



**T.C**

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SEPSİS TANISINDA KAN KÜLTÜRÜ ve  
MULTİPLEKS REAL TIME PCR'IN TANISAL PERFORMANSI**

**Dr. Fatih DİNÇ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Bursa-2013**



**T.C**

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SEPSİS TANISINDA KAN KÜLTÜRÜ ve  
MULTİPLEKS REAL TIME PCR'IN TANISAL PERFORMANSI**

**Dr. Fatih DİNÇ**

**Danışman: Prof. Dr. E. Halis AKALIN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Bursa-2013**

## İÇİNDEKİLER

<b>Türkçe Özet.....</b>	<b>ii</b>
<b>İngilizce Özet.....</b>	<b>iv</b>
<b>Giriş.....</b>	<b>1</b>
<b>Gereç ve Yöntem.....</b>	<b>25</b>
<b>Bulgular.....</b>	<b>40</b>
<b>Tartışma ve Sonuç.....</b>	<b>56</b>
<b>Kaynaklar.....</b>	<b>68</b>
<b>Teşekkür .....</b>	<b>74</b>
<b>Özgeçmiş .....</b>	<b>76</b>

## ÖZET

Sepsis, bir çok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden öldürücü bir enfeksiyon hastalığıdır. Kan kültürü duyarlılığının düşük olması nedeniyle sepsis şüpheli hastaların önemli bir kısmında etken izole edilememekte, bu durum tanı ve tedavi konusunda sorunlara yol açmaktadır.

Bu çalışmada amacımız kan kültürü sistemlerine göre daha hızlı ve daha duyarlı sonuçlar verdiği iddia edilen multipleks real time polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin (LightCycler™ SeptiFast) tanısal performansını ve tedaviye olası etkilerini değerlendirmektir.

Çalışmaya nozokomiyal sepsis tanısı alan 67 hastadan toplam 78 sepsis atağına ait örnek dahil edildi. Ateş ve herhangi bir sepsis bulgusu olmayan 22 erişkin ile kontrol grubu oluşturuldu. Sepsis tanısı alan 24'ü kadın(%36), 43'ü erkek(%64) erişkin hastada yaş ortalaması 55,7(21-95) idi.

Sepsis ataklarında kan kültürü ile etken mikroorganizmayı saptama oranı %32 olarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile etken mikroorganizmayı saptama oranı ise %44,9 olarak bulundu.

Kan kültürü ve PCR'ı birlikte değerlendirdiğimizde, 78 sepsis atağında toplam 65 mikroorganizma türü izole edildi. Bu türlerin 19 tanesi her iki yöntem ile aynı atakta izole edildi. Kan kültürü ile PCR'ın saptayamadığı 8'i etken, 4'ü kontaminasyon olarak değerlendirilen toplam 12 mikroorganizma türü, PCR ile ise kan kültürünün saptayamadığı 33'ü etken, biri kontaminasyon olarak değerlendirilen toplam 34 mikroorganizma türü saptandı.

Sepsis ataklarında kan kültürü ile PCR sonuçlarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda, iki yöntem arasında istatistiksel olarak orta derecede uyum olduğu görüldü(Kappa değeri: 0,445,  $p < 0,001$ ). Kan kültürü ve PCR tarafından saptanan mikroorganizma türlerini ele aldığımızda iki yöntem arasındaki uyumun istatistiksel olarak yeterli olmadığı belirlendi(Kappa değeri: 0,160,  $p = 0,07$ ).

Toplam 78 sepsis atağında PCR sonuçları nedeniyle retrospektif olarak değerlendirme yapıldığında tedavi değişikliği yapılabilecek 10 atak (%12,8) olduğuna karar verildi.

Yoğun bakım üniteleri gibi sepsis tanısının sık konulduğu ve antibiyotik kullanımının yaygın olduğu bölümlerde sepsis ataklarında kan kültürüne ek olarak SeptiFast yönteminin kullanılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Sepsis, multipleks real time PCR, kan kültürü.

## SUMMARY

### **Diagnostic Performance of Multiplex Real Time PCR and Blood Culture in Diagnosis of Sepsis**

Sepsis is a multisystem disease, typically leading to hemodynamic changes, shock, organ dysfunction and organ failure and can be life threatening. Causative microorganisms can not be isolated in the most of sepsis suspected patients because of the low sensitivity of blood culture. Therefore, it leads to problems in the diagnosis and treatment of disease.

The aim of this study is to evaluate the diagnostic performance and the possible effects over treatment of multiplex real time PCR(LightCycler SeptiFast) analysis which is suggested to be faster and more sensitive results incomparison to blood culture systems.

A total of 78 sepsis attacks from 67 patients with nosocomial sepsis and a control group of 22 adults without any signs of fever and sepsis were included in this study. Of 24 sepsis patients were female (36%) and 43 patients were male (64%) and the median patient age was 55.7 (21-95) years.

The rates of detecting microorganism in sepsis attacks by blood culture and PCR analysis were 32% and 44.9% respectively.

Total of 65 strains were isolated by both methods during 78 sepsis attacks. 19 of these strains were isolated by both blood culture and PCR analysis at the same sepsis attack. 8 of 12 strains considered as causative and 4 as contaminant, were isolated by blood culture, but not by PCR method. PCR analysis detected a total of 34 microorganisms, one of them was considered as contamination, which can not be isolated from blood culture.

There was moderate concordance between two methods' results during sepsis attacks statistically (kappa value: 0,445,  $p < 0,001$ ). According to

detected types of microorganisms, there was not sufficient concordance between the blood culture and PCR analysis (kappa value: 0,160, p=0,07).

Retrospective evaluation of all 78 sepsis attacks showed that in 10 (%12,8) of them, modification in treatment could be done.

As results of our data, it can be considered that SeptiFast method can be useful in addition to blood culture system in intensive care units where sepsis is often diagnosed and in the departments where antibiotics are used widely.

**Key words:** Sepsis, multiplex real time PCR, blood culture.

## GİRİŞ

Sepsis, bir çok sistemi tutan, özellikle hemodinamik değişikliklere yol açan, şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden öldürücü bir enfeksiyon hastalığıdır.

Sepsis tedavisinin esasını antimikrobiyal tedavi oluşturur. İdeal olanı kültür ve antibiyogram sonuçlarına göre antimikrobiyal ajan başlamaktır. Ancak kan kültürü duyarlılığının düşük olması nedeniyle sepsis şüpheli hastaların çoğunda etken izole edilememektedir. Etken izole edilse bile mikroorganizma identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri en erken 48 saatte sonuçlanabileceğinden başlangıç tedavisi ampirik olarak yapılmaktadır (1).

