktörler

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

\*DM: Diabetes Mellitus

\*\*KBY:Kronik Böbrek Yetmezliği

\*\*\*KKY:Konjestif Kalp Yetmezliği

Dolaşıma girerek sepsise neden olan mikroorganizmalar, genellikle damar dışı bir enfeksiyon odağından kaynaklanır. Bazen de enfeksiyon damar içi kateter, septik tromboflebit, bakteriyel endarterit, endokardit, mikotik anevrizmalar ve damar greftlerinden kaynaklanabilir (3). Sepsislerde en sık primer enfeksiyon odağını; üriner sistem, genital sistem, solunum sistemi, deri ve yumuşak doku, karın içi ve damar içi kateterler oluşturur.

Toplum kökenli sepsislerde en sık giriş kapısı solunum sistemi ve üriner sistemdir. Nozokomiyal sepsislerde en sık giriş kapısı intravasküler ve üriner kateterlerdir. Yoğun bakım ünitelerinde ise nozokomiyal pnömoniler ön plandadır (3).

### 2.3.1. Mikrobiyal faktörler

Sepsis etkeni olan bakterilerin çoğunluğu endojen floradan kaynaklanmaktadır. Sepsis ve onun sonucu olarak gelişen klinik tabloların oluşmasında, bakteriyel invazyon ile beraber bakteriyel hücresel yapıların ve toksinlerin de önemli rolü vardır. Bu hücresel yapılar ve toksinler organizmada değişik biyolojik sistemleri aktive eder.

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarındaki endotoksin, formil peptidler, ekzotoksinler, proteazlar sepsise neden olurken, Gram-pozitif bakterilerin ekzotoksinlerinin, enterotoksinlerinin, hemolizinlerinin, peptidoglikanlar ve lipoteikoik asit yapılarının immun sistemi uyarabildikleri bilinmektedir. Mantarların hücre duvarındaki yapısal elemanları (mannan, galaktomannan gibi) ile SIRS sürecini başlattıkları tahmin edilmekle birlikte, fungal enfeksiyonlar da sepsise neden olabilmektedir (17,18).

Bakteriyel endotoksinler arasında etkisi en iyi bilinen yapı Gram-negatif bakterilerin dış membranının bir bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) yapısındaki endotoksinlerdir. LPS monosit, makrofaj ve nötrofillerin yüzeyindeki CD14 reseptörlerine bağlanarak aktive olmalarını sağlar. Böylece inflamatuvar mediyatörlerin salınımına neden olarak sepsis tablosunu oluşturur. Lipopolisakkarit CD14 pozitif olmayan hücreleri de aktive edebilir (18). LPS' in konakçı hücreleri ile etkileşmesi sonucunda kompleman ve koagülasyon sistemi aktive olur (19). Aynı zamanda monosit, makrofaj ve diğer hücreler tarafından sitokinlerin üretimi ( IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , PAF gibi ), bunların da prostaglandin ve lökotrienlerin üretimini uyarması da LPS' lerin konakçıyla etkileşimi sonucu gerçekleşir.

Endotoksin dışında diğer bazı bakterilerde bulunan toksinler, Gram-pozitif bakteri ve mantar hücre duvarı yapıları ve virüsler de sepsis kaskadını başlatabilme potansiyeline sahiptirler.

Gram-pozitif bakterilerde endotoksin mevcut değildir. Gram-pozitif bakterilerde bulunan ekzotoksinler süperantijen özelliği gösterip, ayrım yapmadan MHC (major histokompatibilite kompleksi ) Class II ile ve T-lenfosit 10 reseptörü (TCR) Vb alanının kısıtlı bir bölümüyle bağlanabilmektedir (18,20). Gram-pozitif bakteriler hücre duvarı komponentlerinden peptidoglikanlar ile tanımlanırlar ve bakteri toksinleri (ekzotoksinler) açığa çıkartırlar. Gram-pozitif ya da negatif sepsis klinik olarak birbirinden farklı değildir.

### 2.3.2. Konağa ait faktörler

Enfeksiyona karşı konağı koruyan savunma mekanizmaları kısaca anatomik bariyerler, hücrel immunité, spesifik ve nonspesifik humoral immunité olup bunlardan birinin dahi bozulması, lokal ve sistemik enfeksiyona sebep olabilir. Konağın sepsise cevabı mikrobiyal sinyal molekülleri, lökositler, humoral mediyatörler ve vasküler endotel arasındaki kompleks olaylardan oluşmaktadır (19).

### 2.3.3. Medyatör salınımı

Lipopolisakkarit reseptörünün tanımlanmasına kadar Gram-negatif bakterilerin septik cevabı nasıl başlattıkları anlaşılamamıştı. Günümüzde bu olayın lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP) ve opsonik reseptör olan CD14'e bağlı olduğu anlaşılmıştır.

Dolaşımda bulunan LPS, LPS-bağlayıcı protein ile kompleks oluşturur. LPS-LBP kompleksi kendisi için reseptör olan CD14'e tutunur (20). Mikroorganizmalardaki patojen ile ilişkili moleküler paternler, başta antijen sunan hücreler olmak üzere doğal immün sistem içerisinde yer alan hücrelerin yüzeyinde bulunan, patern tanıyan reseptörler (pattern recognition receptors [PRRs]) olarak adlandırılan reseptörler tarafından tanınır (21,22). Ve doğal immün cevap oluşur. PRR'ler yapısal olarak farklı proteinler olup birkaç reseptör ailesini (Toll-like reseptör, kollajenöz lektinler) meydana getirirler. Hücre içinde CD14 yokluğunda, LPS'ye karşı hücrel yanıt transmembranda bulunan Toll-like reseptör'e bağlıdır. TLR, sitokin ve diğer medyatörlerin sentez ve salınımına öncülük eden sinyal yollarını uyarır.

TLR'ler sonunda nükleusa nükleer faktör kappa B (NF-κB) translokasyonu ile sonuçlanan intrasitoplazmik sinyal sistemini başlatır (22).

İnsanda günümüze kadar TLR'lerin 10 tipi tanımlanabilmiştir (20). İmmün sistem hücreleriyle birlikte epitel, endotel, kalp kası ve yağ hücresi gibi çeşitli hücrelerin de patojenleri TLR'ler aracılığıyla tanıdığı gözlenmiştir. Bunun yanında farklı mikrobiyal yapıların, farklı TLR'lere bağlandığı bilinmektedir. Toll-like reseptör-2 (TLR-2) Gram-pozitif bakterilerin peptidoglikanını, lipoteikoik asidini, TLR-4 Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkaridini tanıdığı biliniyor (20,21). TLR-2 veya TLR-4'ün mikroorganizmaların epitoplarna bağlanması hücre içi sinyal iletim yollarını uyararak sitozolik NF-κB'nin aktivasyonuna neden olur. Aktive NF-κB sitoplazmadan nükleusa giderek TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuar sitokinlerin ve IL-10 gibi anti



inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu artırır. TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  adaptif immün cevabı aktive eder. Ancak konakta direkt ve indirekt hasara da neden olurlar (20,22).

#### **2.3.4. Fosfolipid Kaynaklı Medyatörler**

Bu medyatörler otokoidler veya kısa süreli lokal hormonlar olarak da bilinen inflamasyon ve hemostazda görevli metabolitlerdir. Araşidonik asit bir poliansatüre yağ asidi olup hücre membran fosfolipidlerinin fosfolipazlarla yıkılması sonucunda oluşur. Oluşan araşidonik asitin metabolizması lipoksijenaz ve siklooksijenaz olmak üzere iki yol izleyebilir.

Lipoksijenaz ile oluşan ürünler lökotrienlerken, siklooksijenaz ile oluşan ürünler prostaglandinlerdir. Lökotrienlerden LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> vazokonstriksiyon, bronkospazm, permeabilite artışı yaparken LTB<sub>4</sub> kemotaksiste görev almaktadır. Prostaglandinlerden olan prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) trombosit kümelenmesini inhibe ettiği gibi vazodilatör etki de gösterir. Tromboksan (TXA<sub>2</sub>) ise vazokonstriktif etkili olup trombosit kümelenmesini indükleyici etki gösterir. PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>' nin etkileri ortak olup vazodilatasyonla ödeme neden olurlar (19).

Trombositleri aktive eden faktör (PAF), fosfolipid kökenli diğer bir medyatördür. Trombositlerin aktive olmasını sağlarken vasküler permeabiliteyi artırır. Lökosit agregasyonunu, adezyonunu, kemotaksisi uyarıp diğer medyatörlerin salınımına neden olur.

#### **2.3.5. Vasküler Endotel Aktivasyonu**

Normal şartlarda endotel antikoagülan ve antitrombotik özelliklere sahiptir. Bu özellikleri doku faktörü inhibitörleri, nitrik oksit, prostosiklin ve trombomodülin salınımı ile gerçekleştirir. Sepsis geliştiğinde ise inflamasyonun kaynağı ve hedefi haline gelir. Medyatörlerin aşırı salınımı sonucunda endotelde hasarlanma meydana gelir. Böylelikle sepsisin klinik bulguları ve komplikasyonları oluşmaya başlar (20).

#### **2.3.6. Sitokinler**

Sepsiste ilk salınan proinflamatuvar sitokin TNF- $\alpha$  (Tümör nekroz faktör) 'dır. TNF- $\alpha$  sepsiste olaya katılan pek çok sitokinden sadece birisidir. IL-1 $\beta$  sepsisin ağırlaşmasında rol almakta olup TNF- $\alpha$  ile biyolojik olarak bağlantılıdır. İki sitokin sinerjistik etkiyle inflamasyonu artırarak klinik bulguların büyük kısmının ortaya çıkmasına neden olurlar (20).

Proinflamatuvar sitokinler nötrofiller ve endotel hücreleri üzerindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır. Sitokinler nötrofil, monosit, makrofaj ve trombositlerin endotel hücrelerine bağlanmak üzere aktivasyonunu sağlar (21). Bu hücrelerden salınan medyatörler endotel hücrelerinde hasara yol açarak vasküler permeabilitenin artmasına neden olurlar. Bu permeabilite artışı ile protein içeriği bol mayi akciğer ve diğer dokularda toplanır. Sağlam endotel yüzeyinin sağladığı prokoagülan ve antikoagülan dengesi sepsis oluşması ile bozulur ve böylelikle sitokinler koagülasyonu da uyarır. Sepsiste aktive endotel hücrelerinin sentezlediği potent bir vazodilatör olan nitrik oksit septik şokta anahtar bir medyatör olarak rol oynar. IL-10 makrofajları inaktive eder, antiinflamatuvar etkisi de mevcuttur (21,22).

TLR'lerin aktivasyonu ile sinyalizasyon kaskadı başlar ve NF- $\kappa$ B aktive olur. Bu aktivasyonla birlikte TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 ve IL-12 ile IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinler salınır (22). Yapılan araştırmalar, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-6, IL-8 ve IFN $\gamma$  'yı genellikle proinflamatuvar sitokinler olarak açıklarken, IL-4, IL-13 ve IL-10'u da antiinflamatuvar etkili sitokinler olarak açıklamaktadır.

### **2.3.7. Kompleman Sistemi**

Bakterinin plazma ile teması, patojen yüzeyindeki kompleman sistemlerinin aktive olmasına neden olabilir. C3a ve C5a endotel doku üzerine etkili aktive kompleman komponentleridir. Bunlardan özellikle C5a, lizozomal enzimlerin ve toksik oksijen radikallerinin salınmasına ve damar duvarının hasara uğramasına sebep olmaktadır. C5a'ya cevap olarak damar boyunca polimorf nüveli lökositlerin migrasyonu ve vasküler permeabilite artışına bağlı olarak damar dışına sızıntı da gerçekleşir. Böylelikle vasküler mikrotrombüs oluşması kolaylaşmaktadır (17,22).

### **2.3.8. Koagülasyon Faktörleri**

Vücudumuzda yaklaşık 1000 m<sup>2</sup>'lik yüzeye sahip olan endotel çok dinamik bir organ olup, kan ile doku arasında bir yüzey meydana getirmektedir. Normal şartlarda endotel tromborezistandır. Antikoagülan özelliği, endotel hücre yüzey proteinleri ve salınan antikoagülan moleküllere bağlı olarak gerçekleşir. Günümüzde kabul gören endotel hücrelerinin doku ile kanı birbirinden ayırması yanında, damar tonusu, koagülasyon ve inflamasyon cevabının regülasyonunda da önemli bir görev aldığıdır (23).

Sepsiste inflamasyon, koagülasyon ve fibrinoliz arasındaki ilişkinin anlaşılmasıyla birlikte hemostatik dengenin bozulması ve yaygın damar içi koagülopatinin organ disfonksiyonu ve yetersizliklerinde rol almasının bulunmasıyla, hem sepsis patofizyolojisi hem de tedavisinde yeni bakış açıları ortaya çıkmıştır (24).

Sepsiste koagülopatinin oluşması mikroorganizma ve toksinlerinin direkt etkisiyle, ya da TNF- $\alpha$ , IL-1 gibi sitokinlerin indirekt olarak endoteli hasarlamasıyla başlamaktadır. Bu hasarla subendotelyal doku etkilenir ve kollajenaz salgınır. Sepsiste doku faktörüne bağlı olarak faktör VII 'nin aktive olmasıyla ekstrensek koagülasyon başlar (24,25). Endotoksin, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve diğer endojen mediyatörler koagülasyon sisteminin aktivasyonuna neden olur. Hageman faktörü (Faktör XII)'nün aktivasyonu sonucu plazminojen plazmine dönüşür ve intrinsek koagülasyon tetiklenir. Sonuçta tüketim koagülopatisi (DIC-dissemine intravasküler coagülopati) gelişebilir ve spontan kanamalara sebep olabilir.

Normal şartlarda aşırı koagülasyon, antitrombin (AT III), trombomodülin, Protein C, Protein S ve doku faktör yolu inhibitörü (TFPI) gibi bazı tabii antikoagülanlarla önlenmektedir. Sepsiste endotel hasarından dolayı trombin oluşması yanında trombomodülin ve endotel protein C reseptörü (EPCR) fonksiyonu bozulur ve bundan antikoagülan sistem de etkilenir. Böylece koagülasyonun aktive olurken fibrinoliz de inhibe olur. Sepsiste tüketim artışı ve yapımdaki azalma nedeniyle Protein C ve AT III seviyesi düşüş gösterir. Böylece prokoagülan ve antikoagülan denge bozulur, prokoagülan aktivite ön plana çıkar (24,25).

Fibrinolitik aktivitede artış olup, koagülasyon sisteminin aktivasyonu ile mikrotrombüsler oluşur. Bu mikrotrombüsler, kan akışının azalmasına neden olarak yaşamsal organlarda disfonksiyona neden olur. Şok ile birlikte kontrol edilemeyen koagülasyon aktivasyonu, tromboz, trombosit ve koagülasyon faktörlerinin (Faktör II, V, VII) tüketimi ile sonuçlanan DIC tablosu meydana gelebilir. Bu tablo kendini cilt ve mukoza kanamaları ile göstermektedir. DIC, sepsisli hastalarda prognozun kötü olduğunun isaretidir. Sepsisli hastalarda mortalite DIC gelişenlerde %77 iken, gelişmeyenlerde %32 olarak ifade edilmektedir (3,24).

### 2.3.9. Apoptozis

Sepsiste organ disfonksiyonları ve ölümden, hücre hipoksisi ve apoptoz (programlı hücre ölümü) sorumlu görülmektedir. İntestinal epitel hücreleri gibi hızlı proliferen olan hücre popülasyonlarını selektif olarak sınırlayan fizyolojik bir mekanizma olan apoptoz sepsiste hızlanmaktadır. Endotoksin, sitokinler ve reaktif oksijen türleri gibi çeşitli inflamatuvar medyatörler ile temas eden parankimal ve endotelial hücreler stres gen ekspresyonu yaparak, hızlandırılmış apoptoz ile yok edilmeye başlar (3,24).

### 2.4. ETYOLOJİ

Sepsise neden olan mikroorganizmaların sıklığı, sepsisin hastane içi ya da hastane dışında gelişmiş olmasına göre değişiklik gösterir.

Toplumda kazanılmış sepsis olgularında en sık rastlanan etken mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*'tur. Hastane kaynaklı sepsise neden olan mikroorganizmalar ise yıllara göre bazı değişiklikler göstermiştir. Antibiyotiklerin kullanım alanına girmesinden önceki 1950'li yıllarda Gram-pozitif bakteriler ön sırada olup sıklıkla *S. aureus* ve *Streptococcus pyogenes* etken olarak saptanıyordu. Ancak antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile Gram-negatif bakteriler gittikçe artan oranda sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır (3,25).

Son 10 yılda Gram-pozitif bakterilerin sepsis etkeni olarak izole edilme oranları artmaktadır. Özellikle stafilokok kaynaklı sepsislerin görülme sıklığındaki artış dikkati çekmektedir (12,26).

Farklı çalışmalarda, sepsislerin %20-64'ünde Gram-negatif bakterilerin etken olduğu, %27-74'ünde Gram-pozitif bakterilerin etken olduğu, %15 ve daha az oranda ise polimikrobiyal etken izole edildiği görülmüştür (25).

Gram-negatif bakteriyel sepsislerde en sık etkenler, sıklık sırasına göre; *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.* ve *Klebsiella spp.* ile diğer nadir Gram-negatif bakterilerdir. Gram-pozitif bakteriyel sepsislerde ise; koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *S. aureus* ve enterokok türleri en sık etken olarak izole edilmektedir (3).

Sepsis olgularında en sık izole edilen anaerob etken *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium* türleridir. Diğer anaeroplara daha az sıklıkla rastlanır (3).

Mantarlardan *Candida* türleri, sepsis oluşturan etkenler arasında bakterilerden sonra izole edilen mikroorganizmalardır. Hastanede yatış süresi uzamış, geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, yoğun bakımda tutulan, nötropeni, diyabet gibi ek faktörlerin bulunduğu olgularda daha sık görülmektedir. Etkenler başta *C.albicans* olmak üzere, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. kefir* olarak sıralanabilir. *Candida* dışında *Trichosporon* türleri de sepsis etkeni olarak izole edilmektedir. Küf mantarlarından başta *Aspergillus* türleri olmak üzere, *Zygomycetes* ve *Fusarium* türleri sepsis etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (27).

## **2.5. HASTANE KAYNAKLI BAKTERİYEMİ**

Hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra ortaya çıkan bakteriyemilerdir. Hastane kaynaklı bakteriyemi, hastane enfeksiyonları arasında mortalitesi en yüksek olan ve invaziv girişimlere paralel olarak sıklığında artış saptanan enfeksiyon türleridir. Her yıl ABD'de 250.000 insanın yaşamıyla sonlanan önemli mortalite nedenidir. Nozokomiyal bakteriyemiler çoğunlukla kateter kullanımı ile ilişkilidir. Üriner kateter kullanımı da sorumlu tutulur.

Hastane kaynaklı bakteriyemiler primer ya da sekonder gelişebilir (28).