Septik hastaların en az % 10'unda geniş spektrumlu ampirik antibiyotik kullanılmasına rağmen, sorumlu olduğu iddia edilen mikroorganizmayı kapsayan antimikrobiyal tedavi verilememektedir (2).

Ampirik tedavi sonrası yapılacak tedavi düzenlemesi hasta sağlığı açısından son derece önemlidir. Ancak kullandığımız kültür sistemleri tedavi ayarlanmasında ortalama 1-2 günlük gecikmeye neden olmaktadır (3).

### Tanımlar

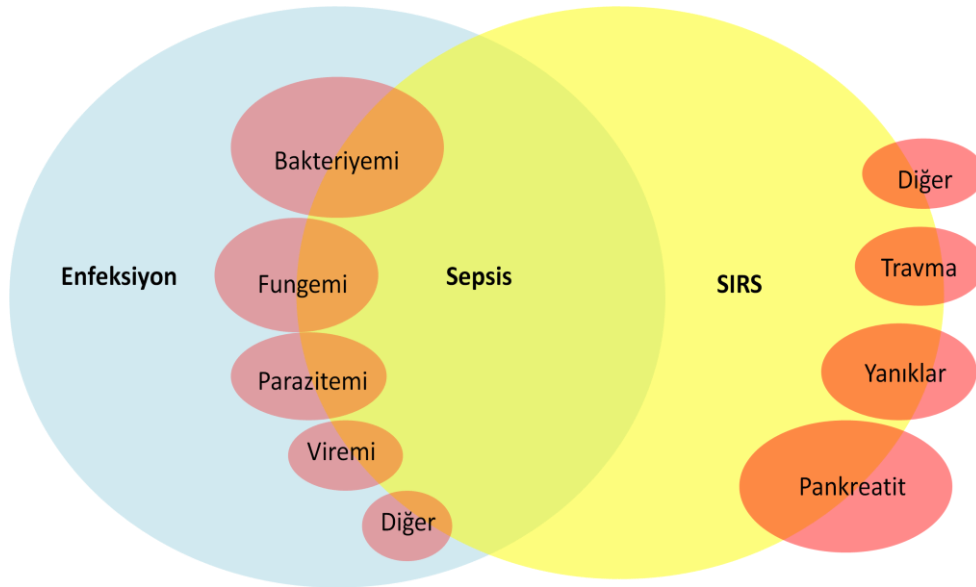
Geçmiş yıllarda sepsis ve sepsis ile ilgili klinik tabloların tanımlanmasında sepsis, septisemi, bakteriyemi, sepsis sendromu, endotoksemik şok ve septik şok gibi farklı terimler kullanılmıştır. Bu hastalığın tanımında farklı terimlerin kullanılması, yapılan araştırmalarda sepsis insidansı, prevalansı, ve tedavi sonuçlarının karşılaştırılmasında önemli farklılıklar doğurmuştur (4).

Kavram kargaşasını önlemek, ortak dil oluşturmak için American College of Chest Physicians ve Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM), 1991 yılında yaptıkları ortak bir toplantıda sepsis ve ilgili klinik tabloları gözden geçirmişlerdir (5).



Bu toplantıda sepsis tanımı, enfeksiyon tanımı ve sistemik enflamatuvar cevap sendromu (SIRS) tanımı getirilmiştir. Sepsiste enfeksiyonun şiddeti ise sepsis, ağır sepsis ve septik şok olarak kategorize edilmiştir. Septisemi, sepsis sendromu ve dirençli şok tanımlamalarının kafa karıştırıcı ve özgül olmamasından dolayı kullanılması önerilmemiştir (5).

ACCP/SCCM uzlaşısı konferans tanımları şu şekilde yapılmıştır (Şekil-1).



**Şekil-1:** 1992 ACCP/SCCM uzlaşısı konferans tanımları (5).

**Enfeksiyon:** Mikroorganizmaların, normalde steril konak dokularda bulunması veya dokulara invazyonu sonucu gelişen bir enflamatuvar cevaptır.

**Bakteriyemi:** Canlı bakterinin dolaşımda bulunmasıdır. Bakteriyemi tanısı kan kültür pozitifliği ile konur.

**Sistemik Enflamatuvar Cevap Sendromu (SIRS):** Enfeksiyöz olaylara karşı veya yanık, pankreatit gibi enfeksiyon dışı durumlarda vücudun oluşturduğu immün yanıtlar dizisidir. SIRS tanısı için aşağıdakilerden iki veya daha fazlasının hastada bulunması gerekir.

1. Vücut ısısının  $> 38^{\circ}\text{C}$  veya  $< 36^{\circ}\text{C}$  olması (ateş veya hipotermi),
2. Kalp atım hızının  $> 90/\text{dk}$  olması (taşikardi),

3. Solunum sayısının  $> 20/\text{dk}$  olması (taşipne) veya arteriyel karbondioksit basıncının ( $\text{PaCO}_2$ )  $< 32 \text{ mm/Hg}$  olması (hiperventilasyon),
4. Lökosit sayısının  $> 12000/\text{mm}^3$  (lökositoz) veya  $< 4000/\text{mm}^3$  (lökopeni) olması veya periferik yaymada  $> \%10$  bant formunun bulunması,

**Sepsis:** Enfeksiyona karşı oluşmuş sistemik enflamatuvar yanıttır. Enfeksiyon sonucu SIRS bulgularının iki veya daha fazlasının bulunması durumudur.

**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 aşağı düşmesidir.

**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.

ACCP/SCCM uzlaşısı konferansındaki (1992) tanımlar üzerinde de hala tartışmalar yapılmaktadır. Özellikle de yaygın enflamasyonu tanımlayan SIRS kavramı hastanede yatan pek çok hastada saptanan, enfeksiyon dışında bir çok nedenlere (pankreatit, yanık, travma gibi) bağlı olarak gelişebilen, dolayısıyla yeterince özgül olmayan bir tanımdır. Ağır sepsis ve septik şok tanımını yapmak da her zaman kolay olmamaktadır. Organ disfonksiyonunu saptamak bazı hastalarda zor olabilir; örneğin sedatize bir hastada santral sinir sistemi disfonksiyonu saptanamaz. Septik şok ise "yeterli sıvı tedavisine" rağmen hipotansiyonun devam etmesi olarak tanımlanmış, ancak burada yeterli sıvı tedavisinin ne kadar olduğu belirtilmemiştir. Ayrıca şok yeterli oksijenin sağlanamaması sonucu, kan

basıncı normal iken de gelişebilir; dolayısıyla şok tanımının sadece kan basıncına göre yapılması da doğru değildir (1).

Sepsis fizyopatolojisini daha iyi yansıtan tanımlara ihtiyaç olduğundan 2001 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 uluslar arası sepsis tanımları konferansı yapılmıştır (Tablo-1). Bu konferans sonucunda 1992 tanımları geçerli olmakla birlikte, özellikle klinik çalışmalara alınan hastaları daha iyi tanımlamak ve sınıflamak amacı ile bazı eklemeler düşünülmüştür. Sepsiste klinik evreyi belirlemek için PIRO kavramı (Predisposition Insult Infection Response Organ Dysfunction) ortaya konulmuştur. Ayrıca sepsis tanı kriterleri arasına C-reaktif protein, prokalsitonin, laktik asit, kreatinin, bilirubin gibi birçok biyokimyasal ölçütte artışın da dahil edilmesi önerilmiştir. Sonuç olarak bu toplantıda da sepsis için altın standart olmadığı, önerilerin ancak hasta yatağı başında klinisyenin karar vermesine yardımcı olacağı görülmüştür (6).

**Tablo-1:** SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS uluslar arası sepsis tanımları konferansında (2001) kabul edilen kriterler (1).

### **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  $>20\text{ml}/\text{kg}$ )
- Hiperglisemi (diyabetin olmadığı durumlarda plazma glukozu  $>110\text{mg}/\text{dl}$  veya  $7,7\text{ mM}/\text{l}$ )

### **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  $<70$  veya sistolik kan basıncının yetişkinlerde  $>40\text{ mmHg}$  düşmesi veya yaşa göre normal değerden  $<2$  standart sapma olması)
- Mikst venöz oksijen saturasyonu  $>\%70$
- Kardiyak indeks  $>3.51\text{ min}^{-1}\text{ m}^{-2}$

### **Organ disfonksiyon parametreleri**

- Arteriyel hipoksemi ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 <300$ )
- Akut oligüri (en az 2 saat idrar çıkışı  $<0.5\text{ mL}/\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$  veya  $45\text{ mM}/\text{l}$ )
- Kreatininde  $\geq 0,5\text{ mg}/\text{dl}$  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  $>4\text{ mg}/\text{dl}$  veya  $70\text{ mmol}/\text{l}$ )

### **Doku perfüzyon parametreleri**

- Hiperlaktatemi ( $>3\text{ mmol}/\text{l}$ )
- Kapiller doluşta azalma veya deride renk değişikliği

Bu kriterlerin yanı sıra çalışmada kullanılacak bazı terimlerin tanımları şu şekildedir.

**Kan dolaşımı enfeksiyonları:** Ağır sepsis ve septik şok olgularının %30-40'ından sorumludur ve iki grupta ele alınabilirler. **Primer kan dolaşımı enfeksiyonu** enfeksiyon odağının bilinmediği durumdaki kan dolaşımı enfeksiyonu veya damar içi kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonudur. **Sekonder kan dolaşımı enfeksiyonu** başka bir enfeksiyon odağına bağlı olarak gelişen kan dolaşımı enfeksiyonudur (7).

Hastalıkları önleme ve kontrol merkezi (CDC), hastane enfeksiyonları sürveyans tanımlamalarında primer kan dolaşımı enfeksiyonlarını, laboratuvar olarak kanıtlanmış kan dolaşımı enfeksiyonu ve klinik sepsis olarak iki grupta ele almıştır.

**Laboratuvar olarak kanıtlanmış kan dolaşımı enfeksiyonu** tanısı için aşağıdaki durumlardan birinin olması gerektiği belirtilmiştir.

1. Hastanın kan kültüründen patojen olduğu bilinen bir mikroorganizmanın izole edilmesi ve bu mikroorganizmanın başka bir yerdeki enfeksiyon odağı ile ilişkili olmaması,

2. Ateş ( $>38^{\circ}\text{C}$ ), titreme veya hipotansiyondan biri ve aşağıdakilerden birinin olması,

a. Cilt flora üyesi bir mikroorganizmanın (*Bacillus* türleri, *Propionibacterium* türleri, koagülaz negatif stafilokoklar, difteroidler veya mikrokoklar) iki farklı kan kültüründe üremesi ve başka bir bölgedeki enfeksiyonla ilişkili olmaması,

b. Hastada intravasküler bir cihaz varsa kültürde cilt flora üyesi bir mikroorganizmanın üremesi ve doktorun uygun antimikrobik tedavi başlaması,

c. Kanda mikroorganizmaya ait antijenin saptanmasıdır.

**Klinik sepsis** tanısı için ise başka bir nedene bağlanamayan ateş ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) veya hipotansiyon (sistolik kan basıncı  $\leq 90$  mmHg) veya oligüri ( $<20$  ml/saat) olması ve aşağıdakilerin tümünün olması gerektiği belirtilmiştir.

1. Kan kültürü alınmamış olması veya alınmış ise kültürde üreme olmaması veya antijen saptanmaması,

2. Başka bir bölgede enfeksiyon olmaması,
3. Doktorun sepsis için uygun antimikrobik tedaviyi başlaması (7).

Yine CDC'nin tanımlarına göre **sekonder kan dolaşımı enfeksiyonu** demek için aşağıdaki kriterlerden ikisi de olmalıdır.

1. Bir veya daha fazla kan kültüründe cilt flora üyesi dışındaki mikroorganizmalardan birinin üremesi,
2. Bir başka enfeksiyon odağından izole edilen mikroorganizma ile kandan izole edilen mikroorganizmanın aynı olması (7).

**Kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu**, intravasküler kateteri olan ve periferik venden alınan kan kültürlerinin birinde veya daha fazlasında üreme saptanan, enfeksiyonun klinik bulgularına sahip (ateş, titreme ve/veya hipotansiyon) ve kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olabilecek başka bir enfeksiyon odağı olmayan (kateter hariç) bir hastadaki bakteriyemi veya fungemidir. Kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu tanısı için aşağıdaki durumlardan biri olmalıdır.

1. Kateterin yarı kantitatif ( $\geq 15$  cfu) veya kantitatif ( $\geq 100$  cfu) kültüründe üreme ve periferik venden alınan kan kültüründe tür ve antibiyogramı aynı mikroorganizmanın üremesi,
2. Periferik kan ve santral venöz kateterden aynı anda alınmış olan kan kültürlerinde, kateterden alınmış olan kandaki üremenin periferik kana göre kantitatif olarak en az 5 kat fazla olması,
3. Periferik kan ve santral venöz kateterden aynı anda alınmış olan kan kültürlerinde, santral venöz kan kültüründe üreme sinyalinin periferik kana göre en az 2 saat erken alınmasıdır (8).