### **2.5.1. Primer bakteriyemi**

Pozitif kan kültürü elde edildiği zaman, hastada aynı bakterinin üretildiği başka bir anatomik odağın bulunmaması durumu primer bakteriyemi olarak tanımlanır. Bu hastalar klinik olarak bakteriyemi bulgularını taşıyan ve kültür sonuçları kontaminasyon olasılığı dışında bulunan hastaları kapsar. Ateş (>38°C), titreme ve hipotansiyon gibi bulgulardan en az biri bulunmalıdır. Bakteri kan kültüründen izole edilmiş olmalı ve bu patojen vücudun bir başka bölgesinde enfeksiyon etkeni olarak sorumlu tutulmamalıdır. İzole edilen bakterilerin deriden kontamine olan bakteriler de olabileceği göz ardı edilmemelidir. Deride kolonize olabilen birçok bakteri kültürde kontaminasyon ya da gerçek etken olarak karşımıza çıkabilir. Deri ve çevreden en sık bulaşabilen mikroorganizmalar; koagülaz negatif stafilokoklar, difteroidler, *Bacillus spp.*, *Propionibacterium spp.*, ve *Micrococcus* türleridir (29)

### **2.5.2. Sekonder bakteriyemi**

Vücutun herhangi bir anatomik yerindeki enfeksiyon odağından kaynaklanan bakteriyemilerdir. Laboratuvar olarak, enfeksiyon odağından alınan kültürde ve kan kültürlerinde aynı bakterinin izole edilmesi ile tanı konur. Damar içi kateter yerinde pürülan tromboflebit olması ya da kızarıklık, hassasiyet, pürülan akıntı ile karakterize lokal kateter enfeksiyonları sonucunda gelişen bakteriyemiler sekonder bakteriyemi olarak değerlendirilmektedir. YBÜ hastalarında yaygın olup, mortalite ve morbidite ile yakından ilişkilidir (29).

### **2.6. KLİNİK BELİRTİ VE BULGULAR**

Sepsis evresine göre klinik belirti ve bulgular değişmektedir. Ateş veya hipotermi, üşüme ve titreme, taşikardi, hiperventilasyon, deri lezyonları, şuur değişikliği görülebilmektedir.

Bu belirti ve bulguları olan hastaların kan kültürü ve varsa enfeksiyon odağından kültür örnekleri alınmalı, uygun tedavi başlanmalıdır. Sepsisli hastaların büyük çoğunluğunda ateş ile beraber titreme de gözlenmektedir. Hipotermi sepsiste kötü prognozun işaretidir. Sepsise bağlı hipotermi, bebeklerde, ileri yaşlarda, üremi veya alkolizm gibi altta yatan kronik hastalığı olan hastalarda görülmektedir. Nötropenik ve immün yetmezlikli hastalar sistemik enfeksiyona yatkındırlar. Bu hastalarda ateş görülmeden sepsis gelişebilmektedir. Hipotansiyon, oligüri, trombositopeni ve kanamanın gözlenmesi sepsisin komplikasyonları olarak karşımıza çıkar, bu hastaların sepsis yönünden değerlendirilmesi gerekmektedir (30-32).

Hiperventilasyon, sepsisin en erken belirtisi olabilmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda hiperventilasyon ve respiratuvar alkaloz gözlenmesi, ilk planda sepsisi düşündürmelidir (32). Merkezi sinir sistemi tutulumu olmaksızın mental değişikliklerin olması sepsiste önemli bir bulgudur. Oryantasyon bozukluğu, konfüzyon, laterji, ajitasyon ve şuurda küntlük şeklinde klinik tablo ortaya çıkabilir (32,33).

#### **2.6.1. Sepsiste Organ Yetmezliği**

Sepsiste olayı başlatan neden mikroorganizmalar veya toksinleri olsalar da, organizmanın aşırı yanıtı, yaygın inflamasyon, çoğul organ disfonksiyonu ve organ yetersizlikleri ile klinik tablo oluşur. Sepsiste birçok organda patolojik değişiklikler

görülebilmektedir. En fazla organ hasarı akciğerler, karaciğer, böbrekler, kalp ve bağırsaklarda görülür. Bu değişiklikler, bakteriyel invazyon, bakteriyel toksinler ve enzimlerin direkt etkisi, medyatörler aracılığı ile oluşan etki, perfüzyon bozukluğu ve DIC sonucu gelişen patolojik değişikliklerdir.

Histopatolojik değişiklikler; konjesyon, ödem, fibrin trombüsleri, hemoraji ve nekroza kadar giden lezyonlarla karakterizedir. Otopsi çalışmalarında akciğerlerden sonra en sık gastrointestinal sistemde lezyon varlığı gösterilmiştir. Karaciğer biyopsilerinde intrahepatik kolestaz ve minimal hepatosellüler nekroz gösterilmiştir. Böbrekteki hasara bağlı azotemi, akut tübüler nekroz, böbrek yetmezliği gelişebilir (34).

## **2.7. SEPSİS TANISI**

Sepsis tanısı koyduran spesifik bir test yoktur. Hastalardan dikkatli anamnez alınması ve klinik belirtilerin iyi değerlendirilmesi ile tanı konulur. Öncelikli olarak hastada sepsise predispozan faktörler değerlendirilmelidir. Hastaya uygulanmış cerrahi müdahaleler, transplantasyon, immüno-supresif tedavi, kemoterapi alımı gibi durumlar ve seyahat öyküsü araştırılmalıdır. İmmüno-suprese, nötropenik hastalarda inflamatuvar cevap yetersizdir.

Endurasyon, flüktüasyon, lokal ısı artışı, reaktif lenfadenopati ve eksudasyon gibi bulgular gözlenmeyebilir. Bu nedenle bu hastalarda primer enfeksiyon odağının belirlenmesi ve sepsis tanısı oldukça zordur (30-32). Fizik muayene dikkatli yapılmalı, semptom ve bulgular çok iyi değerlendirilmelidir. Tanı laboratuvar bulgular ile desteklenmelidir.

Sepsis tanısı iki başlık altında incelenmektedir:

### **2.7.1. Ayırıcı tanıda kullanılan testler**

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) oluşturan hastalıklar ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Akut pankreatit, multiple travmalar, yanık, vaskülitler, pulmoner emboli, miyokard enfarktüsü, diabetik ketoasidoz, akut adrenal yetmezlik, masif aspirasyon ve atelektazi, malign hipertermi, tümör lizis sendromu, subaraknoid kanama ve akut DIC nedenleri sepsis ile karışabilecek tabloların başlıcalarıdır (3,31). Hematolojik olarak saptanan bulgular genellikle lökositoz ve sola kayma olarak görülür. Lökosit sayısı çoğu zaman  $12000/\text{mm}^3$  üstünde seyretmekle birlikte bazen lökomoid reaksiyon görülebilir ve lökosit sayısı  $50-100 \text{ bin}/19 \text{ mm}^3$  kadar ulaşabilir.

Bunun yanında lökosit sayısının  $4000/\text{mm}^3$  altına indiği lökopeni de görülebilir. Özellikle yenidoğanlarda, yaşlılarda ve diğer kemik iliği rezervi yetersiz olan hastalarda lökopeni görülür.

Sepsiste eritrosit yapımı ve serum demiri azalır. Sepsis tablosu uzun sürmezse anemiye sebep olmaz. DIC gelisen hastalarda, tanı koyduracak spesifik bir test yoktur. Bu yüzden tanıda birden çok testten yararlanılır. Trombosit sayısında hızlı düşüş, protrombin zamanı ve aktive parsiyel tromboplastin zamanında uzama, fibrin yıkım ürünlerinde artış, koagülasyon inhibitörlerinin ( antitrombin III ve protein C ) azalması DIC tanısı koydurur (3,33,34)

Kan gazı takibi sepsiste önemli olup, erken dönemde respiratuvar alkaloz hakimken genellikle sonrasında metabolik asidoz gelişir. Kan üre azotu ve kreatinin seviyesinin artışı sık rastlanan bir durumdur. Sepsiste azotemi ve oligüri genellikle akut tübüler nekroz nedeniyle gelişir. Sepsisli hastalarda karaciğer fonksiyon testleri de bozulur. Ancak hepatobiliyer sistem tutulumu olmadan da bu durum gerçekleşebilir. Özellikle direkt bilirübin artışı ile beraber hiperbilirubinemi, alkalen fosfataz ve transaminaz seviyelerinde orta derecede artış gözlenir (36,37).

SIRS'ın enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz nedenlerini ayırt edebilmek için çeşitli laboratuvar testleri gündeme gelmiştir. Prokalsitonin (PCT), C-reaktif protein (CRP), TNF- $\alpha$ , soluble tümör nekrozis faktör reseptörleri, IL-1, IL-1 reseptör antagonisti, IL-6, IL-8, E-selektin, soluble interselüler adezyon molekülü 1, protein C, lökosit elastaz, granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF), kompleman 3a, eritropoetin, serum amiloid protein, neopterin, plazma nitrit/nitrat konsantrasyonu bunların başlıcalarıdır (3).

Bunlar içerisinde SIRS'ın enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz nedenlerinin ayırımında PCT ve CRP daha yararlı bulunmuştur (38,39).

CRP, başlıca karaciğerde sentezlenen, IL-6, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  uyarısıyla salgılanan, özellikle bakteri eradikasyonunda çok önemli işlev gören bir akut faz proteindir. Uyarı sonrası ortalama dört-altı saat sonra salgılanmaya başlamakta ve 36-50 saatte en üst düzeye ulaşmaktadır. Sepsis tanısında CRP sınır değeri olarak 50-100 mg/L üzeri kullanılmış fakat kesin bir sınır değer tanımlanmamıştır. Sepsis tanısında duyarlılık %68-98.5 arasında, özgüllük %40-78 arasında bulunmuştur. Tek bir ölçümle sepsis tanısı konulmasının güvenilir bir parametre olmadığı ve sepsis prognozu konusunda da yeterli bilgi vermediği sonucuna varılmıştır. Geç dönemde artması nedeniyle sepsis



gibi çok dinamik bir süreçte faydalı olmayacağı, sepsis dışı bir çok nedende yükselebilmesi (travma, yanık, cerrahi) nedeniyle özellikle YBÜ hastalarında sepsis tanı testi olarak kullanılamayacağı sonucuna ulaşılmıştır (40).

Prokalsitonin (PKT), normalde tiroid C hücrelerinden salgılanan kalsitoninin propeptididir. Normalde plazmada 5-50 pg/ml gibi çok düşük miktarlarda bulunur. Bakteriyel lipopolisakkarid uyarısı ile mononükleer hücrelerden ve TNF- $\alpha$ , IL-6 uyarısı ile karaciğer hücrelerinden sentezlendiği sanılmaktadır. Uyarıdan üç-dört saat sonra artış başlar ve pik değere yaklaşık altı saatte ulaşır. Yarılanma ömrü, 25-30 saattir. Böbrek yetmezliğinde bu süre %30 kadar uzamaktadır. Viral enfeksiyonlar, inflamatuvar olaylar ve lokalize bakteriyel enfeksiyonlar hafif artışa yol açarken sistemik bakteriyel enfeksiyonda artmaktadır. Sepsis için tanı koydurucu sınır değer tam olarak oluşturulamamıştır. Hasta grupları ve sınır değer farklılıklarından dolayı yapılan çalışmalarda sepsis tanısında PKT duyarlılığı %65-97, özgüllüğü %48-94 arasında bulunmuştur (40). Yoğun bakımda, yenidoğan sepsisinde başarılı olduğu düşünülmektedir (41).

Birçok çalışmada CRP ve PKT kıyaslandığında sepsisin ağırlığı ve prognozunu göstermek açısından PKT daha başarılı bir parametre olarak tanımlanmıştır. Simon ve arkadaşları yaptıkları metaanaliz sonucunda, hastaneye yatırılan hastalarda bakteriyel enfeksiyonların tanısında PKT seviyesi ölçümünü CRP ölçümüne kıyasla daha başarılı bulmuşlardır (42).

## **2.7.2. Sepsis Etkenini Tanımlayıcı Testler**

### **2.7.2.1. Kan kültürü**

Sepsisin etiyolojik tanısı primer enfeksiyon odağından yapılan kültür ve kan kültürleri ile konur. Hastalarda belirlenebilen bir enfeksiyon odağı varsa, oradan alınan materyalden yapılan preparatta veya kandan hazırlanan “buffy coat” preparatında, Gram boyama ile etken gösterilebilir. Sepsis tanısı için altın standart etkenin kan kültüründe üretilmesidir (3).

Kan kültürü alırken; doğru yerden, doğru zamanda, doğru teknikle, yeterli miktarda örnek alınmalı, laboratuvara doğru koşullarda ulaştırılmalıdır. Hastalarda ateş piki tahmin edilemediğinden semptomlar başlar başlamaz (ateş, üşüme vb) kan kültürleri alınabilir. Ateş yokluğunda; lokal enfeksiyonu olan hastalardan (pnömoni, menenjit,

osteomyelit gibi), böbrek yetmezliği ve açıklanamayan lökositozu olan hastalardan, immün sistemi bozulmuş veya yoğun bakım altındaki hastada açıklanamayan pulmoner, renal veya hepatik fonksiyon bozukluğu, açıklanamayan hemodinamik bozuklukları olan hastalardan kan kültürü alınabilir (43).

Kan kültürleri, aseptik koşullarda ve antibiyotik verilmeden önce, değişik venlerden en az üç set alınmalı, aerop ve anaerop koşullarda inkübe edilmelidir (1). Optimal sonuç için iki kan kültür seti arasındaki sürenin 30-60 dakika olması tavsiye edilmektedir. Kan kültürü örneği alınırken, kontaminasyon nedeniyle oluşabilecek yanlış pozitiflikleri önlemek için cilt antiseptisine dikkat edilmesi gerekmektedir. Cilt florasında yer alan KNS gibi mikroorganizmalar kateter ile ilişkili bakteriyeminin de etkeni olabileceğinden; özellikle vasküler kateteri olan hastalarda izole edildiğinde bunların etken veya kontaminasyon olduğuna karar vermek zor olabilmektedir (44). Kontaminasyon, etkeni yanlış tanımlamaya yol açabileceği gibi, yanlış bakteriyemi tanısına ve buna bağlı gereksiz antibiyotik kullanımına, yatış süresinde uzamaya ve ciddi maliyet artışına neden olmaktadır (45).

Her ne kadar günümüzde gelişmiş kan kültürü sistemleri antibiyotiklerin etkilerini azaltacak şekilde düzenlenmişse de, kan örneği almadan önce antibiyotik kullanılması yanlış negatif sonuçların alınmasına neden olabilmektedir. Serody ve ark. (46) yaptıkları çalışmada, kemik iliği transplantasyonu sonrası febril nötropeni gelişen hastalarda, ateş başlangıcında kan kültürü pozitifliğini %11, parenteral antibiyotik başlanmasından sonra ise %4.6 olarak bulmuşlardır.

Kan kültürü sistemleri ile tüm sepsis olgularında etken mikroorganizmalar üretilmemektedir. Hastaların yaşına, immün durumuna, yattığı bölüme göre sepsis şüpheli hastalarda kan kültürünün duyarlılığı ile ilgili çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Son yıllarda, sepsis şüpheli değişik hasta gruplarında yapılmış olan çalışmalarda kan kültürü pozitifliğinin %50'yi pek aşamadığı görülmektedir (47, 48).

Üremeyi etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi de alınan kan miktarıdır. Kanın içerisinde bazı inhibitör maddeler vardır bu yüzden besiyeri kan oranı önemlidir. Erişkinlerde her bir kan kültürü şişesi için 8-10 ml örnek alınması gerekir. Pediatrik yaş grubunda ise, erişkinlere göre daha düşük miktarda kan alındığından, düşük bakteri yükü nedeni ile kan kültürünün duyarlılığının daha da azaldığı bildirilmiştir (49).

Modern kan kültürü sistemleri ile kültür şişesinde üremenin olduğunu işaret eden pozitif sinyal, ekim sonrası ortalama birkaç gün sonra alınabilmektedir. Üreme olmadığını anlamak için ise en az 5 gün beklenmesi gerekmektedir (50).

Etken olan mikroorganizmalar, olguların %90'ında kan kültürü sistemlerinde ilk 48 saat içinde pozitif üreme sinyali alınmasına neden olmaktadır. Ancak pozitif sinyal sonrası üretilen mikroorganizmanın identifikasyonu ve antibiyogramı için ek olarak birkaç gün daha gerekmektedir. Bu nedenle mevcut kan kültürü sistemleri, prognostik önemi olan erken tedavi yönetiminin de yapılabilmesine yeterince olanak sağlamamaktadır (50).

### **Kan kültürü için kullanılan yöntemler**

**Manuel yöntemlerde:** Laboratuvarda hazırlanmış ya da ticari olarak satılan ağzı kapalı, içerisinde tripticase soy, brain-heart infüzyon ve columbia besiyerleri gibi olası etkenlere en kısa sürede ulaşmak amacıyla kullanacak zengin vasatlar içeren şişeler kullanılır. Bazı şişeler hem sıvı hem de katı kısımları içerir (bifazik). Günlük izlemlerle bulanıklık oluşumu, kanın hemolizi, sıvı ya da katı besiyerinde üremelerin gözlenmesi gibi üreme izlemi yapılır. Ayrıca kör pasajlar ile üreme takibi yapılabilir. İş yoğunluğunun yüksek olduğu laboratuvarlarda tek şişelerin sürekli izlemleri ve pasajları sorun olmaktadır (43).

**Otomatize sistemler:** Bilgisayar desteği ile farklı üreme indikatörlerinde meydana gelen değişimlerin izlenmesi esasına dayanır. İnkübatör ve sürekli çalkalama prensibi ile şişeler sürekli takip edilir. Şişe içerisindeki O<sub>2</sub> miktarının azalması veya CO<sub>2</sub> miktarının artmasıyla değişen kolorometrik veya florometrik ölçümler sağlanır. Bu sistemlerde sürekli izleme nedeniyle kan kültürlerindeki pozitifliğin daha erken dönemde saptanmaktadır.

Belirli grup mikroorganizmalar için özel şişeler mevcuttur. Anaeroblar, mantarlar, tuberküloz gibi. Ayrıca pediatrik ve erişkin şişeleri vardır. Bazı şişeler antibiyotiklerin absorpsiyonu sağlayan maddeler içermektedir. Yaygın olarak kullanılan üç çeşit otomatize kan kültürü sistemi vardır. Bunlar, BacT/Alert, BACTEC ve ESP olup, her üçü de ülkemizde pazarlanmaktadır. Bu sistemlerde üreme tespit edildiği noktada cihaz alarm ile uyarır. Şişelerden laboratuvarın çalışma prensipleri doğrultusunda boyama ve pasajlar yapılır. Bakterilerin tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılık testleri

tamamlanır. Otomatize sistemlerin bakterileri üretmekte daha başarılı olduğu ve daha hızlı izolasyon sağladığı belirtilmektedir (43).

### **2.7.2.2. Moleküler yöntemler**

Günümüzde hızlı tanımlama ve iş yükünün azaltılması amacıyla direk olarak kandan bakteriyel etkenlerin tanımlanması ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. PCR teknikleri kullanılarak etkenin aynı gün içerisinde tespit edilmesi, majör direnç paternlerinin moleküler olarak saptanması oldukça heyecan verici gözükmemtedir (51).

PCR, DNA içerisinde yer alan ve dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak (amplifikasyon) için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Yöntem basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit "in vitro klonlama" olarak da tanımlanan PCR; 94-98°C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37-65°C aralığında gerçekleştirilen bağlanma (annealing) ve 72°C'de gerçekleştirilen uzama (elongasyon) aşamalarından oluşur. Bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması ile çok sayıda hedef DNA elde edilir.

Multipleks PCR'da çoklu primer setleri kullanılarak aynı anda birden fazla hedef DNA'nın çoğaltılabilmesine imkan sağlanmış olur. Multipleks PCR daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirebildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir. Ancak önemli derecede optimizasyon gerektirir. Bu nedenle çalışma prosedürünün standardizasyonu için çok sayıda deneme yapılması gerekmektedir.

Çoğaltılan PCR ürünlerinin görüntülenmesi klasik olarak jel elektroforezi ile yapılmaktadır. Jel elektroforezi nispeten yavaş bir yöntem olduğundan daha hızlı ve kantitatif ölçümler yapabilen eş zamanlı PCR (real time PCR) yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Real time PCR'da temel olarak floresan madde ile işaretli problemler kullanılmaktadır. DNA amplifikasyonu oluştuğunda, reaksiyonda kullanılan floresan işaretli problemlerden ışınlar yayılır. Yayılan bu ışınlar da özel dedektörler vasıtasıyla değerlendirilir (51).

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted desorption ionization-time of flight mass spectrometry), molekül tanımlamasını, bakterinin içinde bulunduğu kristalize bir matriksin lazer ile ışınlanması sonrası vakumlu bir tüp içinden geçen iyonların uçuş zamanına göre yapar. Proteomik teknoloji kullanılarak dakikalar içerisinde bakteri ve

mantarlar proteomik profillerine göre tanımlanmaktadır. Bu yöntem ilk olarak bakteri tanımlaması yapmak üzere mikrobiyolojide kullanım alanı bulmuştur. Yeni olarak bakterilerde antimikrobiyal direncini saptamak üzere de mikrobiyolojide kullanımına dair umut verici çalışmalar vardır. MALDI-TOF MS ile direnç saptama en yaygın olarak, dirençli ve duyarlı izolatlar arasındaki spektra farkı ortaya konarak yapılmaktadır (52).

Pozitif kan kültür şişelerinden hızlı mikroorganizma tanısı için kullanılan, amplifikasyonun olmadığı, nükleik asit temelli bir yöntem floresan in situ hibridizasyondur (FISH). Sentetik oligomer yapıdaki peptid nükleik asit probolar (PNA) floresanla işaretlidir; bakteri ve mantarların DNA ve RNA yapılarına bağlanır (53).

DNA mikroarray'i cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır. Bir mikroarray'de bu spotlardan onbinlerce bulunabilir. Yüzeye tutturulan bu DNA parçaları (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) prob olarak tanımlanmıştır. Mikroarray teknolojisi, DNA'nın bir substrata bağlanıp bilinen bir gen ya da fragment ile prob hazırlanması şeklinde tanımlanabilecek 'Southern Blotting' tekniğinden türetilmiştir. Bu yeni teknikte membran yerine camın kullanılması, radyoaktivitenin yerini floresan işaretlerin alması ve bağlanmayı sağlayacak yöntemlerin hassaslaşmasıyla çalışmaların verimi ve elde edilen bilgilerin miktarı artmıştır. Komplementer oligonükleotidler kullanarak çok sayıda hedef nükleik asit dizisini aynı anda saptama potansiyelinden dolayı Mikroarray teknolojisi, antimikrobiyal direncinin tanısında da umut verici bir yöntemdir. Sepsiste etiyolojik tanıya olanak sağlayan mikroarray yöntemi ticari olarak da elde edilebilir hale gelmiştir. Bu amaçla kullanılan ve üzerinde araştırmalar yapılan bir ürünün özellikleri aşağıda açıklanmıştır.

#### **Verigene® Blood Culture assay (Nanosphere Inc. Northbrook, IL, USA)**

**Verigene® Kan Kültürü Nükleik Asit Testi:** Kan dolaşımı enfeksiyonuna sebep olabilecek potansiyel patojenik bakterilerin eş zamanlı saptanması ve tanımlanması için kalitatif, multipleks, in vitro diagnostik bir testtir.

Sepsis şüphesi nedeni ile alınan kan kültürlerinde, üreme varlığını gösteren pozitif sinyal alındıktan sonra sinyale neden olan mikroorganizmanın konvansiyonel yöntemlerden daha hızlı bir şekilde identifikasyonuna olanak sağlar.

Verigene mikroarray yöntemi ile seçilmiş mikroorganizmalarda daha kısa sürede, daha duyarlı sonuçların elde edilebileceği gösterilmiştir (54).

Sistem aşağıda belirtilen iki modülden oluşur: Verigene Processor SP ve Verigene Reader. Verigene Processor SP, numune analizini otomatikleştirir: (i) Numune Hazırlama – pozitif kan kültürü numunelerinden hücre lizisi ve manyetik boncuk tabanlı nükleik asit ekstraksiyonu ve (ii) Hibridizasyon – bir mikroarray formatındaki ve aracı hedefe özel yakalama DNA'sının bakteriyel DNA hibridizasyonu ve yakalanmış bakteriyel nükleik asitlere altın nanopartiküllü prob hibridizasyonu. Yakalama sahalarında bağlı altın nanopartikül problemlerinin gümüş güçlendirmesi Verigene Reader tarafından yüksek etkilikle optik olarak değerlendirilen altın-gümüş agregatlar ile sonuçlanmaktadır.

## 2.8. PROGNOZ

Fonksiyon bozukluğu gelişen organ sistem sayısı arttıkça ve sepsis evresi ilerledikçe mortalite oranı da artmaktadır. Yapılan çalışmalarda sepsis evreleri ile ilgili mortalite oranı SIRS'te %6-27, sepsiste %10-36, ağır sepsiste %18-52, septik şokta %46-82 arasında bulunmuştur (3).

Etkene bağlı olarak, en yüksek mortalite *P. aeruginosa* sepsislerinde bildirilmektedir. Gram-negatif bakteriyel sepsislerde ölüm oranı %45-50, Gram-pozitif bakteriyel sepsislerde %20-30, anaerob sepsislerde ise %15-30 oranında bulunmuştur (3).

Prognozu etken mikroorganizma kadar konağın durumu da belirlemektedir. Sepsis prognozunu altta yatan hastalık (nötropeni, hipogammaglobulinemi, diabet, alkolizm, böbrek yetmezliği, solunum yetersizliği), tedavi başladığında enfeksiyona bağlı komplikasyonların gelişmiş olması (şok, anüri gibi), bakteriyeminin şiddeti (polimikrobiyal bakteriyemi), enfeksiyon kaynağı, enfeksiyonun geliştiği yer (nozokomiyal), hastanın yattığı servis (yoğun bakım ünitesi), antibiyotik tedavisinin uygunluğu, tedavinin başlanmasına kadar geçen zaman, ileri yaş gibi birçok faktör etkileyebilmektedir (3,32).

## **2.9. TEDAVİ**

Tedavinin başarısı doğru ve erken klinik tanı, etkenin saptanması, destekleyici ve etkene yönelik uygun tedavinin erken başlanması, altta yatan hastalığın ortadan kaldırılması veya düzeltilmesine bağlıdır. Sepsis tedavisi beş başlıkta incelenebilir (1).

1. Destek tedavisi
  - a. Solunum desteği
  - b. Hemodinamik destek ve şok tedavisi
  - c. DIC tedavisi
2. Antimikrobiyal tedavi
3. Enfeksiyon odağının kaldırılması
4. Altta yatan hastalığın tedavis
5. Diğer tedavi girişimleri

### **2.9.1. Destek tedavisi**

Sepsiste destek tedavisi antimikrobiyal tedavi kadar önemlidir. Hasta tecrübeli personel tarafından yoğun bakım şartlarında takip edilmelidir. Hemodinamik dengelerin sağlanması, replasman tedavileri uygulanması ve monitörizasyonla takip tedavinin ana prensibidir Hastalarda mutlaka hava yolu açık tutulmalı, idrar takibi için üriner kateter ve parenteral tedavi için de damar içi kateter yerleştirilmelidir. Septik şoktaki hastalarda hemodinamik değişiklikleri takip etmek amacıyla arteriyel kateter, santral venöz kateter gibi invaziv işlemler uygulanabilir (3).

### **2.9.2. Antimikrobiyal tedavi**

Sepsis tedavisinin esasını antimikrobiyal tedavi oluşturur. İdeal olanı kültür ve antibiyogram sonuçlarına göre tedaviye başlamaktır. Ancak bu durum genellikle sepsis için geçerli olamamaktadır. Daha önce belirtildiği gibi kan kültürünün duyarlılığının düşük olması nedeniyle sepsis şüpheli hastaların çoğunda etken izole edilememektedir. Etken izole edilebilse bile sonuçlar en erken 48 saatte gelebileceğinden, geçen her bir saatin prognoz açısından son derece önemli olduğu sepsiste başlangıç tedavisi ampirik olarak yapılmaktadır (3).

Ampirik tedavide uygun antibiyotiklerin kullanımı çok önemlidir. Antibiyotik seçerken primer enfeksiyon odağı, epidemiyolojik faktörler, altta yatan hastalıklar, enfeksiyonun hastane veya toplum kökenli olması, sık izole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılığı gibi durumlar göz önünde bulundurulmalıdır. Seçilen antibiyotik bakterisit etkili olmalıdır ve damar yolundan verilmelidir. Başlangıç ampirik tedavisinin iki uygun antibiyotiğin kombinasyonu şeklinde olması gerektiği konusunda fikir birliği vardır. Bu antibiyotik kombinasyonundaki amaç hem Gram-negatif, hem Gram-pozitif bakteri enfeksiyonlarını içine alacak geniş spektrum elde etmek, polimikrobiyal enfeksiyonlara etkili olmak, direnç gelişimini önlemek ve sinerjistik etki elde etmektir (3).

Günümüzde kullanılan kan kültür sistemlerinde etiyolojik bilgileri verse bile, bu sonuçların geç elde edilmesi nedeniyle ampirik tedavi yetersizliğini ve bunun sonucunda gelişen olumsuz prognozu düzeltmek için geç kalınabilmektedir. Yetersiz antimikrobiyal tedavi artmış mortalite oranına sebep olmaktadır (55).

Kan kültüründe sonuçların geç elde edilmesinin bir diğer olumsuz sonucu ise hastaların potansiyel tehlikeleri olan antimikrobiyal tedaviyi uzun süre kullanmak zorunda kalmalarıdır. Uzun süreli antibiyotik kullanımının hastaya toksik yan etkilerinin yanında diğer bir unutulmaması gereken konu da direnç gelişimi üzerine olan olumsuz etkileridir. Hastanelerde antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması hastane mikroflorasında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Bu sayede mikrofloradaki duyarlı bakteriler ortadan kaldırılırken, dirençli suşlar seleksiyona uğramaktadır. Dirençli suşların artışı ise hastanede kalım süresini, tedavi maliyetlerini ve mortaliteyi artırmaktadır (56).

Yukarıda sayılan sebeplerden dolayı ampirik tedavi sonrası yapılacak tedavi düzenlemesi hasta sağlığı açısından son derece önemlidir.

Bu çalışmada amacımız kan kültürü sistemlerine göre daha hızlı ve duyarlı sonuçlar verdiği bildirilen kan kültürü nükleik asit testinin (Verigene® Nanosphere) tanısal performansını ve tedaviye olası etkilerini değerlendirmektir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU–13–4670 no’lu proje ile desteklendi. Ve bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu’nun izni ( 21 Mayıs 2013 tarih, karar no: 2013–362 ) ile yapıldı.

Bu çalışmaya, Temmuz 2014 - Ocak 2015 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinde servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı tarafından sepsis tanısı konulan hastalar dahil edildi.

1. Hastalardan gelen, tekniğine uygun olarak alınmış kan kültürleri BacT/Alert3D (bioMerieux, Fransa) otomatize kan kültürü sisteminde inkübe edildi. Üreme olduğu saptanan şişelerden uygun besiyerlerine alt kültürler yapıldı ve rutin tanımlama testleri uygulandı.
2. Konvansiyonel yöntemlerle tür düzeyinde belirlenen mikroorganizmalar otomatize sistemle Phoenix<sup>TM</sup> 100 (Becton Dickinson, Diagnostic Instrument System, USA) ile tür düzeyinde tanımlanarak doğrulanmıştır.
3. Üreme olan şişelerden aynı anda mikroarray yöntemi ile çalışılması amacıyla 1ml kan alındı ve saati not edilerek Verigene sisteme (Nanosphere, Inc., Northbrook, IL, USA) yerleştirildi.
4. Verigene sistemden (Nanosphere, Inc., Northbrook, IL, USA) çıkan sonuç saati not edilerek servisine bildirildi.
5. Hastaların demografik özelliklerine hastane otomasyon yönetim sisteminden ulaşıldı.

6. Hastalardaki enfeksiyon odağı, sepsisin şiddeti, kan kültürü ve mikroarray yöntemi ile saptanan mikroorganizmaların etken olup olmadığı, tedavide yapılabilecek olası değişiklikler çalışma ekibinde bulunan Enfeksiyon Hastalıkları uzmanı tarafından değerlendirildi.

### **Kan kültürü tekniği**

**1.Cilt antisepsisi:** Palpasyondan sonra kanın alınacağı ven bölgesi %70'lik alkol içeren pamukla, minimum 30 sn süre ile silindi ve kuruması beklendi. Sonra iodine solüsyonu (%1-2'lik tentürdiyot veya %10'luk povidine iodine) kan alınacak yerin merkezinden periferine doğru daireler çizecek şekilde uygulandı, 1–3 dk kuruması beklendi ve aynı işlem tekrarlandı.

**2.Şişelerin hazırlığı:** Kan kültürü şişelerinin lastik tıpası steril değildir, bu nedenle üzerindeki plastik kapak açılıp, %70'lik alkol veya iodine solüsyonu ile temizlendi. Antiseptik, setlere 1 dk uygulandı.

**3.Kan alma ve şişeye inokülasyon:** Kan alma esnasında veya kan almadan önce, venin palpasyonu gerekebileceği için eldivenin parmak uçlarına da iodine solüsyonu uygulandı veya steril eldiven kullanıldı. Erişkin hastalar için yaklaşık 10 ml, çocuklar için 1-5 ml kan alındı. Ekilen kan miktarının besiyerine oranının 1/10 ile 1/5 arasında olmasına dikkat edildi. Kan alma işlemi bittikten sonra iyot artıklarından irritasyon oluşmaması için hastanın derisi %70 alkol ile temizlendi. Örnekler hızla laboratuvara gönderildi.

### **Kan kültürü sistemi**

Kan kültürü örnekleri BacT-Alert 3D tam otomatik kan kültürü sisteminde inkübe edildi. BacT/Alert 3D mikrobiyal saptama sistemi, bakteriyemi/fungemi olduğundan şüphelenen hastalardan alınan numunelerin üremelerini aerobik ya da anaerobik olarak sürekli izleyen, numuneleri inkübe eden ve çalkalayan tam otomatik, kolorometrik bir sistemdir. Numune cihaza yerleştirildikten sonra, pozitif veya negatif olarak saptanana kadar periyodik olarak, cihazın içinde takip edilir. Üreme olduğunun saptanması durumunda (pozitif bir sonuç) cihaz tarafından sesli alarm verilir. Bir numunede belirtilen süre içerisinde, herhangi bir mikrobiyal üreme görülmez ise negatif olarak bildirilir.

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

### **3.1. KULLANILAN BESİYERLERİ**

#### **3.1.1. Kanlı Agar**

İçeriği (g/ l)

Spesifik Pepton .....	10.0
Liver digest .....	2.5
Yeast extract .....	5
Sodium chloride .....	5
Agar .....	10
pH 7,3±0,2	

Kanlı agar, genel üretim besiyeri olarak kullanıldı.

- Kanlı agar besiyeri, ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı.
- 40 gram toz 1 litre distile su içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlandı.
- Otoklavda ( Nüve, SteamArt, 90 L ) 121°C’de 15 dakika steril edildi.
- Besiyeri sıcaklığı 45–50°C’ ye düştükten sonra %5 steril defibrine insan kanı ilave edildi. Karıştırılarak homojenizasyon sağlandıktan sonra steril plaklara döküldü.
- Kullanılncaya kadar +4°C’de muhafaza edildi.

#### **3.1.2. Eozin Metilen Blue Agar**

İçeriği (g/ l)

Pepton .....	10.0
Laktoz .....	10.0
Dipotassium hidrojen fosfat .....	2.0
Eosin Y .....	0.4

Metilen blue .....0.06

Agar .....15.0

pH 6.8±0,2

Eozin Metilen Blue Agar (EMB), Gram- negatif bakterilerin üremesinin sağlanması ve üreyen bakterilerin laktozu fermente etme özelliğinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

a. EMB, ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı.

b. 37.5 gram toz, 3.75 gram bakteriyolojik agar 1 litre distile su içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlandı.

c. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra 20'şer ml steril plaklara döküldü.

d. Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

### 3.1.3. Mueller-Hinton Agar

İçeriği (g/ l)

Dehidate infusion .....300.0

Casein hidrolisate-asidic .....17.5

Agar .....17.0

Starch .....1.5

Heart extract paste .....5

pH 7,4

Mueller-Hinton Agar (MHA), antibiyotik duyarlılık testleri için kullanıldı.

a. MHA besiyeri, ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı.

b. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.

c. Steril plaklara 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

d. Kullanılincaya kadar + 4°C' de muhafaza edildi.

### 3.1.4. Triple Sugar Iron Agar

İçeriği (g/ l)

Kazein .....	5
Enzymatic digest of animal tissue .....	5
Pepton .....	10
Dextroz .....	1
Laktoz .....	10
Sukroz .....	10
Ferrik amonium sitrat .....	0.2
Sodyum Klorür .....	5
Sodyum Tiosulfat .....	0.3
Fenol Red .....	0.025
Agar .....	13.5

pH:7.3 ±0,2

Triple Sugar Iron (TSI) Agar, bakterilerin glukoz, laktoz ve sükroz şekerlerini fermente etme, gaz ve H<sub>2</sub>S oluşturma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

a. Temel besiyeri tartıldı, distile su içinde benmaride hafif ısıtılarak eritildi.

b. pH: 7.4'e ayarlandı.

c. Tüplere 5 ml miktarlarda dağıtıldı.

d. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.

e. Steril cam tüplere yaklaşık 3'er cm dip ve yatık bölüm oluşacak şekilde döküldü.

f. Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

#### Testin Yapılışı

a. Tek koloniden iğne öze ile tüp tabanına 0.5 mm kalacak şekilde batırma ekimi yapıldı, koloni aynı zamanda yatık yüzeye de ekildi.

b. 37°C'de etüvde 24 saat inkübe edildi.

### 3.1.5. Simmon's Sitrat Agar

İçeriği (g/ l)

Mononamonyum fosfat .....	0.2
Sodyum Klorid .....	5.0
Sodyum sitrat tribasic .....	2.0
Magnesium sulfat .....	0.2
Brom timol mavisi .....	0.08
Agar.....	15
Sodyum amonium fosfat .....	0.8

Simmon's Sitrat Agar, bakterilerin karbon ve enerji kaynağı olarak sitrati kullanma özelliklerini belirlemek amacıyla kullanıldı.

- Ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı.
- pH: 6.9'a ayarlandı. Tüplere 5 ml miktarlarda dağıtıldı; ağzları pamuk tıkaç ile kapatıldı.
- Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.
- Tüpler yatık durumda, yüzeyi eğimli olacak şekilde katılaştırıldı.
- Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

### Testin Yapılışı

- Tek koloniden iğne öze ile besiyeri yüzeyine ekim yapıldı.
- 37 °C'de etüvde 24 saat inkübe edildi.