Sepsis geliştiği yere göre, toplumda gelişen sepsisler ve hastane kaynaklı (nozokomiyal) sepsisler olarak ikiye ayrılabilir. **Nozokomiyal sepsis** hastaneye yatıştan 72 saat sonra ortaya çıkan sepsistir (1).

Günümüzde kullanmış olduğumuz kriterler ve tanımlar ya CDC tanımları gibi sürveyans amacıyla ya da sepsis uzlaşısı toplantısı kriterleri veya uluslar arası sepsis grubu kriterleri gibi çalışmalarda ortak dil oluşturmak amacı ile oluşturulmuştur. Bu nedenle hasta başında karar verirken bu kriter

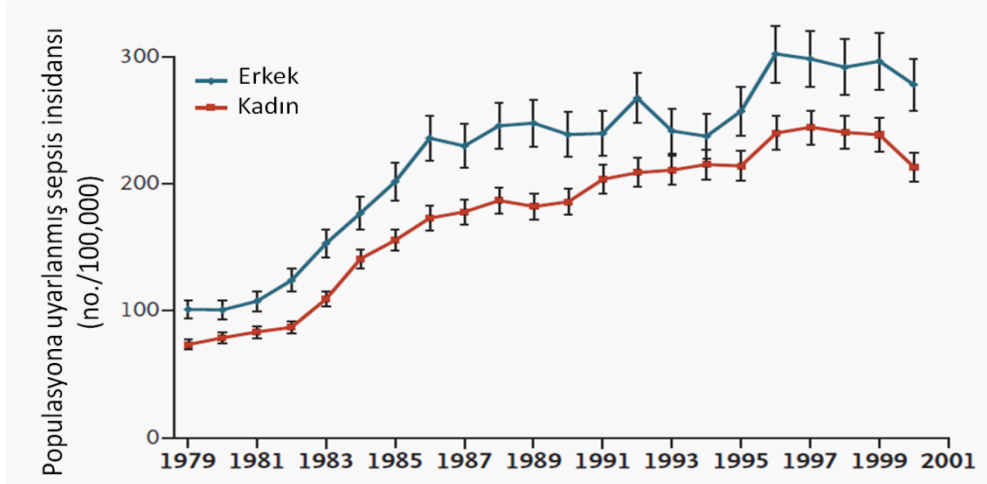
ve tanımlardan kabul edilebilir duyarlılık ve/veya özgüllük beklemek her zaman mümkün olmayabilir.

## **Epidemiyoloji**

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).

Günümüzde toplumda ileri yaş grubunun artması, kronik hastalığı olan hastaların yaşam sürelerinin uzaması, teşhis veya tedavi amacı ile invazif girişimlerin yaygın kullanılması, immünsüpresif ilaçların, kemoterapi ve transplantasyonun daha fazla uygulanması gibi nedenler ile, özellikle de nozokomiyal sepsis olgularındaki artış dikkat çekmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonlarda görülen bu artışın nedenlerinden birinin de klinisyenlerin sepsisi daha iyi tanınması ve daha fazla tanı koymasından olduğu da düşünülmektedir (1).

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılmış bir çalışmada 1979-2000 yılları arasında hastane çıkış verilerine dayanılarak 750.000.000 hastaneye yatış için 10.319.418 sepsis olgusu hesaplanmıştır (%1,3). 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 (Şekil-2) (10).



**Şekil-2:** 1979-2000 yılları arasında cinsiyete göre popülasyona uyarlanmış sepsis insidansı (10).

Yoğun bakım ünitesine yatırılan hastalar, ciddi hastalıkları ve yapılan invazif girişimler nedeniyle hastane enfeksiyonlarının gelişmesine daha yatkındırlar. Bu hastalarda en sık görülen hastane enfeksiyonları ventilatörle ilişkili pnömoni, kan dolaşımı ve üriner sistem enfeksiyonlarıdır (11).

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 (12).

Ülkemizde yoğun bakım ünitelerinde yapılan çalışmalarda ise nozokomiyal bakteriyemi, sepsis insidansı %7,6-17,2 arasında bildirilmektedir (13-17).

## Patogenez

Sepsis mikroorganizmanın konak defansı ile etkileşimi sonucu oluşan karmaşık bir olaydır. Sepsisin şiddetini mikroorganizmanın virülans faktörleri ve konağın immün yanıtı belirler. Dolaşıma girerek sepsise neden olan mikroorganizmalar, genellikle damar dışı bir enfeksiyon odağından yayılım sonucu girer. Enfeksiyon bazen de intravasküler kateter, septik tromboflebit, bakteriyel endarterit, endokardit, mikotik anevrizmalar ve damar greftlerinden kaynaklanabilir (1).



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 (1).

Sepsis ve septik şokun en önde gelen mikrobik nedeni SIRS'e yol açan olaylar dizisini başlatan gram negatif bakterilerle olan enfeksiyonlardır. Bakteri kanda sadece geçici olarak bulunabilir; bundan dolayı sepsis ve septik şok her zaman bakteriyemi ile birlikte değildir. Gram negatif bakteri hücrelerinin bir iç komponenti olan lipopolisakkarid (LPS), sitokin salınımı ile sonuçlanan kaskadın başlaması ve septik şok ile birlikte olan erken fizyolojik değişikliklerden sorumludur. Dolaşımda bulunan LPS ya bakterisidal permeabilite artırıcı protein(BPI) ya da LPS-bağlayıcı protein ile kompleks oluşturabilir. LPS-LPS bağlayıcı protein kompleksi kendisi için reseptör olan CD14 ile bağlanırken, LPS-BPI kompleksi tahrip edilir. LPS-LPS bağlayıcı protein kompleksi ile CD14 bir kez bağlandığında, CD14 sonunda nükleusa nükleer faktör kappa B(NF- $\kappa$ B), translokasyonu ile sonuçlanan intrasitoplazmik sinyal sistemini başlatır. NF- $\kappa$ B, nükleusta bulunduğu zaman tümör nekroz faktör alfa(TNF- $\alpha$ ), interökin-1(IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, trombosit aktive edici faktör(PAF) ve interferon gama(IFN- $\gamma$ ) gibi çeşitli sitokinlerin transkripsiyonunu başlatan bir transkripsiyon faktörüdür. Bunlar ve nitrik oksid, intraselüler adezyon molekülleri, prostaglandinler, ve lökotrienleri içeren diğer potansiyel mediyatörler septik şokun patogenezinde doğrudan veya dolaylı olarak yer alırlar (18).