### 3.1.6. MIL (Motility-indol-lysine) Besiyeri

İçeriği (g/ l)

Peptic digest of animal tissue .....	10.0
Casein enzymatic hidrolisate .....	10.0
Dextroz .....	1.0
Yeast extract .....	3.0

L-lisine hidroclorid .....	10.0
Ferric amonium sitrat .....	0.5
Brom cresol purple .....	0.02
Agar .....	2.0
Ph:6.5±0.2	

MİL besiyeri, bakterilerin hareket karakteri, triptofandan indol ve indol asetik asit oluşturma ve lizin dekarboksilasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

- Ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı.
- 36.5 gram toz 1 litre distile su içerisinde 5-10 dakika çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlandı.
- Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi.
- Steril cam tüplere döküldü.
- Kullanılincaya kadar +4°C’de saklandı.

#### **Testin Yapılışı**

- Tek koloniden iğne öze ile besiyerine batırma ekimi yapıldı.
- 37 °C’de etüvde 24 saat inkübe edildi.

#### **3.1.7. MIO (Motility-indol-ornitin) Besiyeri**

İçeriği (g/ l)

Peptic digest of animal tissue .....	10.0
Casein enzymatic hidrolisate .....	10.0
Dextroz .....	1.0
Yeast extract .....	3.0
Ferric amonium sitrat .....	0.5
Brom cresol purple .....	0.02
L-ornitin hidroclorid .....	5.0

Agar .....2.0

Ph: 6.5±0.2

MIO besiyeri, bakterilerin hareket karakteri, triptofandan indol ve indol asetik asit oluşturma ve ornitin dekarboksilasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

- Ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı.
- 31 gram toz 1 litre distile su içerisinde 5–10 dakika çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlandı.
- Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi.
- Steril cam tüplere döküldü.
- Kullanılincaya kadar +4°C’ de saklandı.

#### **Testin Yapılışı**

- Tek koloniden iğne öze ile besiyerine batırma ekimi yapıldı.
- 37 °C’de etüvde 24 saat inkübe edildi.

#### **3.1.8. Bile Esculin Agar**

İçeriği (g/ l)

Beef extract.....	3
Peptone.....	5
Bovine bile.....	40
Ferric citrate.....	0,5
Agar.....	15
Esculin.....	1

Ph:7.0

Bile esculin agar, bakterilerin safra varlığında üreyebilme ve eskülini hidroliz etme özelliklerini belirlemek amacıyla kullanıldı.

- Temel besiyeri tartıldı, distile su içinde benmaride hafif ısıtılarak eritildi.
- Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi.



- c. Soğutulmuş karışımın üzerine distile su içinde eritilmiş ve steril edilmiş eskülin eklendi.
- d. pH: 7.0'a ayarlandı. Tüplere 5 ml miktarlarda dağıtıldı; ağızları pamuk tıkaç ile kapatıldı.
- d. Tüpler yatık durumda, yüzeyi eğimli olacak şekilde katılaştırıldı.
- e. Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

### **Testin Yapılışı**

- f. Tek koloniden iğne öze ile besiyeri yüzeyine ekim yapıldı.
- g. 37 °C' de etüvde 24 saat inkübe edildi.

### **3.1.9. PYR (L-pyrolidonyl-beta-naphthylamide) Agar**

İçeriği (g/ l)

Beef heart, infusion from .....	500
Peptic digest of animal tissue .....	20
Dextrose .....	2
Sodium chloride .....	2
Disodium phosphate .....	0.4
Sodium carbonate .....	2.5
Chromogenic mixture.....	0.1
Agar.....	15
Ph: 7.8±0.2	

PYR agar besiyeri, bakterinin PYR maddesini hidroliz etme özelliğinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.

- a. PYR agar, ticari toz besiyerinden üreticinin tarif ettiği şekilde hazırlandı.
- b. 52 gr toz, 1 litre distile su içerisinde tamamen çözünmesi sağlandı.
- c. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra 20'şer ml steril plaklara döküldü.
- d. Kullanılincaya kadar +4°C' de muhafaza edildi.

### **Testin Yapılışı**

e. PYR li plak besiyerine incelenen streptokokun saf kültüründen ekimi yapıldı.

f. 37 °C’de etüvde 24 saat inkübe edildi

### **3.2. KULLANILAN CİHAZLAR VE DİĞER GEREÇLER**

- Kan kültür cihazı (BacT/Alert 3D, bioMerieux, Fransa)
- Phoenix <sup>TM</sup> 100 (Becton Dickinson, Diagnostic Instrument System, USA)
- Verigene<sup>®</sup> Blood Culture assay (Nanosphere Inc., Northbrook, IL,USA)
- Gram boyama seti (kristal viyole, lügol, denatüre alkol, sulandırılmış fuksin)
- Mikroskop (Nicon, Japonya)
- Etüv (Memmert, LODING 100-800, Macherey Nagel)
- McFarland cihazı (Becton Dickinson, USA)
- Vortex wisemix (VM-10,Wisd, Almanya)
- Eküvyon
- Bunzen beki
- Plastik öze
- 2 ml.’lik steril tek kullanımlık kapaklı ependorf tüpleri
- Steril pudrasız tek kullanımlık eldiven

### **3.3. BAKTERİ İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Merkez laboratuvarımıza gelen kan kültürleri kan kültürü cihazında beş gün boyunca inkübe edildi. Bu süre içinde pozitif üreme sinyali veren şişelerden kanlı ve EMB besiyerlerine ekim yapıldı. Üreyen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram-negatif kolonilerden laktoz pozitif olanlar biyoşimik testlerle, laktoz negatif olanlar Phoenix otomatize sistemiyle tanımlandı. Gram-pozitif koloniler ise konvansiyonel yöntemlere ek olarak Phoenix otomatize sistemiyle tanımlandı.

### **3.3.1. Konvansiyonel yöntemler**

#### **3.3.1.1. Gram boyama**

##### **Preperat Hazırlanması**

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

##### **Boyama**

- Uygulamada hazırlanan preparat üzerine kristal violet damlatılarak 1-2 dakika beklendi,
- Su ile hafifçe yıkanarak boyanın fazlası akıtıldı,
- Lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletildi, sürenin sonunda lugol çözeltisi akıtıldı.
- Preparat % 95'lik etil alkol ile 10-15 saniye yıkandı.
- Preparat, saf sudan geçirildikten sonra sulu karbol fuksin çözeltisi ile 10-30 saniye oyandı.
- Damıtık su ile iyice yıkanıp ve kurutma kağıdı ile hafifçe suyu alınarak kurumaya bırakıldı.
- İmmersiyon objektifi ile mikroskopta incelendi.

#### **3.3.1.2. Katalaz testi**

- a. Katı besiyerinde (kanlı agar hariç) üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze ile yeterli miktarda alınarak temiz bir lamın üzerine konuldu.
- b. Üzerine, % 30'luk hidrojen peroksitten bir damla damlatıldı.

c. Hidrojenperoksit katılmasından sonra hava kabarcıkların görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Katalaz pozitif olan koloni *Staphylococcus*, katalaz negatif olan ise *Streptococcus* olarak değerlendirildi.

### **3.3.1.3. Koagülaz testi**

a. Bir deney tüpü içine 1 ml, fizyolojik tuzlu su ile 1:5 oranında sulandırılmış tavşan plazması konuldu.

b. Kanlı agardan öze ile alınan bir koloni tüp içerisinde ezildi.

c. 37 °C’de etüvde 4.8.24.saatlerde pıhtının oluşması pozitif reaksiyon *S.aureus* olarak değerlendirildi.

*Staphylococcus aureus*’un diğer stafilokoklardan ayrılması amacıyla kullanıldı.

### **3.3.1.4. Basitrasin duyarlılık testi**

a. Kuşku bakterisi kanlı agar besiyerine ekildi.

b. Her birinde 0.04 ünite basitrasin içeren diskler ekim alanı üzerine yerleştirildi.

c. 37 °C’de etüvde 24 saat inkübasyonun ardından zon çapları değerlendirildi.

Stafilokoklar basitrasine dirençli iken mikrokoklar duyarlıdır.

*S.pyogenes* basitrasin duyarlı iken diğer streptokoklar duyarlıdır.

### **3.3.1.5. Trehaloz mannitol testi**

a. Deney tüplerine içine sıvı halde trehaloz ve mannitol şekerleri hazırlandı.

b. Kanlı agardan öze ile alınan bir koloni tüp içerisinde ezildi.

c. 37 °C’de etüvde 24 saat inkübasyonun ardından mor renkte olan sıvının sarı renge dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Stafilokokların şekerden asit oluşturma özelliğini belirlemek amacıyla kullanıldı.

*S.epidermidis* diğer koagülaz negatif stafilokokların aksine trehaloz ve mannitolü kullanmaz.

### 3.3.1.6. Safrada erime testi

- a. Deneyde kuşkulu bakterinin fizyolojik tuzlu suda ezilmesiyle hazırlanmış bakteri süspansiyonu kullanıldı.
- b. İki deney tüpü alındı; birincisine bakteri süspansiyonu ve safra konuldu  
ikincisine bakteri süspansiyonu ve fizyolojik tuzlu su konuldu.
- c. Tüpler 37 °C'lik etüve kaldırıldı.
- d. İki saatin sonunda birinci tüp durulaşmış olması pozitif reaksiyon *S.pneumoniae* olarak değerlendirildi.

*S.pneumoniae*'nin diğer streptokoklardan ayırt edilmesi amacıyla kullanıldı.

### 3.3.1.7. Optokine duyarlılık testi

- a. Kuşkulu bakteri kanlı agar besiyerine ekildi.
- b. 0.5µg optokin içeren diskler ilk ekim alanına yerleştirildi.
- c. 37 °C'de ve %5 lik CO<sub>2</sub> 'li ortamda 24 saat inkübasyonun ardından disk çapı ölçülerek değerlendirme yapıldı. Disk çapı 16 mm ve üzerinde ise duyarlı *S.pneumoniae* olarak değerlendirildi.

*S.pneumoniae*'nin diğer streptokoklardan ayırt edilmesi amacıyla kullanıldı.

### 3.3.1.8. CAMP testi

- a. %5 koyun kanlı agar besiyerine çap boyunca bir çizgi ekimi şeklinde eldeki *S.aureus* ekimi yapıldı.
- b. Bu ekim çizgisinin iki yanına çizgiye dik yönde ve ona dokunmadan 2-3mm yakınından başlayarak kuşkulu bakterinin ve CAMP olumlu olduğu bilinen *S.agalactia*'nın çizgi ekimi yapıldı.
- c. *S.aureus* ekim çizgisi boyunca beta hemoliz oluşmuştur. Pozitif kontrol (*S.agalactia*) ekim çizgisi boyunca oluşan beta hemoliz ok ucu şeklinde genişleme göstermiştir.
- d. İncelenen Streptokoklar bu yönde değerlendirildi.

B gurubu beta hemolitik streptokokların (*S.agalactia*) diğer streptokoklardan ayırt edilmesi amacıyla kullanıldı.

### 3.3.1.9. Safralı eskülinli agar testi

- İncelenen koloniden iğne öze ile alınan örnekten besiyerinin yüzeyine çizgi ekimi yapıldı.
- 37 °C’de inkübasyonu sonucu besiyerinde siyahlaşma oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

D grubu streptokokların diğer streptokoklardan ayırt edilmesi amacıyla kullanıldı.

### 3.3.1.10. PYR hidrolizi testi

- PYR li plak besiyerine incelenen streptokokun saf kültüründen ekimi yapıldı.
- 37 °C’de etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra üreyen kolonilerin üzerine PYR ayıracı (N,N dimethylamino cinnamaldehyd+deterjan) damlatıldı.
- PYRnin hidrolizi sonucu oluşan betanaphtylamine’in ayıraçla reaksiyona girmesi sonucu parlak kırmızı renk pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

*S.pyogenes* ve D grubu enterokokların diğer streptokoklardan ayırt edilmesi amacıyla kullanıldı

### 3.3.1.11. Biyoşimik testler

EMB besiyerinde laktoz pozitif koloni özelliği gösteren bakteriler; TSI besiyerinde glukoz, laktoz ve sükroz kullanımı ile gaz ve H<sub>2</sub>S oluşturması, sitrat besiyerinde sodyum sitrat kullanımı, MIO ve MIL besiyerlerinde lizin ve ornitin dekarboksilaz reaksiyonları ile indol üretimi yönünden değerlendirildi.

#### 3.3.1.11.a. TSI besiyerinin değerlendirilmesi

Hafif alkali ortamlı olarak hazırlanan TSI besiyeri, içerdigi fenol kırmızısı sayesinde alkali ortamda kırmızı görünümündedir. İnoküle edilen bakteri, TSI ortamında bulunan karbonhidratları fermente ettiği takdirde ortamın pH’sı aside kaymakta ve asit ortamda fenol kırmızısı sarı bir renge dönüşmektedir. Eğer inoküle edilen bakteri karbonhidratlardan hiçbirini kullanmazsa ortamın pH’sı alkali kalmakta yani besiyerinin rengi kırmızı olarak devam etmektedir. Dip ve yatık kısımdaki renk değişimine göre bakterilerin karbonhidratları fermente edip etmediği değerlendirildi. Ayrıca siyah renk oluşumu bakterilerin H<sub>2</sub>S oluşturduğu, besiyerinde hava kabarcıkları veya çatlamların varlığı ise gaz oluşturduğu yönünde değerlendirildi.

### **3.3.1.11.b. Sitrat besiyerinin değerlendirilmesi**

Bakteri sitratı karbon kaynağı olarak kullanıyorsa inkübasyon süresi sonunda, normal durumda koyu yeşil renkli olan sitrat besiyeri, Prusya mavisi rengine döner. Rengin maviye dönüşmesi pozitif reaksiyon, besiyeri renginin değişmemesi negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

### **3.3.1.11.c. MIL ve MIO besiyerlerinin değerlendirilmesi**

Bakteri inoküle edilmiş olan besiyerleri 37°C'de 16–20 saat inkübe edildikten sonra besiyeri üstüne kovaks ayırıcı damlatıldı. Normal durumda sarı renkli olan kovaks ayırıcı kırmızı-pembe bir renk değişimine uğrarsa pozitif reaksiyon, böyle bir renk değişimi gözlenmezse negatif reaksiyon olarak değerlendirildi. Mor olan besiyeri renginin değişmemesi bakterinin lizin ve ornitin dekarboksilaza sahip olduğunu, rengin sarıya dönüşümü bu enzimler yönünden negatif olduğunu gösterdi. Bakterinin sadece ekim çizgisi üzerinde üremesi hareketsiz, ekim çizgisi dışına doğru üreme ve besiyerinin bulanıklaşması hareketli olduğunu gösterdi.

### **3.3.2. Phoenix otomatize sistemi**

Üretici firmanın direktifleri doğrultusunda, plaklardan alınan yeterli miktardaki koloniler AST Broth solüsyon tüpünün içerisinde, turbidometre cihazı (BD, PhoenixSpec, Nephelometer, USA) kullanılarak son bulanıklığı 0,5 McFarland standard yoğunluğunda olacak şekilde süspanse edildi. Ardından, standardize ID Broth solüsyonundan 25 µl pipet yardımıyla, önceden hazırlanan AST Broth solüsyon tüpüne aktarıldı. Daha sonra, elde edilen solüsyonlar BD Phoenix™ PMIC/ID-70 ve BD Phoenix™ NMIC/ID-99 paneller içerisindeki uygun kuyucuklara inoküle edildi ve Phoenix cihazına dikkatlice yerleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda identifikasyon ve antibiyogramları tamamlanan örneklerin değerlendirilmesi BD EpiCenter™ yazılımı kullanılarak yapıldı.

### **3.3.3. Moleküler yöntemler**

#### **Verigene® Blood Culture assay (Nanosphere Inc. Northbrook, IL, USA)**

Çalışmada, kan dolaşımı enfeksiyonuna sebep olabilecek potansiyel patojenik Gram negatif / pozitif bakterilerin eş zamanlı tanımlanması için kalitatif ve multipleks bir yöntem olan Verigene sistem kullanıldı. Bu test sürekli kan kültürü izleme sistemi tarafından pozitif olarak tanımlanan ve Gram negatif / pozitif bakteri içeren

BacT/Alert Standard Aerobic kan kültürü şişeleri kullanılarak doğrudan kan kültürü ile gerçekleştirildi. Kan kültürü cihazında pozitif sinyal verdikten sonra çıkarılan şişelerden alınan kan örnekleri Gramla boyanarak uygun olan testle çalışıldı.

### **Verigene® Gram-Negatif Kan Kültürü Nükleik Asit Testi (BC-GN)**

<u>Bakteriyel cinsler ve türler</u>	<u>Direnç genleri</u>
<i>Acinetobacter spp.</i>	CTX-M
<i>Citrobacter spp.</i>	KPC
<i>Enterobacter spp.</i>	NDM
<i>Proteus spp.</i>	VIM
<i>Escherichia coli</i>	IMP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA
<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	

### **Verigene® Gram-Pozitif Kan Kültürü Nükleik Asit Testi (BC-GP)**

<u>Bakteriyel cinsler ve türler</u>	<u>Direnç genleri</u>
<i>Micrococcus spp.</i>	mec-A
<i>Listeria spp.</i>	van-A/van-B
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus eidermidis</i>	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Streptococcus anginosus grup</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	



Sistem aşağıda belirtilen iki modülden oluşur: Verigene Processor SP ve Verigene Reader. Verigene Processor SP, aşağıdakiler de dahil olmak üzere **BC-GN ve BC-GP** numune analizini otomatikleştirir: (i) Numune Hazırlama – pozitif kan kültürü numunelerinden hücre lizisi ve manyetik boncuk tabanlı nükleik asit ekstraksiyonu ve (ii) Hibridizasyon – bir mikroarray formatındaki ve aracı hedefe özel yakalama DNA'sının bakteriyel DNA hibridizasyonu ve yakalanmış bakteriyel nükleik asitlere altın nanopartiküllü prob hibridizasyonu. Yakalama sahalarında bağlı altın nanopartikül problemlerinin gümüş güçlendirmesi Verigene Reader tarafından yüksek etkilikle optik olarak değerlendirilen altın-gümüş agregatlar ile sonuçlanmaktadır.

Verigene Reader ayrıca test süreci boyunca bilgi saklamak ve izlemek için Verigene Sistemi için kullanıcı arayüzü ve merkezi kontrol birimi olarak da kullanılmaktadır.

Verigene Processor SP, **BC-GN ve BC-GP** uygulamak için, Ekstraksiyon Tepsisi, Kullanım Tepsisi ve Verigene Test Kartuşu gibi tek kullanımlık malzemeler kullanır. Ayrı bir Pipet Ucu kabı düzeneği, deney sırasında reaktiflerin transfer edilmesi ve karıştırılması için kullanılan iki pipet ucundan oluşur.

Bir numuneyi, tek kullanımlık materyalleri Verigene Processor SP'ye yükleyerek, pozitif kan kültürü numunesi ekstraksiyon tepsisine pipetlendi. Daha sonra Test Kartuşu numarası ile numune bilgileri girilerek Verigene Reader'da test protokolü başlatıldı. Testin tamamlanmasından sonra, Test Kartuşunun substrat slaytı Verigene Reader'a yerleştirilerek test sonuçları değerlendirildi.

Ekstraksiyon Tepsisi, Kullanım Tepsisi ve Test Kartuşunu içeren kitler Gram Negatif (**BC-GN**) ve Gram Pozitif (**BC-GP**) için ayrı olarak geldi.