Sepsis sendromu gram pozitif bakteriler, virüsler, protozoonlar, riketsiyalar ve helmintler (bu mikroorganizmaların hiçbiri LPS içermez) ile de oluşabilir. Bu durumlarda, sitokin indüksiyonu için alternatif yollar uyarılmaktadır. Peptidoglikan ve teikoik asid içeren gram pozitif bakteriler alternatif kompleman yolunu doğrudan aktive edebilir. Alternatif kompleman yolu aktive olduğunda fagosit aktivasyonu kadar, inflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açan, lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonu da indüklenir. Gram pozitif bakterilere ait komponentler de doğrudan sitokin üretimini indükler; hem peptidoglikan hem de lipoteikoik asid monosit ve

makrofajlardan IL-1 salınımını indükleyebilir, ve lipoteikoik asid buna ek olarak TNF-alfa ve IL-6 salınımını indükler. Diğer bakteriyel toksinler de sitokin üretimini uyarma kapasitesine sahiptirler. Gram pozitif bakterilerdeki enterotoksinler ve ekzotoksinler doğrudan IL-1, IL-6 ve TNF-alfa salınımına neden olabilirler. Bundan başka stafilokoklara ait toksik şok sendrom toksin-1(TSST-1) LPS'e göre daha fazla IL-1 salınımına yol açar (18).

Sepsise neden olan mikroorganizmaya bakılmaksızın, inflamasyon yapıcı sitokinlerin salınımı ile karakterize yaygın son yol aktive olur ve bu ateş, hipotansiyon, organ perfüzyonunda azalma ve diğer potansiyel komplikasyonlarla sonuçlanır (18).

### **Risk Faktörleri**

Enfeksiyonlara karşı organizmayı koruyan en önemli defans sistemi anatomik bariyerlerdir. Sağlam deri ve mukozalar, mikroorganizmaların daha derin dokulara ilerlemesini engeller.

Travma, yanık veya perkütan intravasküler kateterler bu bariyerleri kırar. Gastrointestinal mukoza ve diğer mukozalar sitotoksik ilaçlar ve radyasyon tedavisinden zarar görürler. Tablo-2'de sepsis için risk faktörleri yer almaktadır.

**Tablo-2:** Sepsis için risk faktörleri (1).

<p><b>Konağa ait faktörler</b></p> <p>Altta yatan ölümcül hastalık</p> <p>İleri yaş</p> <p>Siroz</p> <p>Diabetes mellitus</p> <p>Kronik böbrek hastalığı</p> <p>Granülositopeni</p> <p>Geniş travma ve yanıklar</p> <p>İmmün süpresif tedavi</p> <p>Lokal enfeksiyonlar</p>
<p><b>Tedaviye ait faktörler</b></p> <p>Yoğun bakım ünitesinde yatış</p> <p>Damar içi kateter varlığı</p> <p>Yüksek miktarda parenteral sıvı kan veya kan ürünleri verilmesi</p> <p>Hemodiyaliz</p> <p>Üriner kateter varlığı</p> <p>Entübasyon, endotrakeal tüp, mekanik ventilatör varlığı</p> <p>Büyük cerrahi girişimler</p>

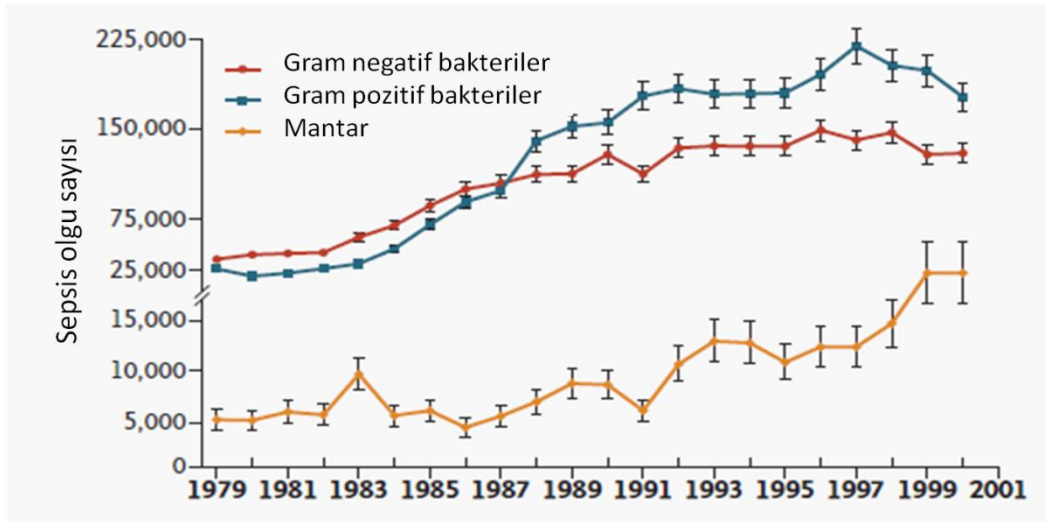
### **Etiyoloji**

Sepsis etkeni mikroorganizmaların çoğu endojen floradan kaynaklanmaktadır. Antibiyotikler kullanılmadan önceki dönemlerde streptokoklar ve stafilokoklar en sık sepsis nedeni olan bakterilerdi. Antibiyotik döneminde ise gram negatif bakteriler gittikçe artan oranlarda sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır. Son yıllarda ise gram pozitif

bakterilerin oranı tekrar artmaya başlamıştır, ayrıca fungal enfeksiyonlardaki artış da dikkati çekmektedir.

Toplum kökenli sepsislerde en sık etkenler *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* ve diğer bağırsak bakterileridir. Nozokomiyal sepsislerde ise en sık etkenler olarak *S. aureus*, koagülaz negatif stafilkoklar(KNS), *Enterococcus* türleri, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, diğer nonfermentatif bakteriler ve *Candida* türleri öne çıkmaktadır (19).

Martin ve ark'ının(10) yaptığı çalışmada etiyolojik açıdan 1979-1987 yılları arasında gram negatif bakteriler daha yüksek oranda iken, daha sonraki yıllarda gram pozitif bakterilerin öne çıktığı görülmektedir. 2000 yılı izolatlarına bakıldığında; gram pozitif bakteriler %52.1, gram negatif bakteriler %37.6, polimikrobiyal %4.7, anaerobik bakteriler %1 ve mantarlar %4.6 olarak bulunmuştur. Mantarların insidansı 1979 yılından 2000 yılına gelindiğinde %207 oranında artmıştır (Şekil-3).