### **Verigene® Kiti içeriğindeki malzemeler:**

#### **Verigene® Test Kartuşu**

Her test kartuşu yıkama solüsyonları, oligonükleotid prob solüsyonu ve sinyal amplifikasyon solüsyonları gibi bir test sonucu elde etmek için gerekli tüm reaksiyon solüsyonlarıyla önceden doldurulmuş halde geldi.

### **Verigene® Ekstraksiyon Tepsisi (Pipet Ucu Kabı Düzenekleri ile)**

Her ekstraksiyon tepsisi lysis/bağlayıcı tampon, digestive enzimleri, yıkama solüsyonları ve tampon solüsyonları gibi nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve test sonucu elde etmek için gerekli tüm solüsyonlarla önceden doldurulmuş halde geldi.

### **Verigene® Kullanım Tepsisi**

Her bir kullanım tepsisi sindirim enzimleri ve nükleik asitlerin ekstraksiyonu için gerekli çözeltiler ve önceden yüklenmiş olarak geldi. BC-GP tepsisinde *B.subtilis* proses kontrolü de dahildi.

Çalışma sırasında bu malzemeler dondurulmadan 2-8 °C sıcaklıkta saklandı. **BC-GN** testi kullanım tepsisi üretici talimatlarına uygun olarak dondurucu da saklandı.

### **Yöntemler**

#### **A. Numune toplama, işleme, saklama**

1. Otomatize kan kültür sisteminde inkübe edilen şişe pozitif sinyal verdiği çıkarıldı.
2. Pozitif kan kültürü şişesinden Gram boyama yapıldı.
3. Gram-negatif bakteri için, kan kültürü medianın 700 µL'si **BC-GN** kullanılarak test edildi.

Gram-pozitif bakteri için, kan kültürü medianın 350 µL'si **BC-GP** kullanılarak test edildi.

4. Test numunesi hacmini almadan önce bir kaç defa (>4) çevirilerek kan kültürü şişesinin iyice karışması sağlandı.
5. Pozitif kan kültürlerinin alt kültürlemesi, hassasiyet testi, **BC-GN** ve **BC-GP** tarafından saptanmayan organizmaların tanımlanması, karma büyümeyi ayırma ve direnç markeri türlerinin özel bir organizma ile ilişkilendirilmesi için gereklidir.
6. Pozitif kan kültürü şişesi mediası tekrar kullanılabilirliğine karşı 24 saate kadar 2-8°C'de saklandı.

## B. Test prosedürü

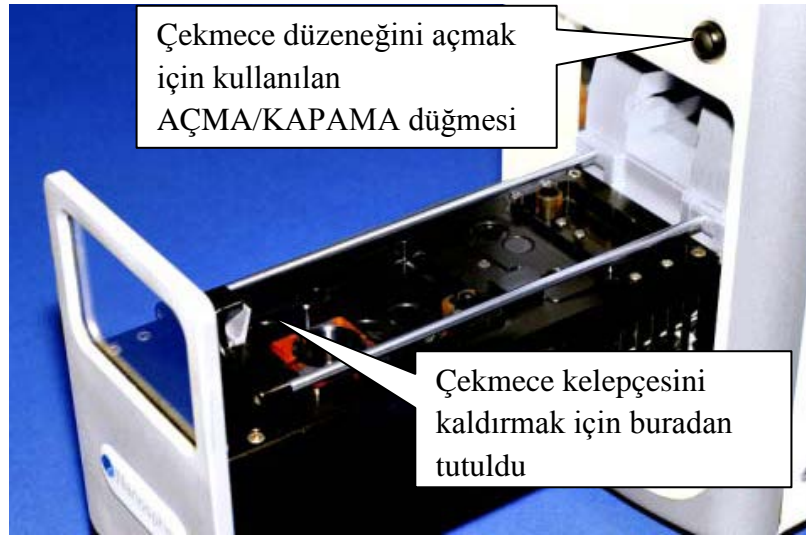
### 1. Çalışma alanının test için hazırlanması

Örnekleri hazırlamadan önce ve hazırladıktan sonra vorteks karıştırıcılar, santrifüjler, pipetler, tezgah üstleri ve kullanılan diğer ekipmanlar hav bırakmayan bir dezenfektan bezle silindi.

### 2. Test kurulumu

a) Bir Ekstraksiyon Tepsisi, Pipet Ucu Kabı Düzeneği, Kullanım Tepsisi ve Test Kartuşu buzdolabından çıkarıldı. Kullanım tepsisi dondurucuda saklanmışsa, tamamen çözülene kadar en az 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

b) Verigene Processor SP'nin (Şekil 1) ön tarafında bulunan siyah renkli AÇMA/KAPAMA düğmesine basarak çekmece düzeneği açıldı. Sarf malzemelerini yüklemeyen önce gümüş rengi kilide basarak çekmece kelepçesi kaldırıldı.



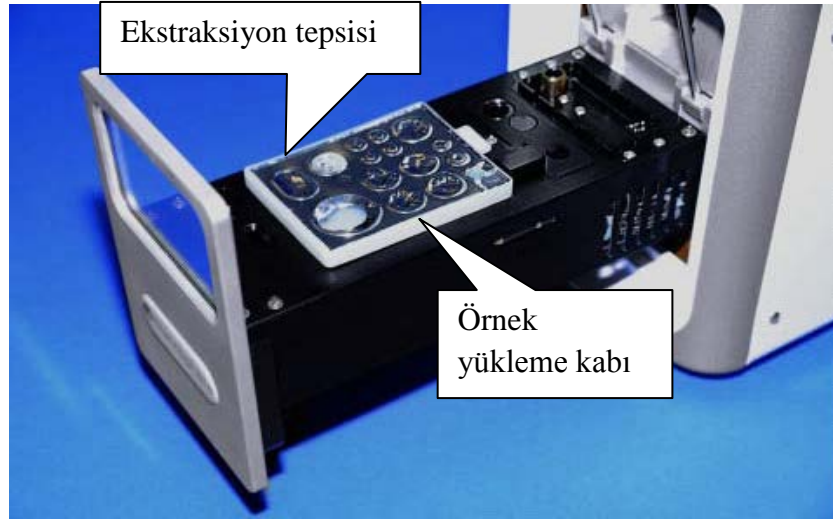
Şekil 1. Verigene Processor SP

### 3. Ekstraksiyon Tepsisini yükleme

a) Ekstraksiyon tepsisini yüklemeyen önce depolama sırasında yerleşen manyetik bilyeleri tekrar süspansiyon haline getirmek için tepsiyi iyice çalkalandı. Bilyeleri içeren kabı inceleyerek, tam yeniden süspansiyon haline gelip gelmediği kontrol edildi. Bilyeler siyah renkli olduğundan manyetik bilyeleri içeren kuyucuk kolaylıkla ayırt

edilebiliyordu. Yeterli yeniden süspansiyonun ardından reaktiflerin her bir kuyucuğun altına yerleşmesini sağlamak için tezgahın üzerinde tepsiye hafifçe vuruldu.

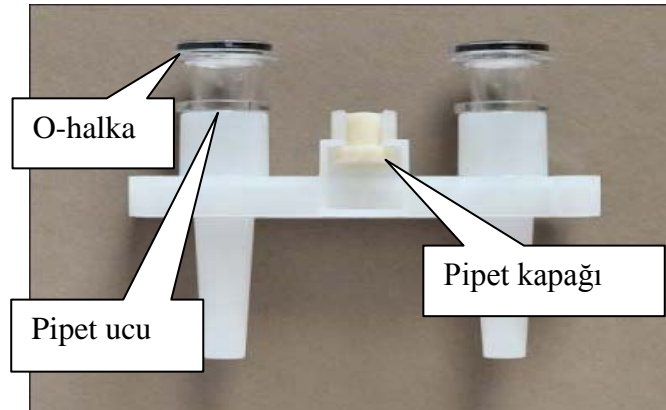
b) Ekstraksiyon tepsiyi çekmece düzeneğindeki uygun lokasyonuna yüklendi (Şekil 2). Ekstraksiyon tepsiyi doğru biçimde yüklendiğinde örnek yükleme kuyucuğu çekmece düzeneğinin sağ tarafına konumlanıyordu. Ekstraksiyon tepsiyi yerleştirdikten sonra seviyesini ayarlamak için köşelerden bastırıldı.



Şekil 2. Ekstraksiyon tepsiyi yükleme

#### 4. Pipet Ucu Kabı Düzeneğini Yükleme

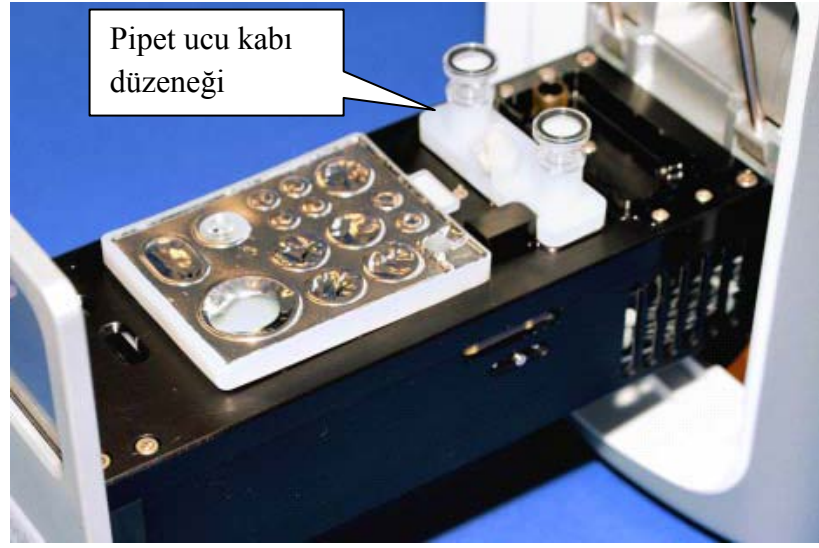
a) Pipet ucu kabı düzeneği iki pipet ucu ve kauçuk pipet kapağı içeren plastik bir tutucudur. Her bir pipet ucu üst kısmında bir O-halka içerir (Şekil 3).



Şekil 3. Pipet ucu

b) Pipet ucu kabı düzeneğini kullanmadan önce, her bir pipet ucunun O-halkası kontrol edildi ve kauçuk pipet kapağının uçlar arasında dik ve düz bir şekilde oturduğu doğrulandı.

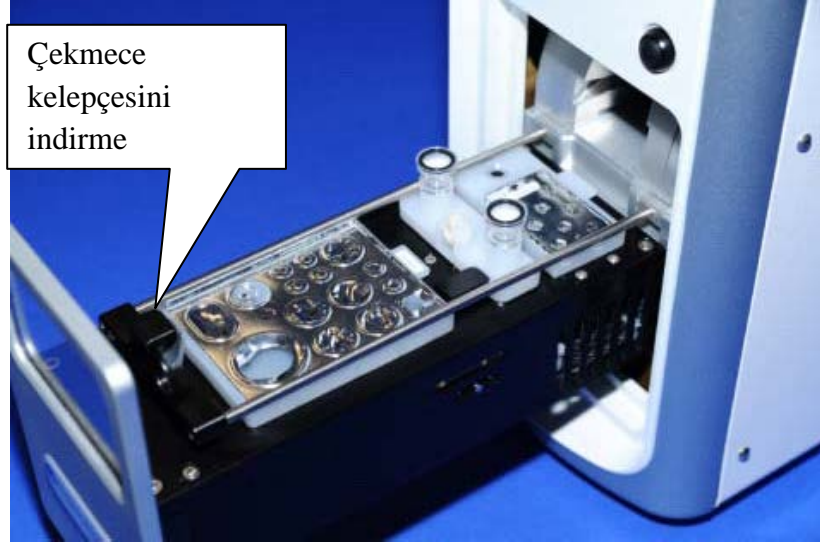
c) Pipet ucu kabı düzeneği çekmece düzeneğindeki uygun lokasyonuna yerleştirildi (Şekil 4). Yönlendirme için çekmece düzeneğinin üstünde her bir pipet ucunun yerleşmesi için iki delik vardı.



Şekil 4. Pipet ucu kabı düzeneğini yükleme

## 5. Kullanım Tepsisini yükleme

- Kullanım Tepsisi dondurularak saklanmışsa 10 dakika oda sıcaklığında çözdürüldü.
- Reaktifleri çökeltmek için tezgahta tepsiye hafifçe vuruldu.
- Kullanım tepsisi çekmece düzeneğindeki uygun lokasyonuna yerleştirildi. Tepsi düzgün bir şekilde yüklendiğinde düz oturmalıydı.
- Bir elimizle çekmeceyi desteklerken, çekmece kelepçesi tepsilerin üzerine alçaltılıp kilitlendi (Şekil 5). Çekmece kelepçesi düzgün bir şekilde kapatıldığında çekmece düzeneği üzerine kilitlendi ve gümüş kilide basmadan kelepçe kaldırılamadı.



Şekil 5. Çekmece kelepçesini indirme

## 6. Test İsteme

Testler Verigene Reader aracılığıyla istendi.

a. Verigene Reader'a giriş yapıldı.

b. Daha önce oluşturulmuş bir oturumdan test istemi yapıldı.

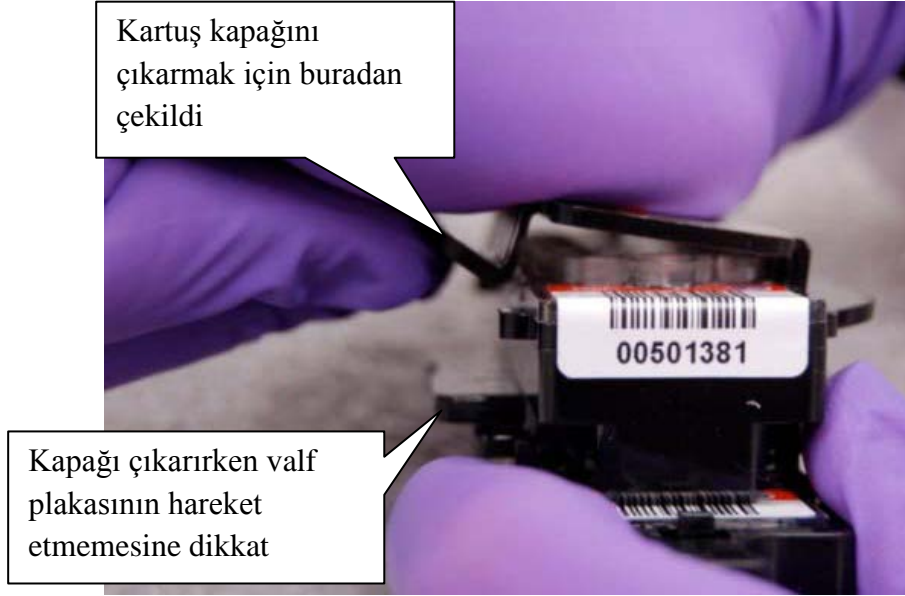
c. Oturum ID düğmesine basıldı ve veri giriş klavyesini kullanarak bilgileri girildi

d. Reader'a takılı barkod tarayıcıyı kullanıp barkodu tarayarak test kartuşu numarası girildi.

## 7. Bir Test Kartuşunun Yüklenmesi

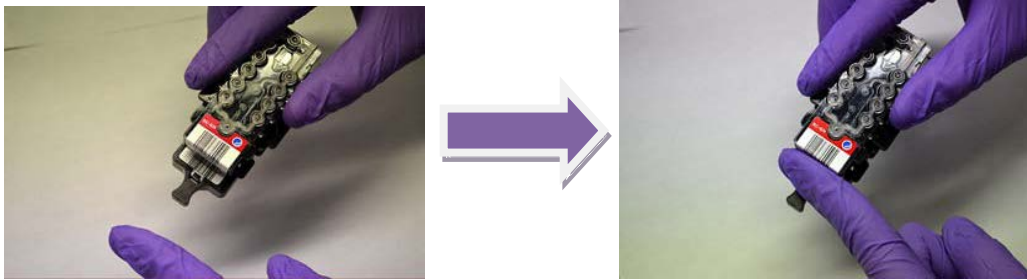
a) Bir elimizle kartuşun tutacağına tutup, diğer elimizin avuç içiyle basınç uygulayarak kapak geriye doğru bükülerek çıkarıldı. Kapağın çıkarılması sırasında valf plakasının hareket etmemesine dikkat edildi.

Test kartuşunun kapağı, kartuşu Processor SP içine yerleştirmeden hemen önce çıkarıldı (Şekil 6).



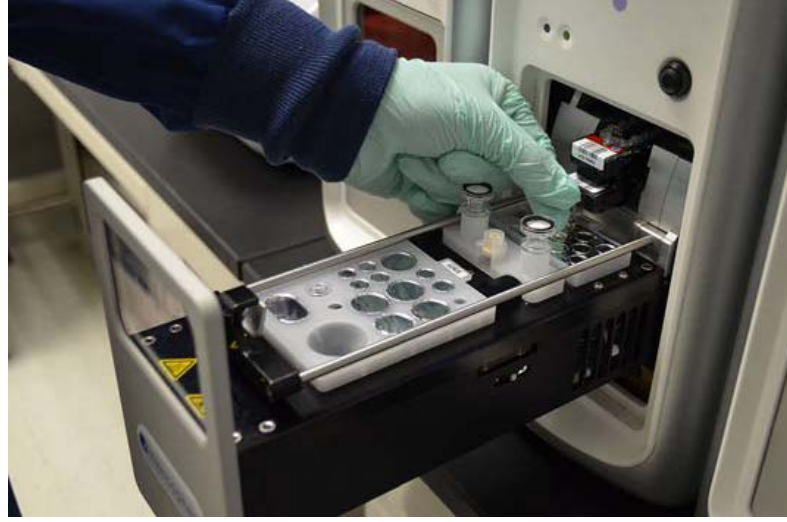
**Şekil 6.** Kartuşun kapağını çıkarma

b) Yüklemeden önce reaktifleri kartuşa yerleştirmek için sağ elimizin işaret parmağıyla kartuşun barkodlu ucuna vurma işlemi uygulandı (Şekil 7).



**Şekil 7.** Kartuşa vurma

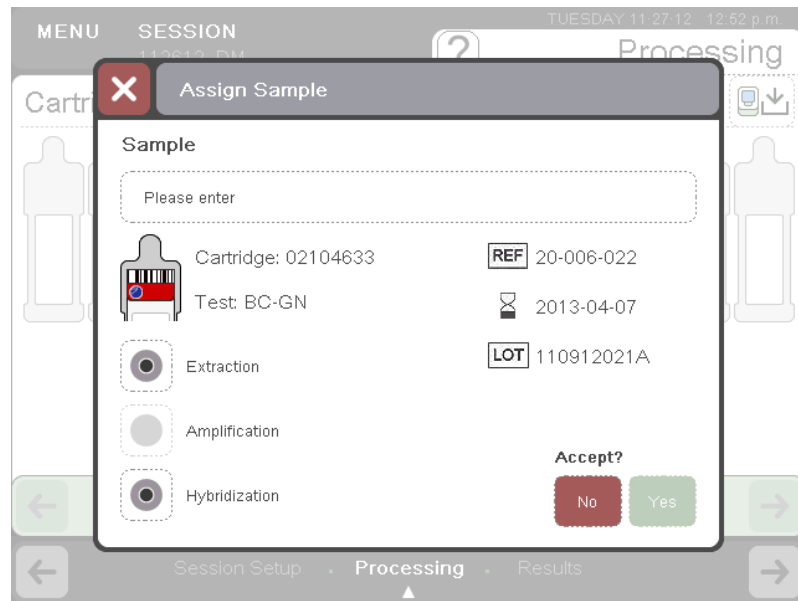
c) Durma noktasına ulaşıncaya kadar test kartuşu Verigene Processor SP'nin hibridizasyon modülüne yerleştirildi (şekil 8) .