**Şekil-3:** Etken olan patojenlere göre ABD'deki sepsis olguları (10).

Avrupa'da yoğun bakımlarda yapılan çok merkezli bir çalışmada gram pozitif bakteriler %40, gram negatif bakteriler %38 ve mantarlar %17 oranında etken olarak saptanmıştır. Yine aynı çalışmada en sık enfeksiyon odağı olarak %68 akciğerler, %22 batin, %20 kan ve %14 üriner sistem bulunmuştur (12).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada toplum kaynaklı sepsislerde en sık etkenler olarak *E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* izole edilmiştir (20). Yine ülkemizde nozokomiyal bakteriyemilerde en sık etkenler *Staphylococcus* spp. *Enterococcus* spp. ve *E. coli* olarak saptanmıştır (21). Bir başka çalışmada nozokomiyal sepsis olgularında % 48,7 oranında gram negatif bakteriler (en sık *P. aeruginosa* ve *E. coli*) sorumlu iken, % 47,9 oranında gram pozitif bakteriler (en sık *S. aureus*) etken olarak görülmüştür (22).

### **Klinik ve Komplikasyonlar**

Sepsisin en sık belirti ve bulguları ateş, hipotermi, üşüme, titreme, hiperventilasyon, taşikardi, deri lezyonları ve hipotansiyondur. Ancak bu klinik belirti ve bulgular, sepsisin evresine göre ve hastanın yaşı, altta yatan hastalığı, immün sistemi gibi faktörlere bağlı olarak da değişiklikler gösterir.

İmmünsüpresif ve nütropenik hastalarda enflamatuvar yanıt zayıf olduğundan bu hastalarda endürasyon, fluktuasyon, lokal ısı artışı, reaktif lenfadenopati, eksüdasyon gibi bulguların tespit edilemeyebileceği de akılda tutulmalıdır.

Sepsiste tüm organların fonksiyonları etkilenebileceğinden hipotansiyon, kanama, trombositopeni, lökopeni, organ yetmezliği, akut respiratuar distres sendromu (ARDS), dissemine intravasküler koagülasyon (DİK), oligüri, anüri, metabolik asidoz, sarılık, konjesif kalp yetmezliği gibi çok sayıda komplikasyon gelişebilmektedir (1).

### **Tanı**

Hastalardan dikkatli anamnez alınması, klinik belirti ve bulguların iyi değerlendirilmesi sepsisin erken tanısını koymak açısından önemlidir. SIRS tanı kriterlerinin (taşikardi, taşipne, lökositoz veya lökopeni, ateş veya hipotermi) yanı sıra şuur değişikliği, hiperbilirubinemi, metabolik asidoz, trombositopeni, yeni gelişen deri lezyonları sepsis tanısı için ipuçları olabilir.

Klinik tanı, laboratuvar bulguları ile de desteklenmelidir. Sepsiste klinik evrelere göre farklı laboratuvar bulguları gözlenir (1).

Hematolojik olarak genellikle lökositoz ve sola kayma görülür (lökosit sayısı  $>12.000/\text{mm}^3$ ). Bazen lökomoid reaksiyon da görülebilir (lökosit sayısı  $50-100.000/\text{mm}^3$ ). Ancak özellikle yenidoğanlarda, yaşlılarda, alkoliklerde, kemik iliği rezervi yeterli olmayan hastalarda lökopeni de görülebilir (lökosit sayısı  $<4.000/\text{mm}^3$ ) (1, 23).

Periferik yaymada, nötrofillerde toksik granülasyon, Dohle cisimleri ve vakuolizasyon görülür. Toksik granülasyon ve Dohle cisimleri bakteriyemi için spesifik kabul edilmemekte, fakat vakuolizasyon bakteriyeminin önemli bir işareti olarak kabul edilmektedir. Sepsiste eritrosit yapımı azalır, eğer enfeksiyon uzamaz ise bu anemiye neden olmaz (1).

Disemine intravasküler koagülasyon (DİK) gelişen hastaların laboratuvar tanısında kullanılacak spesifik bir test yoktur. Tanıda birçok testten yararlanılır. Trombosit sayısında hızlı düşüş veya  $100000/\text{mm}^3$  altında olması, protrombin zamanı ve aktive parsiyel tromboplastin zamanında uzama, plazma fibrin yıkım ürünlerinde artış ve koagülasyon inhibitörlerinin (antitrombin III ve protein C) plazma seviyelerinin azalmasının gösterilmesi DİK tanısını koydurur. DİK gelişen hastaların periferik kan yaymasında, eritrositlerde parçalanma ve şistositler görülür. Plazma fibrinojen seviyesi, sepsisin erken döneminde normal sınırlarda olabilir, çünkü bu protein akut faz reaktanıdır. Ağır sepsislerde hipofibrinojenemi gelişir (1).

Kan gazları sepsis takibinde önemlidir. Erken dönemde respiratuvar alkaloz, daha sonra metabolik asidoz gelişir. Kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin seviyesi şok varlığında veya olmadan da artabilir. Şok durumunda azotemi ve oligüri genellikle akut tübüler nekroz sonucu gelişir. Hepatobiliyer sistem tutulumu olmadan da sepsisli hastalarda karaciğer fonksiyon testleri bozulabilir. Özellikle direkt bilirubin artışı ile beraber hiperbilirubinemi, alkalin fosfataz ve transaminaz seviyelerinde orta derecede artış görülür (1, 23).

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 (1).

Bunlar içerisinde SIRS'ın enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz nedenlerinin ayrımında PCT ve CRP daha yararlı bulunmuştur (24 - 26).

### **Etiyolojik Tanı**

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 (1).

### **Kan Kültürü**

Günümüzde kan dolaşımı enfeksiyonları etiyolojik tanısında altın standart kan kültürüdür (27). Canlı bakteri ve mantarları üretebilen, ayrıca antibiyotik duyarlılığı çalışılmasına imkan veren kan kültürü, klinisyenler için en önemli tanı ve doğrulama yöntemi olarak kullanılmaktadır (28, 29).

Kan kültürleri, aseptik koşullarda ve antibiyotik verilmeden önce, değişik venlerden en az üç set alınmalı, aerop ve anaerop koşullarda inkübe edilmelidir (1). Kan kültürü örneği alınırken, kontaminasyon nedeniyle oluşabilecek yanlış pozitiflikleri önlemek için örnek alımı sırasında cilt antisepsisine çok 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 (30, 31).

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 aşmadığı görülmektedir (Tablo-3).