şekil 8. Kartuşu yerleştirme

## 8. Örneğin Yükleilmesi

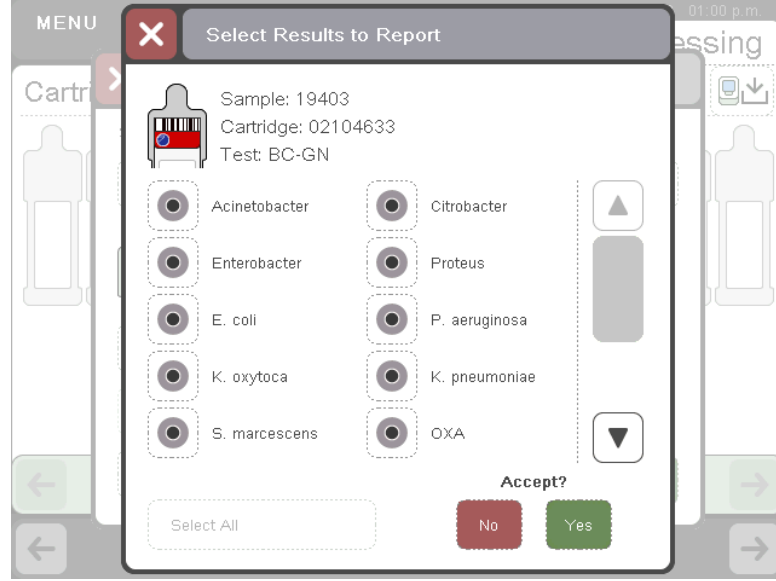
a) Örneğ numarasını tarayarak veya Reader'ın dokunmatik klavyesi ile manuel olarak örneğ numarası Reader'a girildi. Örneğ numarasını doğrulamak için 'Evet' düğmesine basıldı. Ekstraksiyon ve Hibridizasyon seçeneklerinin tümü seçildi (şekil 9).



şekil 9. Örneğin Yükleilmesi



b) Sonraki iletişim kutusunda, bu hedefler için sonuç raporlamayı etkinleştirmek için listeden bakteri türleri veya direnç markerleri seçildi. Doğrulamak için Evet düğmesine basıldı (Şekil 10).



Şekil 10. Hedeflerin seçimi

c) Kan kültürü hafifçe çalkalandı ve kan kültürünün Gram Negatif için 700 µL'si Gram Pozitif için 350 µL'si ekstraksiyon tepsisindeki örnek yükleme kuyucuğunun altına pipetlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Ekstraksiyon tepsi

d) Processor SP'de bulunan AÇMA/KAPAMA düğmesine basılarak çekmece düzeneği kapatıldı. Processor her bir sarf malzemenin düzgün bir biçimde yüklendiğini ve örnek işlemeye başlandığını otomatik olarak doğrulayana kadar beklendi.

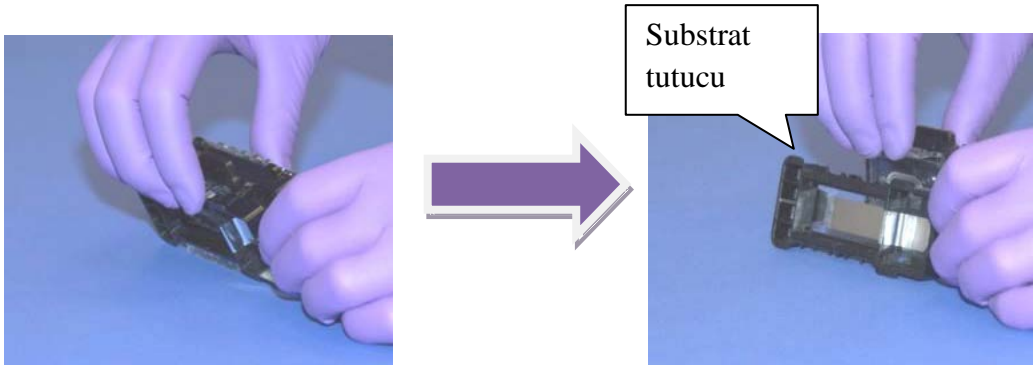
### 9. Test çalışmasının tamamlanmasından sonra

a) Verigene Reader test tamamlandığında kullanıcıyı bilgilendirmek için bir halka oluşturdu ve Processor SP "Prosedür Tamamlandı. Çekmece Açılmaya Hazır" mesajını görüntüledikten sonra test kartuşu Processor SP'den çıkarıldı.

b) AÇMA/KAPAMA düğmesine basarak çekmece düzeneği açıldı.

c) Test kartuşu çıkarılıp ve hemen yanına yerleştirildi.

d) Test kartuşunu yanında tutarken, reaktif paketini ayırıp substratı çıkarıldıktan sonra 30-60 saniye boyunca kuruması için yanında tutuldu (Şekil 12).



Şekil 12. Substratın çıkarılması

### 10. Sonuçları analiz etme

a) Koruyucu bandı substrat tutucudaki slaytın arkasından çıkarıldıktan sonra Reader'ın barkod tarayıcısı ile tutucunun barkodu okutuldu.

c) Substrat tutucu Reader'a yerleştirildi.

e) Substrat tutucu Reader'a düzgün bir biçimde yerleştirildikten sonra substrat bölmesinin kapağı kapatıldı.

f) Analizin tamamlanması beklendi.

### **3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

#### **3.4.1. Disk difüzyon testi**

- a. İnokulum, kültür plaklarında üremiş olan bakteri kolonilerinden bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland standart bulanıklıkta olacak şekilde hazırlandı.
- b. Bu süspansiyon steril eküvyon yardımıyla MHA besiyeri yüzeyine inoküle edildi.
- c. Plakların kuruması beklendikten sonra üzerlerine üreyen mikroorganizmaya uygun olan antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler yerleştirildi.
- d. 35 C°'de 18-24 saatlik inkübasyonu takiben antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü.
- e. CLSI kriterlerine göre elde edilen sonuçlar yorumlandı

#### **3.4.2. Phoenix otomatize sistemi**

Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin antibiyogram ve direnç profilleri 3.3.2.de belirtildiği şekilde üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

#### **İstatistiksel analiz**

Veriler bilgisayar ortamında SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, III., USA) programı yardımıyla değerlendirildi. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testiyle test edildi. Verilerin istatistiksel analizinde, kategorik veriler için Pearson ki-kare testi, nicel veriler için Paired t testi ve unpaired t testi kullanıldı.

Kategorik veriler sayı ve yüzde olarak, nicel veriler aritmetik ortalama  $\pm$ SD olarak gösterildi. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

Mikroarray yöntemi ve rutin sonuçlarının uyumu Kendall's tau-b analizi ile değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmaya, Temmuz 2014 - Ocak 2015 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nin servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan ve sepsis tanısı alan 52 hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen 31'i kadın (% 59,6), 21'i erkek (% 40,4) hastanın yaş ortalaması 45.78 (0-89) idi. Hastaların % 74'ü nozokomiyal % 26'sı toplum kaynaklı sepsis tanısı aldı. En sık altta yatan hastalıkların hipertansiyon ve diabetes mellitus olduğu görüldü. Hastaların bazılarında birden çok sayıda altta yatan hastalık mevcut iken, % 17.3'ünde altta yatan herhangi bir hastalık yoktu (Tablo 3).

**Tablo 3.** Sepsis tanısı alan olguların altta yatan hastalıkları

Altta yatan hastalık	n ( % )
Diabetes Mellitus	11 ( 21.2 )
Hipertansiyon	16 ( 30.8 )
Hematolojik malignite	13 ( 25.0 )
Kronik böbrek hastalığı	7 ( 13.4 )
Kronik akciğer hastalığı	7 ( 13.4 )
Kronik kalp hastalığı	4 ( 7.7 )
Solid organ malignitesi	5 ( 9.6 )
Merkezi sinir sistemi, serebrovasküler hastalık	3 ( 5.8 )
Diğer ( Respiratuar distres sendromu, Pemfigus )	2 ( 3.8 )
Yok	9 ( 17.3 )

Hastaların 25'i (% 48.1) yoğun bakım ünitelerinde yatmakta iken, 27'si (% 51.9) yoğun bakım dışı kliniklerde yatmaktaydı. Sepsis atağı geçiren hastaların 31'i (% 59.6) mekanik ventilasyon desteğinde idi. Hastaların 23'ünde (% 44.3) üriner kateter ve 37'sinde (% 71.2) santral venöz kateter mevcut idi (Tablo 4).

**Tablo 4.** Predispozan faktörler

<b>Predispozan faktörler</b>	<b>n ( % )</b>
Mekanik ventilasyon	31 ( 59.6 )
Santral venöz kateter	37 ( 71.2 )
Üriner kateter	23 ( 44.3 )
Sitotoksik tedavi	15 ( 28.8 )
Nötropeni	12 ( 23.1 )
Cerrahi öykü	9 ( 17.3 )
Diğer işlemler (Perkutan transhepatik kolanjiografi, şant drenaj)	9 ( 17.3 )

Sepsisi şiddetine göre değerlendirdiğimizde ataklar sırasında hastaların % 40.4'ü sepsis, % 38.4'ü ağır sepsis, % 21.2'si septik şokta idi. Hastaların yatış yerine göre sepsisin şiddetini sınıflandırdığımızda, yoğun bakımda sepsis gelişen hastalarda, ağır sepsis ve septik şok oranları daha yüksek bulundu (Tablo 5). Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı kabul edildi (  $p < 0.001$  ).

**Tablo 5.** Sepsis ataklarının geliştiği klinikler ve sepsis şiddeti

		<b>Sepsis şiddeti</b>			<b>Toplam</b>	
		<b>Sepsis</b>	<b>Ağır sepsis</b>	<b>Septik şok</b>		
<b>Klinik</b>	<b>Yoğun bakım dışı</b>	<b>sayı ( % )</b>	19 ( 70.3 )	5 ( 18.5 )	3 ( 11.2 )	27 ( 100.0 )
	<b>Yoğun bakım üniteleri</b>	<b>sayı ( % )</b>	2 ( 8.0 )	15 ( 60.0 )	8 ( 32.0 )	25 ( 100.0 )
<b>Toplam</b>		<b>sayı ( % )</b>	21 ( 40.4 )	20 ( 38.4 )	11 ( 21.2 )	52 ( 100.0 )

Ki-kare değeri (  $X^2$  ) = 20.750 (  $p < 0.001$  )

Hastaların tamamında C-Reaktif Protein (CRP) değerlerinin yüksek olduğu saptandı. CRP değerlerinin ortalaması yoğun bakım hastalarında 150.0 iken, yoğun bakım dışı kliniklerde 143.8 olarak saptandı. İstatistiksel olarak bu farkın anlamlı olmadığı görüldü (  $p= 0.809$  ).

Sepsis ataklarına en sık neden olan enfeksiyon odağının yoğun bakımda akciğer, yoğun bakım dışında ise üriner sistem ve santral venöz kateterler olduğu saptandı. Toplam 18 hastada enfeksiyon odağı saptanamadı (Tablo 6).

**Tablo 6.** Sepsis atakları sırasında mikrobiyolojik olarak dokümanite edilmiş enfeksiyon odakları

	<b>Yoğun bakım n ( % )</b>	<b>Yoğun bakım dışı n ( % )</b>	<b>Toplam n ( % )</b>
Akciğer	<b>9 ( 36.0 )</b>	1 ( 3.7 )	10 ( 19.2 )
Üriner sistem	1 ( 4.0 )	<b>4 ( 14.8 )</b>	5 ( 9.7 )
Santral venöz kateter	1 ( 4.0 )	<b>5 ( 18.5 )</b>	6 ( 11.5 )
Batın	4 ( 16.0 )	2 ( 7.4 )	6 ( 11.5 )
Deri ve yumuşak doku	4 ( 16.0 )	3 ( 11.1 )	7 ( 13.5 )
Odak saptanamayan	6 ( 24.0 )	12 ( 44.5 )	18 ( 34.6 )
Toplam	25 ( 100.0 )	27 ( 100.0 )	52 ( 100.0 )

Sepsis atağı sırasında laboratuvara gönderilen kan kültürlerinin rutin sonuçları Mikroarray yöntemi sonuçları ile karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında istatistiksel olarak yüksek oranda ( %96 ) uyum olduğu görüldü (Tablo 7).

**Tablo 7.** Mikroarray yöntemi ile rutin sonuçların uyumu

<b>Sonuç</b>	<b>Mikroarray yöntemi n ( % )</b>	<b>Rutin yöntem n ( % )</b>
<i>Escherichia coli</i>	10 ( 19.2 )	9 ( 17.3 )
<i>E.coli, Klebsiella pneumoniae</i>	1 ( 1.9 )	2 ( 3.8 )
<i>E.coli, Klebsiella oxytoca</i>	0 ( 0.0 )	1 ( 1.9 )
<i>E.coli, Acinetobacter spp.</i>	2 ( 3.8 )	2 ( 3.8 )
<i>E.coli, Pseudomonas aeruginosa</i>	1 ( 1.9 )	1 ( 1.9 )
<i>P.aeruginosa</i>	5 ( 9.6 )	5 ( 9.6 )
<i>Acinetobacter spp.</i>	4 ( 7.7 )	4 ( 7.7 )
<i>K. pneumoniae</i>	4 ( 7.7 )	4 ( 7.7 )
<i>Enterobacter spp.</i>	4 ( 7.7 )	4 ( 7.7 )
<i>Enterobacter spp, E.coli, K.oxytoca</i>	1 ( 1.9 )	0 ( 0.0 )
<i>Proteus spp.</i>	2 ( 3.8 )	2 ( 3.8 )
<i>Serratia marcescens</i>	1 ( 1.9 )	1 ( 1.9 )
<i>Stapylococcus aureus</i>	4 ( 7.7 )	4 ( 7.7 )
<i>Stapylococcus epidermidis</i>	3 ( 5.8 )	3 ( 5.8 )
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2 ( 3.8 )	2 ( 3.8 )
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 ( 3.8 )	3 ( 3.8 )
<i>E.faecalis, E.faecium</i>	1 ( 1.9 )	0 ( 0.0 )
<i>Stapylococcus spp, E.faecium</i>	1 ( 1.9 )	1 ( 1.9 )
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 ( 1.9 )	1 ( 1.9 )
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 ( 1.9 )	1 ( 1.9 )
<i>Micrococcus spp.</i>	1 ( 1.9 )	1 ( 1.9 )
<i>Leuconostoc lactis</i>	0 ( 0.0 )	1 ( 1.9 )
Negatif	1 ( 1.9 )	0 ( 0.0 )
Toplam	52 ( 100.0 )	52 ( 100.0 )

Genel uyum oranı = % 96

tau-b değeri =  $p < 0.001$

Sepsis atağı sırasında laboratuvara gönderilen 52 kan kültüründen 48'inde aynı mikroorganizma türleri izole edildi. Mikroarray yöntemi ile negatif olarak değerlendirilen bir kan kültüründe rutinde *Leuconostoc lactis* adlı bakteri izole edildi ve kontaminasyon olarak değerlendirildi. Diğer üç kan kültüründe ise mikroarray yöntemi ile rutin yöntemler arasında farklı sonuçlar elde edildi (Tablo 8).

**Tablo 8.** Mikroarray yöntemi ile rutin yöntemler arasındaki farklı sonuçlar

	<b>Mikroarray yöntemi</b>	<b>Rutin yöntem</b>
<b>Sonuç</b>	<b>1</b>	<i>E.coli</i>
	<b>2</b>	<i>E.coli, K.pneumoniae</i>
	<b>3</b>	<i>E.coli, K.oxytoca Enterobacter spp</i>
	<b>4</b>	<i>E. coli, K.oxytoca</i>
	<i>E.faecalis, E.faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
	Negatif	<i>Leuconostoc lactis</i> *

\*Kontaminasyon

Mikroarray yöntemi ile belirlenen direnç profili rutin sonuçlarla karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında istatistiksel olarak yüksek oranda (%96) uyum olduğu görüldü (Tablo 9).

**Tablo 9.** Mikroarray yöntemi ile rutin sonuçların direnç uyumu

<b>Sonuç</b>	<b>Mikroarray yöntemi n ( % )</b>	<b>Rutin yöntem n ( % )</b>
GSBL*	7 ( 13.5 )	6 ( 11.3 )
Karbapenem direnci	9 ( 17.3 )	10 ( 19.2 )
Karbapenem direnci, GSBL*	3 ( 5.8 )	3 ( 5.8 )
Metisilin direnci	4 ( 7.7 )	5 ( 9.6 )
Vankomisin direnci	1 ( 1.9 )	1 ( 1.9 )
Negatif	28 ( 53.8 )	27 ( 51.9 )
Toplam	52 ( 100.0 )	52 ( 100.0 )

\* GSBL: Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

Genel uyum oranı = % 96.6

tau-b değeri =  $p < 0.001$



Mikroarray yöntemi ile belirlenen direnç geni profilinde; 10 CTX-M geni ( GSBL ), 10 OXA geni ( karbapenem direnci ), iki VIM geni ( karbapenem direnci ), dört mecA geni ( metisilin direnci ), bir de vanA geni pozitifliği saptandı.

Rutin yöntemlerle *Staphylococcus epidermidis* izole edilen ve metisilin dirençli olarak değerlendirilen bir kan kültüründe mikroarray yöntemi ile mecA direnç geni gösterilemedi.

Diğer bir kan kültüründe ise rutinde izole edilen *E. coli* karbapenem dirençli olarak değerlendirilirken, mikroarray yöntemi ile CTX-M direnç geni pozitif (GSBL) olarak gösterildi. Yöntemler arasındaki bu farklılıklar uyumsuzluk olarak yorumlandı.

Üremelerin olduğu kan kültürlerinde pozitif sinyal verme süresi ortalama 32.6 saat, örnek alımından bakteriyel tanımlama işlemi sonuçlanana kadar geçen süre ortalama 60.0 saat olarak hesaplandı. Mikroarray yöntemi ile tanımlama süresi örneğin cihaza yüklenmesi de dahil ortalama 2.5 saat sürdü (Tablo 10).

**Tablo 10.** Mikroarray yöntemi ile rutin sonuçların ortalama süreleri

	<b>Mikroarray yöntemi</b>	<b>Rutin yöntem</b>
<b>Ortalama süre (saat)</b>	2.5	60.0

$p < 0.001$

Mikroarray yöntemi ile rutin kan kültürü yöntemleri, sonuçlanma süreleri ortalamaları bakımından karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (  $p < 0.001$  ).