**Tablo-3:** Sepsis ön tanılı olgularda kan kültürü pozitifliği oranları (29, 32-44).

<b>Çalışma</b>	<b>Kan kültürü pozitifliği oranı</b>
M. Previsdomini ve ark. 2012 (32)	%19,5
F. Bloos ve ark. 2010 (33)	%16,5
C. Dierkes ve ark. 2009 (34)	% 24
L. Pasqualini ve ark. 2012 (29)	%14,5
P. Josefson ve ark. 2011 (35)	%13,5
N. Mancini ve ark. 2008 (36)	%20,4
M. Avolio ve ark. 2010 (37)	%30
B. Lucignano ve ark. 2011 (38)	%10,3
H. Westh ve ark. 2009 (39)	%17
U. Lodes ve ark. 2012 (40)	%20,3
F. Wallet ve ark. 2010 (41)	%10
E. Tschiedel ve ark. 2012 (42)	%17
K. Yanagihara ve ark. 2010 (43)	%8
M.V. Mauroa ve ark. 2012 (44)	%40,5

Kan kültürü sistemlerinin duyarlılığını azaltan diğer bir neden de üremesi nispeten daha yavaş ve güç olan mikroorganizmalardır. Benzer şekilde invazif fungal enfeksiyonlara bağlı sepsis olgularında da etken mantarların üretilme oranı düşük bulunmuştur (45, 46).



Her ne kadar günümüzde gelişmiş kan kültürü sistemleri antibiyotiklerin etkilerini azaltacak şekilde düzenlenmişse de, kan örneği alınmadan önce antimikrobiyal tedavi kullanılması yanlış negatif sonuçların alınmasına neden olabilmektedir.

Serody ve ark.(47) 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.

Doğal olarak alınan kan örneği miktarı arttıkça, kan kültürünün duyarlılığı da artacaktır. Ancak erişkinlerde her bir kan kültürü şişesi için 8-10 ml örnek alınması gerektiği düşünüldüğünde bunu gerçekleştirmenin, özellikle de yoğun bakımda yatan hastalarda zor olduğu görülmektedir (33). Pediatrik yaş grubunda ise, erişkinlere göre daha düşük miktarda kan alındığından, düşük bakteri yükü nedeni ile kan kültürünün duyarlılığının daha da azaldığı bildirilmiştir (48).

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 (49).

Kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olan mikroorganizmalar, olguların %90'ında kan kültürü sistemlerinde ilk 48 saat içinde pozitif üreme sinyali alınmasına neden olmaktadır (50). Ancak pozitif sinyal sonrası üretilen mikroorganizmanın identifikasyonu için ek olarak birkaç gün daha gerektiği düşünüldüğünde, sürecin hala istenilen seviyede hızlı işlemediği görülmektedir. Bu nedenle mevcut kan kültürü sistemleri, prognostik önemi olan erken tedavi yönetiminin de yapılabilmesine yeterince olanak sağlamamaktadır (51). Nitekim Carrigan ve ark. yaptıkları çalışmada, tanıdaki gecikme veya yanlışlıklar nedeniyle kan dolaşımı enfeksiyonlarının yaklaşık %25'inde yetersiz tedavi yapıldığını, dolayısıyla mortalitenin belirgin olarak arttığını göstermişlerdir (52).

## Prognoz

Günümüzde sepsis, yoğun bakım ünitelerindeki en sık ölüm nedenidir. ABD'de her yıl yaklaşık 100.000 kişinin yaşamını sepsis ve komplikasyonları nedeniyle yitirdiği tahmin edilmektedir (53).

Sepsis tanı ve tedavisindeki gelişmeler nedeni ile mortalite oranı eskisine göre biraz düşmüş olmakla birlikte hala yüksektir (10). Değişik çalışmalarda ölüm oranı %20-80 arasında bildirilmektedir. Farklı ölüm oranlarının bildirilmesi, çalışma gruplarının heterojen olması ile ilişkilidir (1).

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 (4).

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 (1). Sonuç olarak sepsisin prognozunu etken mikroorganizma kadar konağın durumu da belirlemektedir (Tablo-4).

**Tablo-4:** Sepsiste prognozu etkileyen faktörler (1).

Altta yatan hastalık
Nötropeni
Hipogamaglobülinemi
Diabetes Mellitus
Alkolizm
Böbrek yetmezliği
Solunum yetmezliği
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)
Antibiyotik tedavisinin uygunluğu
Tedavi başlamasına kadar geçen süre
İleri yaş

### **Tedavi**

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. DİK tedavisi
2. Antimikrobiyal tedavi
3. Enfeksiyon odağının kaldırılması
4. Altta yatan hastalığın tedavisi

## 5. Diğer tedavi girişimleri

### **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 (1).

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 (1).

Ancak septik hastaların en az %10'unda geniş spektrumlu ampirik antibiyotik kullanılmasına rağmen, sorumlu olduğu iddia edilen mikroorganizmayı kapsayan antimikrobiyal tedavi verilememektedir (2). Yetersiz antimikrobiyal tedavi ise sepsiste beklenildiği gibi artmış mortalite oranına sebep olmaktadır (54, 55).

Günümüzde kullandığımız kan kültür sistemlerinin duyarlılığı düşük olduğundan, ampirik tedavinin yetersizliğini giderecek gerekli etiyolojik bilgileri her zaman sağlayamamaktadır. Kan kültür sistemleri etiyolojik bilgileri verse bile, bu sonuçların geç elde edilebilmesi nedeniyle ampirik tedavi

yetersizliğini ve bunun sonucunda gelişen olumsuz prognozu düzeltmek için geç kalınabilmektedir (56).

Ampirik tedavinin diğer önemli bir sorunu da ne zaman kesileceği veya değiştirileceğidir. Sepsisli hastaların tedavisi için kanıta dayalı kılavuzların merkezinde kan kültürü yer almaktadır. Ancak kan kültürü duyarlılığı düşük olduğundan ve sonuçları geç elde edilebildiğinden erken tedavi yönetimine yeterince yardımcı olamamaktadır. Dolayısıyla hasta kaçınılmaz şekilde gereksiz, potansiyel tehlikeleri olan antimikrobiyal tedaviyi uzun süreli kullanılmak zorunda kalmaktadır (57).

Uzun süreli antibiyotik kullanımının hastaya toksik yan etkilerinin yanında diğer bir unutulmaması gereken konu da direç gelişimi üzerine olan olumsuz etkisidir (58). Hastanelerde antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması hastane mikroflorasında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Bu sayede mikrofloradaki duyarlı bakteriler ortadan kaldırılırken, dirençli suşlar seleksiyona uğramaktadır (59). Dirençli suşların artışı ise hastanede kalım süresini, tedavi maliyetlerini ve mortaliteyi artırmaktadır (58).