## 5. TARTIŞMA

Bakteriyemi ve sepsis, tanısında zorluklarla karşılaşılabilen, mortalitesi yüksek bir süreçtir. Bakteriyemilere bağlı mortalite % 20-50 arasında bildirilmektedir (57,58). Mortalitede gözlenen bu oransal fark kuşkusuz, hastaneler arasındaki başta teknik donanım ve sağlık hizmetlerinde sunulan farklı hizmet şekillerine bağlı olmakla beraber, oranları etkileyen en önemli faktörün çalışmalarda alınan hasta popülasyonları olduğu söylenebilir. Toplum kaynaklı bakteriyemilerde mortalite daha düşükken, nozokomiyal bakteriyemilerde daha yüksektir. Ayrıca farklı hastanelerde farklı direnç profillerine sahip etkenlerin varlığı da prognozu etkilemektedir. (57,58)

Bakteriyemiye neden olan mikroorganizmaların dağılımıyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda, kan kültürlerinden Gram-negatif bakterilerin % 20–64, Gram-pozitif bakterilerin ise % 27–78 oranında izole edildiği bildirilmektedir (3, 57). Oranlar arasındaki ciddi farklılıklar etkenlerin hastaneden hastaneye değişmesinin yanı sıra, farklı hasta gruplarını (hastane kaynaklı, toplum kaynaklı, kateter ilişkili vb.) içermesine bağlanmaktadır (2). Ülkemizde yapılan çalışmalarda Yücel P. ve ark. (60) Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri oranlarını sırasıyla % 28.1 ve % 59.3 olarak, Duman Y. ve ark (61) % 68.5 ve % 31.5 olarak, Kaya ve ark. (62) ise % 62.2 ve % 37.8 olarak bildirmişlerdir. İzole edilen Gram-pozitif bakteriler içerisinde KNS bir çok çalışmada en sık izole edilen etken olup, izolasyon oranı % 40–50 arasında bildirilmiştir (61-64). Bu çalışmalarda Gram-pozitif bakterilerden 2. en sık etken Enterokoklar, Gram-negatif bakterilerden ise en sık etken *Escherichia coli* olarak bildirilmiştir (61–64). Nosocomial Infections Surveillance ( NNIS ) ve SCOPE çalışma grupları ABD’de de nozokomiyal bakteriyemilerde en önemli etkeni KNS olarak bildirmişlerdir (65).

Üniversitemizde, bakteriyemilerde kan kültürü kontaminasyon oranlarının belirlenmesi, hastane ve toplum kökenli enfeksiyonların epidemiyolojik, klinik ve mikrobiyolojik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmada, gerçek bakteriyemi oranı %12.1 iken, kontaminasyon oranı %10.7 olarak bulunmuştur. Beş yüz altmış yedi enfeksiyon atağının %73.4'ü hastane kaynaklı iken %26.6 sı toplum kaynaklı olarak belirlenmiştir. Hastane kaynaklı enfeksiyonda en sık izole edilen mikroorganizmalar stafilokok (%44, metisin dirençli %69.4), enterokok (%15), *E. coli* (%12.5) iken, toplum kaynaklıda ise en sık *Brucella spp* (%21.9), *E.coli* (%19.2) ve *S. aureus* (%14.6, metisilin dirençli %9.1) izole edilmiştir. Mortalite oranları ise hastane kaynaklı enfeksiyonda %16.6 iken toplum kaynaklıda %13.9 olarak bildirilmiştir. Ölüme en sık neden olan mikroorganizma hastane kaynaklı enfeksiyonda *P.aeruginosa*, toplum kaynaklı enfeksiyonda ise *S.pneumoniae* olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kontaminasyon oranları çok yüksek olarak bulunmuştur. Bu nedenle dirençli bakterilerin de yayılmasını önlemek için enfeksiyon kontrol çalışmalarına önem verilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (66).

Sepsise neden olan etiyolojik etkenlerin tanımlanmaları için doğru tanısal testler önemlidir. Kan kültürü sistemleri klinisyenler için en önemli tanı ve doğrulama yöntemidir (65,66). Ancak kan kültür sistemlerinin duyarlılığı istenen seviyede değildir. Son yıllarda sepsis tanılı değişik hasta gruplarında yapılmış olan çalışmalarda kan kültürü pozitifliğinin %50'yi pek aşmadığı bildirilmiştir (46,47, 68–70).

Kan kültürü için gerekli kan volümünü özellikle yoğun bakım hastalarında ve pediatrik yaş grubunda her zaman elde etmek mümkün olmamaktadır. Bu durum beklenildiği gibi kan kültürünün duyarlılığını daha da düşürmektedir (71). Günümüzdeki kan kültür sistemlerinin en önemli dezavantajlarından biri de sonuçların yeterince hızlı alınamamasıdır. Kültür şişesinde üremenin olduğunu işaret eden pozitif sinyalin alınması birkaç gün sürebilmekte ve daha sonrasında mikroorganizmanın tanımlanmasına yönelik işlemler nedeniyle de bu sürece birkaç gün daha eklenmektedir. Bu durum da her bir saatin yaşamsal öneme sahip olduğu sepsis hastalarında yeterince hızlı tedavi düzenlenmesi yapılamamasına, dolayısıyla prognozun kötüleşmesine yol açabilmektedir (72,73).

Erken tanı konarak tedaviye başlanmasının mortalite oranlarını önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir (72,73). Kumar ve ark.(74) septik şok vakalarında tanıda her bir saatlik gecikme sonucunda oluşan hipotansiyon ile tedavi başarısının % 8 azaldığını bildirmişlerdir. Tanı ve prognoz arasındaki dikkat çekici bu korelasyondan dolayı, hızlı sonuca varmayı sağlayan yeni tanı yöntemleri kullanıma girmiştir.

Yeni tanısal teknolojiler kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan patojenleri kan kültüründen kısa sürede tespit etmek için geliştirilmiştir. Bunlar Fluorescent *in situ* hybridization (FISH), Polymerase chain reaction (PCR), MALDI-TOF mass spectrometry (MS), Microarray ve Sekans analizi yöntemleri olarak sayılabilir. Araştırmalar bu teknolojiler kullanılarak sağlık giderlerinin düştüğünü ve doğru antimikrobiyal tedavi kullanımının arttığını göstermektedir (75).

Çalışmamızda; direkt olarak kan örneğinden, ortalama 2.5 saatte, sepsis ile ilişkili önemli bakteri türlerinin DNA'sını saptayabilen, mikroarray temelli yöntemi (Verigene® System Bloodstream Infection Tests Nanosphere, Inc. Northbrook, IL, USA ) ( Gram-pozitif ve Gram-negatif ) test ettik.

Mikroarray tabanlı uygulamaların klinik kullanımındaki etkisi araştırma alanındaki uygulamalara göre giderek artmaktadır. Teknolojik gelişmeler iş akışlarını basitleştirerek ve sonuçlanma sürelerini kısaltarak mikroarray uygulamalarını klinik kullanımda daha pratik hale getiriyor. Kan dolaşımı enfeksiyonlarında kan kültüründe patojen bakterileri belirlemek için son zamanlarda geliştirilmiştir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler ve antibiyotik direnç belirteçleri için tasarlanmış mikro-dizi-bazlı *in vitro* tanısal testlerdir. Beş dakikadan daha kısa bir sürede çalışmaya hazır hale getirilen otomatize sistemlerdir (75).

Verigene Gram-pozitif kan kültürü ( BC-GP ) testinin performansını pediatrik hastalarda değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada BC-GP testinin uyumu % 95.8 olarak bildirilmiştir. Organizmanın tanımlanması ve direnç tespiti için gerekli sürenin rutin yöntemlere göre önemli ölçüde azaldığı görülmüş ve BC-GP 'nin son derece hassas ve mikrobiyoloji laboratuvarında rutin iş akışına entegre edilebilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir (76).

Verigene Gram-pozitif kan kültürü ( BC-GP ) testinin bakteriyemik hastalardaki tanısalsal performansını değerlendirmek için yapılan diğers bir çalışmada ise 118 kan kültürü sonucu ileriye dönük olarak incelenmiş. Altı mikroorganizma dışında diğerslerinin test paneli içinde olduğu (%95.6) görülmüş. Patojenlerin tespiti ve mecA geninin belirlenmesinin rutin yöntemlerle uyumu sırasıyla %87.6 ve %97.7 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, BC-GP testinin aynı anda birden fazla etkeni hızlı ve doğru şekilde tanımlayabilmesinin hasta yönetimi ve sağlık maliyeti üzerine etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır (77).

Dodémont ve ark. (78) Verigene Gram-negatif kan kültürü ( BC-GN ) testinin tanısalsal performansını değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada, patojenlerin tespiti ve direnç genlerinin belirlenmesinin rutin yöntemlerle uyumunu sırasıyla %97.4 ve %92.3 olarak bildirmişlerdir.

Alby ve ark. (79) yaptığı çalışmada pozitif kan kültürlerinden Verigene Gram-pozitif kan kültürü ( BC-GP ) testi ile tespit edilen streptokoklar ve enterokoklar için tedavi algoritması geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kültür testinin genel uyumu % 89.7 olarak bulunmuş ve tedavi algoritmasını belirlemek için yeterli kabul edilmiştir. Verigene sisteminin tanısalsal performansını değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmalarda kan kültürü ile mikroarray arasındaki uyumun % 87.6 – 97.4 arasında değişmekte olduğu görülmektedir (77–79).

Çalışmamızda; sepsis atağı sırasında laboratuvara gönderilen kan kültürlerinde Verigene sistemi ile patojenlerin tespiti ve direnç genlerinin belirlenmesinin rutin yöntemlerle uyumu sırasıyla %96 ve %96.6 olarak bulundu. Rutin yöntemlerle *Stapylococcus epidermidis* izole edilen ve metisilin dirençli olarak değerlendirilen bir kan kültüründe mikroarray yöntemi ile mecA direnç geni gösterilemedi. Diğers bir kan kültüründe ise rutinde izole edilen *Escherichia coli* karbapenem dirençli olarak değerlendirilirken, mikroarray yöntemi ile CTX-M direnç geni pozitif (ESBL) olarak gösterildi.

Pozitif kan kültürlerinde organizmanın tespiti ve antibiyotik duyarlılık durumunun raporlanmasını hızlandırarak klinik sonuçların geliştirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, 242 kan kültüründen 249 Gram-pozitif bakteri izole edilmiş. BC-GP ile *S. aureus*, metisiline duyarlı *S. aureus* ve metisilin dirençli *S. aureus* sırasıyla % 100, % 99 ve % 100 hassasiyetle; ve % 100, % 100 ve % 99.5 özgülük ile tespit edilmiş. *S.*

*epidermidis*, metisiline duyarlı *S. epidermidis* ve metisiline dirençli *S. epidermidis* sırasıyla %95 , % 80 ve % 96 hassasiyetle ve % 100 özgüllük ile tespit edilmiş. Kırk yedi *E. faecalis* ve *E. faecium* bakteriyemisini (14/15 olgu) , dokuz *S. pneumoniae* olgusunu doğru şekilde belirlemiştir. BC-GP beş *S. mitis / oralis*, bir *Streptococcus anginosus* grup olan kan kültürlerinde *S. pneumoniae* olarak sonuç vermiş. Yanlış pozitif *S. pneumoniae* sonuçları ‘*Streptococcus spp.*’ olarak raporlanabilir şekilde değerlendirilmiştir. BC-GP’ nin mikroorganizmaları, mecA, vanA ve vanB genlerini hızlı ve doğru tespit edebilmesinin klinik kararları hızlandırmada yardımcı olacağı sonucuna varılmıştır (80).

Toplam 102 pozitif kan kültürünün test edildiği bir başka çalışmada, BC-GN testi ile panel içindeki izolatların %97.9’ unun doğru şekilde tanımlandığı ve izolatların %29.8’inde CTX-M, KMG, VIM ve OXA direnç genleri içerdiği tespit edilmiş, pozitif prediktif değer *Enterobacteriaceae* için %95.8, *Pseudomonas aeruginosa* için %100 olarak bulunmuş. Negatif prediktif değer ise sırasıyla %100 ve %78.6 olarak bulunmuştur (81).

Çok merkezli pediatri ünitelerinde yapılmış bir çalışmada Verigene BC-GN testinin 9 cins/tür ve 6 antibiyotik direnç geni paneli direk pozitif kan kültüründen değerlendirilmiştir. Vitek MS (bioMérieux, Durham, NC) altın standart organizma identifikasyonu için kullanılmıştır. Kontrol MDR CT-102 mikroarray ( Points BV, Wageningen, Hollanda Kontrol ) direnç belirleyicilerini tespit etmek için alternatif bir yöntem olarak kullanılmıştır. Toplamda 97 kan kültüründen 104 organizma izole edilmiştir. Kontrol mikroarrayde gösterilemeyen 8/13 kan kültürü BC-GN testi ile negatif olarak tanımlanmıştır, BC-GN testi ile tespit edilemeyen 3/5 kan kültüründe birden fazla Gram-negatif mikroorganizma gösterilmiştir. Tüm 6 sonuç kontrol MDR CT-102 mikroarray testleri ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak BC-GN testi Gram-negatif bakteriler ile enfekte pediatrik hastalarda tedavi kararı vermeyi hızlandırmak için bir potansiyele sahiptir, hassasiyet tatmin edicidir ama karışık Gram-negatif kan kültürlerinde eksik sonuçlar olabilir şeklinde yorumlanmıştır (82).

Çalışmamızda; üç kan kültürü örneğinde rutin yöntemlerle mikroarray arasında farklı sonuçlar elde edildi. Bir örnekte Verigene Gram-negatif kan kültürü (BC-GN) testi ile *E.coli* tespit edilirken rutin yöntemle *E.coli*+ *K.pneumoniae* olarak belirlendi. İkinci örnekte BC-GN testi ile *E.coli*+ *K.oxytoca*+ *Enterobacter spp.* tespit edilirken rutin yöntemle *Enterobacter spp.* bulunamadı. Üçüncü örnekte ise BC-GN testi ile *E.faecalis* + *E.faecium* tespit edilirken rutin yöntemle bu sonuç *E. faecalis* olarak belirlendi.

Hill ve ark. (83) Verigene Gram-negatif kan kültürü (BC-GN) testi ile pozitif kan kültürlerinden 51 Gram-negatif basil ve 14 karbapenemaz enzimi belirlendiğini bildirmişlerdir. Test ile organizmanın tanımlanması rutin yöntemlere kıyasla ortalama 24 saat daha hızlı sonuçlanmıştır. Hastaların %31.8'inde klinik yönetimin ortalama 33 saat daha erken düzenlenebileceği belirlenmiştir. BC-GN testinin, bakteriyemisi olan hastalarda acil klinik kararlar verebilmek için olanak sağlayan doğru ve hızlı bir test olduğu sonucuna varılmıştır.

Verigene Gram-negatif kan kültürü (BC-GN) testinin performansını değerlendiren bir başka çalışmada; pozitif kan kültüründen hızlı tanımlama yapabilen, multipleks bazlı otomatize bir yöntem olduğu ve örnek başına 5 dakikası manuel olmak üzere toplam 2 saat çalışma süresi olduğu vurgulanmıştır. BC-GN testi ile rutin laboratuvar yöntemleri karşılaştırıldığında elde edilen veriler, Gram-negatif basillerin ve önemli antimikrobiyal direnç genlerinin erken tespitinin hasta yönetiminde etkili olduğunu göstermiştir (84).

Samuel ve ark. (85) yaptıkları çalışmada 203 hastadan pozitif kan kültürlerinde stafilokok, streptokok, enterokok türlerini içeren 12 farklı bakteriyi ve üç önemli direnç genini Verigene Gram-pozitif kan kültürü (BC-GP) testi ile incelemişler. Sonuçları tanımlama ve antibiyotik duyarlılığı açısından rutin yöntemlerle karşılaştırmışlar. Yüz yetmiş sekiz monomikrobiyal örnekte uyum sırasıyla %94 ve %97 iken, 25 polimikrobiyal örnekte uyum sırasıyla %92 ve %96 olarak bulunmuş. BC-GP testinin doğrudan pozitif kan kültürlerinden rutin yöntemlere göre en az 24-48 saat önce, hızlı tanımlama ve direnç saptama yeteneğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Gram-pozitif bakterileri ve direnç genlerini Verigene Gram-pozitif kan kültürü ( BC-GP ) testi ile hızlı şekilde belirleyebilmek amacıyla yapılmış benzer bir başka çalışmada da 186 pozitif kan kültürü incelenmiş. Sonuçlar tanımlama ve antibiyotik duyarlılığı açısından rutin yöntemlerle karşılaştırılmış. Uyumsuz sonuçlar ek bir biyokimyasal testle, sefoksitin disk yöntemi ile teyit edilmiş, BC-GP testi tekrarlanmış. Başlangıçta BC-GP testi ile tanımlanan bakteriler %94.6 rutin yöntem sonuçları ile uyumlu bulunmuş. BC-GP testi ile bakterilerin tanımlanması işleminin 31–42 saat, duyarlılık sonuçlarının 41–50 saat daha erken olabileceği gösterilmiştir (86).

Gram-pozitif bakteriler içeren pozitif kan kültür sıvılarında doğrudan 12 Gram-pozitif bakteri ve 3 direnç genini tespit eden Verigene Gram-pozitif kan kültürü ( BC-GP ) testinin tanısal doğruluğunu (duyarlılık ve özgüllük) değerlendirmek amacıyla çok merkezli bir çalışma yapılmış. Gram-pozitif bakteri içeren 1.252 kan kültürü Nisan 2011 ve Ocak 2012 tarihleri arasında beş klinik merkezde test edilmek üzere toplanmış. BC-GP testi ile belirlenen 12 cins veya tür hedef bölgeleri için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %92.6 - %100 ve %95.4 - %100 arasında bulunmuştur. *S. aureus* veya *S. epidermidis* içeren 599 kan kültüründe *mecA* geninin tanımlanmasında duyarlılık ve özgüllük sırasıyla sefoksitin diski yöntemine göre %98.6, % 94.3 olarak bulunmuş. *E. faecium* ve *E. faecalis* içeren 81 kan kültüründe *vanA* geninin tanımlanması %100 duyarlı ve özgül olarak bulunmuş. Tek Gram-pozitif bakteri içeren kan kültürlerinin yaklaşık %7.5'inin (87 /1.157) BC-GP test panelinin içinde olmadığı görülmüş. Ve birden çok bakteri içeren 95 kan kültüründe BC-GP testi sonuçları kültür sonuçları ile %71.6 ( 68 /95 ) oranında uyumlu olarak bulunmuş. Yüz yedi ayrı kan kültürünün retrospektif analizinde, BC-GP testi kullanılarak metisiline dirençli *S. aureus* ve vankomisine dirençli *Enterococcus spp.* 'nin tanımlanmasının rutin kültür yöntemler ile karşılaştırıldığında ortalama 41.8 – 42.4 saat önce tamamlandığı gösterilmiştir. BC-GP testi birden fazla *Staphylococcus* içeren kültürlerde belirli bir bakteri için *mecA* genini tespit etme konusunda ve *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* gibi yaygın kontaminantları belirleme konusunda başarısız bulunmuştur. BC-GP testinin Gram-pozitif bakterilerin kan dolaşımı enfeksiyonlarında metisilin ve vankomisin direncini doğrudan kan kültürü ile tespit edebilen multipleks bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (87).



Verigene Gram-pozitif kan kültürü ( BC-GP ) testi ile 148 kan kültürünün incelenmesi amacıyla yapılmış bir çalışmada; sonuçlar konvansiyonel biyokimyasal testlerle ve matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight ( MALDI-TOF) yöntemi ile karşılaştırılmış. Kültür sonuçları ile genel uyum % 95 olarak bulunmuş. Verigene BC-GP testi ile hastalar için uygun antibiyotik seçiminin ortalama 42 saat önce belirlenebileceği gösterilmiş. Ve bu test ile MRSA veya VRE olan hastalar için ortalama 37 saat önce izolasyon önlemlerinin alınabileceği bildirilmiştir (88).

Doğrudan pozitif kan kültürlerinden hızlı şekilde organizmaları tanımlamak için üç ticari yöntemin [QuickFISH (AdvanDx, Woburn, MA), Verigene Gram-pozitif kan kültürü (BC-GP Nanosphere, Northbrook, IL) ve MALDI-TOF MS ( Bruker Daltonics, Billerica, MA )] performansını değerlendirmek amacıyla yapılmış bir başka çalışmada her üç yöntemin de sık karşılaşılan patojenler için uygun ve doğru yöntemler olduğu ayrıca tedavi sürelerini azaltma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır (89).

Pozitif kan kültürlerinde doğrudan çalışılabilen, organizmanın tanımlanması ve direnç profilinin belirlenmesi işlemlerini çok kısa sürede gerçekleştirebilen iki farklı moleküler yöntem [Verigene® System Bloodstream Infection Tests ( Nanosphere, Inc., Northbrook, IL, USA ) ( Gram-pozitif ve Gram-negatif ) ve FilmArray® Blood Culture Identification Panel ( BioFire® Diagnostics, Inc., Salt Lake City, UT, USA )] karşılaştırılmış. Yapılan bu çalışmalarda her iki panelin de geleneksel yöntemlere göre anlamlı olarak hızlı ve güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır (90, 91).

Çalışmamızda, üremelerin olduğu kan kültürlerinde pozitif sinyal verme süresi ortalama 32.6 saatte gerçekleşti. Kan kültürü ile pozitif sinyal alındıktan sonra Gram boyama, katı besiyerine pasaj yapma, üreyen mikroorganizmayı biyokimyasal metotlar ile tanımlama işlemleri için de ek süreler gerekmektedir. Laboratuvar rutinimizde, kan kültürü sistemi ile örnek alımından sonra bakteriyel tanımlama işlemi sonuçlanana kadar geçen süre ortalama 60.0 saat olarak hesaplandı. Mikroarray yöntemi ile bakterilerin tanımlanma süresi örneğin cihaza yüklenmesi de dahil ortalama 2.5 saat sürdü. Mikroarray yöntemi ile rutin kan kültürü yöntemleri sonuçlanma süreleri ortalamaları bakımından karşılaştırıldığında, iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü.

Verigene testlerinin rutin kan kültürü yöntemleri karşısındaki en önemli avantajı önemli antibiyotik direnç genlerini tespit edebiliyor olmasıdır. Bu özelliği ile ampirik antibiyotik tedavisinin yeniden düzenlenmesi, hedefe yönelik tedavinin başlanması konusunda etkin rol oynamaktadır (80, 83, 84, 87).

Rutin kan kültürü yöntemleri ile antibiyotik duyarlılık testlerinin çalışılması, dolayısıyla hedefe yönelik antibiyotik tedavisinin başlanması uzun zaman almaktadır. Yapılan bir çalışmada septik hastaların en az %10'unda geniş spektrumlu ampirik antibiyotik tedavisine rağmen sorumlu olduğu iddia edilen mikroorganizmayı etkileyen antibiyotik kullanılmadığı gösterilmiştir (92).

Her ne kadar kültür dışı yaklaşımların ampirik antibiyotik tedavisinin ilk dozunu erteletecek kadar hızlı olmamasına rağmen, antibiyotik tedavisinin tekrar düzenlenme süresini büyük oranda kısaltabileceği, dolayısı ile dirençli patojenlerin gelişimini, hastanede kalış süresini ve ek masrafları azaltabileceği bildirilmiştir (78, 93).

Bu nedenle Verigene Gram-pozitif ( BC-GP ) ve Gram-negatif ( BC-GN ) kan kültürü testleri ile yapılmış olan birçok çalışmada bu testlerin sepsis ataklarında tedaviye etkisi değerlendirilmiş ve rutin yöntemlere oranla çok kısa sürede sonuç verdiği gösterilmiştir (83–86). Hızlı sonuç veren mikroarray yöntemi ile sepsis olgularında uygunsuz tedavinin azaltılabileceği görülmüştür.

## 6. SONUÇLAR

Çalışmaya dahil edilen 52 hastanın kan kültürü örneklerinde Verigene Gram-negatif kan kültürü testi ( BC-GN ) ve Gram-pozitif kan kültürü testleriyle ( BC-GP ) ortalama 2.5 saat gibi kısa bir sürede önemli patojenler ve direnç genleri çalışıldı. Mikroarray tabanlı bu yöntemle bulunan sonuçlar, rutin sonuçlarla karşılaştırıldığında yüksek oranda uyumlu bulundu.

Verigene kan kültürü sistemleri, 7 gün 24 saat hizmet veren mikrobiyoloji laboratuvarlarında rahatlıkla kullanılabilir. İş yükü daha az olduğundan personel sıkıntısı daha az olacaktır, ayrıca klinisyene daha kısa sürede sonuç verebilecektir. Rutinde bu sistemin kullanımının önündeki en büyük engel yüksek maliyeti olarak görülmektedir.

Çalışmamız tek merkezli ve nispeten az sayıda hasta ile yapıldığından dolayı sonuçları genelleştiremeyebiliriz ancak ülkemizde erişkin ve pediatrik hastalar üzerinde yapılan ilk çalışmalardan biri olduğu için gelecekte yapılacak araştırmalar için fikir verebileceği kanaatindeyiz.

Orta ve uzun vadede antibiyotik kullanımının azaltılması, yatış süresinin kısalması gibi getirebileceği potansiyel faydaları düşündüğümüzde, özellikle yoğun bakımlar, hematoloji, onkoloji gibi sepsisin ve antibiyotik kullanımının yaygın olduğu bölümlerde sepsis ataklarında kan kültürüne ek olarak Verigene sisteminin kullanılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Davies MG, Hagen PO. Systemic Inflammatory Response Syndrome. Br J Surg 1997; 84: 920–35.
2. Doğanay M. Nozokomiyal sepsis: önemi ve tanımlar. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 1998; 2: 179–81.
3. Doğanay M, Alp Meşe E. Sepsis. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında, 3.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.877–97.
4. Bone RC. Pathophysiology of sepsis. Ann Intern Med 1991; 115(6): 457–69
5. Bahar M. Sepsis patofizyolojisi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi 2006; 51: 11–15
6. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. Chest 1992;101:1644–55.
7. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med 2003; 29: 530–8.
8. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med 2013 Feb; 41(2): 580–637
9. Akalın H. Sepsis: Tanımlar, Tanı, Etyoloji ve Epidemiyolojide Yeni Gelişmeler. Klimik dergisi 2007; 20: 7,8

10. Akalın H. Sepsis Sendromu. Dündar İH.(çeviri editörü). Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi kitabında. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2004.231–9.
11. Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin* 2000; 16(2): 179–92.
12. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348(16): 1546–54
13. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European Intensive Care Units: Results of the SOAP Study. *Crit Care Med* 2006; 34: 344–53.
14. Akalın H. Yoğun Bakım Ünitesi İnfeksiyonları: Risk Faktörleri ve Epidemiyoloji. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2001; 5: 5–16.
15. Yosunkaya A, Tuncer S, Reisli R, Uzun S, Ökesli S. Reanimasyon Ünitelerimizde 1999-2000 Yılları Arasında Gözlenen Hastane İnfeksiyonları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2002; 6: 92–7.
16. Çetin ÇB, Turgut H, Kaleli İ, Yalçın AN, Orhan N. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesinde Nozokomiyal İnfeksiyonlar. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2002; 6: 98–101.
17. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991;115:457.
18. Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, Rivers K. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *CMAJ*. 2005; 173: 1054–65.
19. Robert S. Munford. Sepsis ve septik sok. *Harrison's Principles of Internal medicine* 15. baskı 2004; 799–804.
20. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Br Med J* 2003; 326: 262–6
21. Shanley TP, Hallstrom C, Wong HR. Sepsis. In: Fuhrman BP, Zimmerman JJ (eds): *Pediatric Critical Care* (3rd ed) Philadelphia: Mosby, 2006; 1474–93.
22. Cengiz AB. Sepsis Patogenezi. *Çocuk Enf Derg* 1: Özel Sayı 1; 2007; 63–5

23. Aygen B, Inan M, Doganay M, Kelestimur F. Adrenal functions in patients with sepsis. *Exp Clin Endocrinol Diab* 1997; 105: 182.
24. Kansu E. Sepsis fizyopatolojisinde güncel kavramlar. Köksal, Çakar N, Arman D (editörler). *Yoğun Bakım enfeksiyonları*, 1. baskı. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2005; 369–79.
25. Uzun O, Akalin HE, Hayran M, Unal S. Factors influencing prognosis in bacteremia due to gram negative organisms: evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital. *Clin Infect Dis* 1992; 15(5): 866–73
26. Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med* 1994; 154(1): 26–34
27. Baer SL, Pappas PG. Hematogenously disseminated fungal infections. In: Anaissie JE, Mcginnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical Mycology*. 2nd edition. London, UK: Churchill Livingstone Elsevier 2009;609–22
28. Mermel LA. Prevention of intravascular catheter- related infections *Ann Intern Med* 2000; 132 (5): 391–402.
29. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infection. *Am J Infect Control* 1988; 16 (3): 128–40.
30. Lynn WA. Sepsis. In: Armstrong D, Cohen J, editors. *Infectious Diseases*. 1 nd edition. London: Mosby; 1999.p.1–14
31. Young LS. Sepsis syndrome. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2nd edition. New York: Churchill Livingstone; 1995.p.690–705
32. Harris RL, Musher DM, Bloom K. Manifestation of sepsis. *Arch Intern Med* 1987;147(11): 1895–906
33. Martin MA, Silverman HJ. Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1213–28
34. Munford RS. Sepsis, severe sepsis and septic shock. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia 2005; pp: 906–27.

35. Aube H, Milan C, Blettery B. Risk factors septic shock in the early management of bacteremia. *Am J Med.* 1992; 93: 283.
36. Levi M, Cate HT. Disseminated intravascular coagulation. *N Eng J Med* 1999; 341:586.
37. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. *Chest* 1992; 101: 816–22.
38. Marik PE. Definition of sepsis: Not quite time to dump SIRS. *Crit Care Med* 2002; 30: 706–7.
39. Reny JL, Vuagnat A, Ract C, et al. Diagnosis and Follow-up of Infections in Intensive Care Patients: Value of C-Reactive Protein Compared with Other Clinical and Biological Variables. *Crit Care Med* 2002; 30: 529–35.
40. Mitaka C. Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clinica Chimica Acta* 2005; 351(1–2): 17–29
41. Chiesa C, Panero A, Rossi N. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 664–72
42. Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 206–17
43. Sümerkan B. Nozokomiyal sepsis: etyoloji ve mikrobiyolojik tanısı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1998; 2: 182–7.
44. Hall KK, Lyman JA. Updated Review of Blood Culture Contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 788–802.
45. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32(11): 466–94
46. Serody JS, Berrey MM, Albritton K, et al. Utility of Obtaining Blood Cultures in Febrile Neutropenic Patients Undergoing Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 533–8.

47. Previsdomini M, Gini M, Cerutti B, Dolina M, et al. Predictors of Positive Blood Cultures in Critically Ill Patients: A Retrospective Evaluation. *Croat Med J.* 2012; 53: 30–9.
48. Mauroa MV, Cavalcantia P, Peruginia D, et al. Diagnostic Utility of LightCycler SeptiFast and Procalcitonin Assays in the Diagnosis of Bloodstream Infection in Immunocompromised patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73: 308–11.
49. Connell TG, M. Rele, D. Cowley, et al. How reliable is a Negative Blood Culture Result? Volume of Blood Submitted for Culture in Routine Practice in a Children’s Hospital. *Pediatrics* 2007; 119: 891–6.
50. Standards Unit, Health Protection Agency. Investigation of Blood Cultures (For Organisms Other than Mycobacterium Species). 2012; 6: 1–35.
51. Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(12): 751–60.
52. Hasdemir MU. Antimikrobiyal direncin belirlenmesinde moleküler yöntemler. *ANKEM Dergisi* 2014;28(Ek 2):229–34
53. Eser Ö. Moleküler tanı testlerinin direnç tayininde kullanımı: Gram negatif bakteriler için hızlı moleküler tanı yöntemleri *ANKEM Dergisi* 2012;26(Ek 2):86–91
54. Samuel LP, Tibbetts RJ, Agotesku A, Fey M, Hensley R, Meler FA. Evaluation of a Microarray-Based Assay for Rapid Identification of Gram-Positive Organisms and Resistance Markers in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1188–92
55. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *Chest* 2000;118:146–55.
56. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, et al. Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy and its Effect on Survival in a Clinical Trial of Immunomodulating Therapy for Severe Sepsis. *Am J Med*2003;115:529–35.



57. Pirson M, Dramaix M, Struelens M, Riley TV, Leclercq P. Cost associated with hospital-acquired bacteraemia in a Belgian hospital. *J Host Infect* 2005; 59(1): 33–40.
58. Magadia RR, Weinstein MP. Laboratory diagnosis of bacteremia and fungemia. *Infect Dis Clin North America* 2001; 15: 1009–24.
59. Durmaz G, Tercan U, Aydın A, Kiremitçi A, Kiraz N, AkgünY. Optimum detection times for bacteria and yeast species with the BACTEC 9120 Aerobic Blood Culture System: Evaluation for a 5-year period in a Turkish University Hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2): 819–21.
60. Yüce P, Demirdağ K, Kalkan A, Özden M, Denk A, Kılıç SS. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi* 2005; 19: 17–21.
61. Duman Y, Kuzucu Ç, Çuğlan SS. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Erciyes tıp dergisi* 2011; 33(3): 189–96
62. Kaya S, Arıdoğan CB, Çetin H, Demirci M. Çocuk hastalardan alınan kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik dirençleri. *Fırat Tıp Dergisi* 2007; 12: 34–6.
63. Mehli M, Gayyurhan ED, Zer Y, Akgün S, Özgür Akın FE, Balcı İ. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* 2007; 21(3): 141–5.
64. Willke A, Azak E. Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları: üç yıllık sonuçlar. *ANKEM Dergisi* 2011; 25 (Ek1): 1.
65. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals three year analysis. *Clin Infect Dis* 1999; 29 (2): 239–44.
66. Esel D, Doğanay M, Alp E, Sümerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. *Departments of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Erciyes University Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1038–44

67. Mylotte JM, Tayara A. Blood cultures: Clinical Aspects and Controversies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 157–63.
68. Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, et al. Diagnostic Performance of a Multiple Real-Time PCR Assay in Patients with Suspected Sepsis Hospitalized in an Internal Medicine Ward. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1285–8.
69. Mancini N, Clerici D, Diotti R, et al. Molecular Diagnosis of Sepsis in Neutropenic Patients with Haematological Malignancies. *J Med Microbiol* 2008; 57: 601–4.
70. Lodes U, Bohmeier B, Lippert H, König B, Meyer F. PCR-Based Rapid Sepsis Diagnosis Effectively Guides Clinical Treatment in Patients with New Onset of SIRS. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397: 447–55.
71. Bloos F, Hinder F, Becker K, et al. A Multicenter Trial to Compare Blood Culture with Polymerase Chain Reaction in Severe Human Sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36: 241–7.
72. Bauer M, Reinhart K. Molecular Diagnostics of Sepsis - Where are We Today? *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 411–3.
73. Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M. Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis. *Clin Chem* 2004; 50: 1301–14.
74. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589–96.
75. Rapid methods for pathogen detection in bloodstream infection By Andrew Hemmert, PhD, and Nick Garrone, PhD, *Medical Laboratory Observer* – June 2013
76. Mestas J, Polanco CM, Felsenstein S, Bard JD. Performance of the Verigene Gram-Positive Blood Culture Assay for Direct Detection of Gram-Positive Organisms and Resistance Markers in a Pediatric Hospital. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 283–87

77. Dodémont M, Mendonça RD, Nonhoff C, Roisin S, Denis O. Evaluation of Verigene Gram-positive blood culture assay performance for bacteremic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 473–7
78. Dodémont M, Mendonça RD, Nonhoff C, Roisin S, Denis O. Performance of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Assay for Rapid Detection of Bacteria and Resistance Determinants. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3085–7
79. Alby K, Daniels LM, Weber DJ, Miller MB. Development of a Treatment Algorithm for Streptococci and Enterococci from Positive Blood Cultures Identified with the Verigene Gram-Positive Blood Culture Assay. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3869–71
80. Sullivan KV, Turner NN, Roundtree SS, et al. Rapid Detection of Gram-Positive Organisms Using the Verigene Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test and the BacT/ALERT Pediatric FAN System in a Multi-Centered Pediatric Evaluation. *J Clin Microbiol* 2013;doi: 10.1128/JCM.01224–13
81. Mancini N, Infurnari L, Ghidoli N, et al. Potential Impact of a Microarray-Based Nucleic Acid Assay for Rapid Detection of Gram-Negative Bacteria and Resistance Markers in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1242–5
82. Sullivan KV, Turner NN, Roundtree SS, Ventrola CA, Blecker-Shelly DL, Mortensen JE. Pediatric Multicenter Evaluation of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Test for Rapid Detection of Inpatient Bacteremia Involving Gram-Negative Organisms, Extended-Spectrum Beta-Lactamases, and Carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 2416–21
83. Hill JT, Tran KD, Barton KL, Labreche MJ, Sharp SE. Evaluation of the Nanosphere Verigene BC-GN Assay for Direct Identification of Gram-Negative Bacilli and Antibiotic Resistance Markers from Positive Blood Cultures and Potential Impact for More-Rapid Antibiotic Interventions. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3805–7

84. Tojo M, Fujita T, Ainoda Y, et al. Evaluation of an Automated Rapid Diagnostic Assay for Detection of Gram-Negative Bacteria and Their Drug-Resistance Genes in Positive Blood Cultures. *PLoS One* 2014; 0094064 4;9(4):e94064
85. Samuel LP, Tibbetts RJ, Agotesku A, Fey M, Hensley R, Meier FA. Evaluation of a Microarray-Based Assay for Rapid Identification of Gram-Positive Organisms and Resistance Markers in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1188–92
86. Wojewoda CM, Sercia L, Navas M, et al. Evaluation of the Verigene Gram-Positive Blood Culture Nucleic Acid Test for Rapid Detection of Bacteria and Resistance Determinants. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2072–6
87. Buchan BW, Ginocchio CC, Manii R, et al. Multiplex Identification of Gram-Positive Bacteria and Resistance Determinants Directly from Positive Blood Culture Broths: Evaluation of an Automated Microarray- Based Nucleic Acid Test. *PLoS One* 2013; 10; e1001478
88. Beal SG, Ciurca J, Smith G, et al. Evaluation of the Nanosphere Verigene Gram-Positive Blood Culture Assay with the VersaTREK Blood Culture System and Assessment of Possible Impact on Selected Patients. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3988–92
89. Martinez RM, Bauerle ER, Fang FC, Butler-Wu SM. Evaluation of Three Rapid Diagnostic Methods for Direct Identification of Microorganisms in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 2521–9
90. Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Evaluation of FilmArray and Verigene Systems for Rapid Identification of Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2014; 52; 3433–6
91. Ward C, Stocker K, Begum J, Wade P, Ebrahimsa U, Goldenberg SD. Performance evaluation of the Verigene® (Nanosphere) and FilmArray® (BioFire®) molecular assays for identification of causative organisms in bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 487–96

- 92.** MacArthur RD, Miller M, Albertson T, et al. Adequacy of Early Empiric Antibiotic Treatment and Survival in Severe Sepsis: Experience from the Monarchs Trial. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 284–8.
- 93.** Van Loon HJ, Vriens MR, Fluit AC, et al. Antibiotic rotation and development of gram-negative antibiotic resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:480–7.