Yukarıda sayılan sebeplerden dolayı ampirik tedavi sonrası yapılacak tedavi düzenlemesi hasta sağlığı açısından son derece önemlidir. Günümüzde genel olarak tedavi düzenlemesi pozitif kan kültürü sonucu veya diğer kültür sonuçları ile yapılmaktadır. Ancak kullandığımız kültür sistemlerinin, tedavi düzenlenmesinde ortalama 1-2 günlük gecikmeye neden olduğu bildirilmektedir (3).

### **Yeni Tanı Yöntemleri**

Başlangıçtaki ampirik antibiyotik tedavisinin uygun olması prognozu belirgin derecede olumlu etkilemektedir. Bu nedenle hayatı tehdit eden sepsisin etiyolojik tanısına yönelik daha hızlı, daha yüksek pozitif ve negatif prediktif değere sahip yeni testlere ihtiyaç doğmuştur. Bu amaçla mikrobiyal DNA'nın PCR ile saptanması en ümit verici yaklaşımlardan birisi olarak değerlendirilmiştir (60, 61).

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 kullanılan floresan işaretli problemlerden ışınlar yayılır. Yayılan bu ışınlar da özel dedektörler vasıtasıyla değerlendirilir.

PCR bazlı teknolojiler son iki dekatta tanıda oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Sepsiste etiyolojik tanıya olanak sağlayan, multipleks real time PCR yöntemleri ticari olarak da elde edilebilir hale gelmiştir. Bu amaçla en sık kullanılan ve üzerinde araştırmalar yapılan iki ürünün özellikleri aşağıda açıklanmıştır.

### **Prove-it™ Sepsis (Mobidiag, Finlandiya)**

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. Pozitif kan kültürü şişesinden DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra geniş aralıkta PCR (broad range PCR) ile DNA amplifikasyonu gerçekleştirilmekte; takiben tabanında mikroarray içeren reaksiyon tüplerinde PCR ürünlerinin deteksiyonu sağlanmaktadır. Mikroarrayler patojen spesifik sekanslar içerir ve bunların PCR ürünleri ile hibridizasyonu sonucu bakteriyel patojenler identifiye edilir. Bu metot ile sepsis etyolojisinde yer alan patojenlerin %90'ından fazlasınının saptanabildiği, klasik identifikasyon yöntemleri ile de %90'dan fazla uyumlu olduğu gösterilmiştir. Bu yöntemin en önemli avantajı standart biyokimyasal yöntemlerle identifikasyon yapan yöntemler ile karşılaştırılınca tanı süresini 12 saat ile 21 saate kadar azaltmasıdır. Ancak çalışmaya başlamak için kan kültürü şişesinden pozitif üreme sinyalinin alınmasını beklemek gerekmektedir (46).

### **LightCycler™ SeptiFast (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)**

Direkt olarak kan örneğinden yaklaşık 6 saatte, sepsis ile ilişkili 25 önemli bakteri ve mantar türü DNA'sının varlığını saptayabilen multipleks real time PCR temelli bir yöntemdir. Şüpheli kan dolaşımı enfeksiyonlarında patojenin tanımlanmasında ilk Conformité Européenne (CE) onayı alan ve üzerinde en çok çalışma yapılan multipleks real time PCR bazlı sistemdir (27, 62).

SeptiFast ile seçilmiş mikroorganizmalarda daha kısa sürede, daha duyarlı sonuçların elde edilebileceği gösterilmiştir (39).

Bu çalışmada amacımız kan kültürü sistemlerine göre daha hızlı ve duyarlı sonuçlar verdiği bildirilen multipleks real time PCR yönteminin (LightCycler™ SeptiFast) tanısal performansını ve tedaviye olası etkilerini değerlendirmektir.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun izni (08 Mart 2011 tarih, karar no: 2011-6/9) ile yapıldı.

### **Çalışmaya Katılan Hasta ve Gönüllü Grupları**

Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama Araştırma Merkezi'nde 14 Mayıs 2012 ve 7 Kasım 2012 tarihleri arasında yatmakta olan (en az 3 gün), 18 yaş üzeri, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı tarafından nozokomiyal sepsis tanısı konulan ve onamı alınan hastalar çalışmaya dahil edildi. Aynı hastanın yatışı sırasında tekrarlayan sepsis atakları olması durumunda aynı hastadan tekrar örnek alınması için arada en az bir hafta bulunmasına dikkat edildi.

Kısaca sözel bilgi verildikten sonra hasta onam formları hastaların kendilerine veya yakınına okutuldu ve imzalatıldı. İstenmesi durumunda gerekli ek izahatlar da sözel olarak yapıldı.

Kontrol grubu, ateş başta olmak üzere herhangi bir sepsis bulgusu olmayan ve onamı alınan sağlıklı erişkinlerden seçildi.

### **Gereçler**

Steril EDTA'lı kan alma tüpü (Vacuette K3E K3EDTA) (Greiner bio-one, Almanya )

Pipet (10, 200, 1000 mikrolitre) (Gilson, Fransa)

Pipet (5000 mikrolitre) (Thermo scientific, ABD)

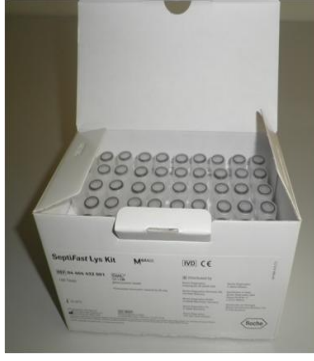
Pipet ucu (DNAaz ve RNAaz içermeyen, 10, 200, 1000 mikrolitre) (Greiner bio-one, Almanya)

Pipet ucu (DNAaz ve RNAaz içermeyen, 5000 mikrolitre) (Thermo scientific, ABD)

Ependorf tüpü (1,5 mililitre) (DNAaz ve RNAaz içermeyen) (Neptune, ABD)



Biyolojik kabin (Shinsaeng, Finetech, Güney Kore)  
Soğutucu blok (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
Pudrasız vinil eldiven (Birset, Türkiye)  
Çamaşır suyu  
Derin dondurucu -20 °C (Şenocak, Türkiye)  
SeptiFast Lys MGRADE kiti (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
MagNA Lyser cihazı (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
SeptiFast Prep MGRADE kiti (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
Thermomixer cihazı (Eppendorf, Almanya) (Şekil-4)  
Kuru ısı bloğu (Biosan, Bio TDB – 100, Letonya) (Şekil-4)  
Santrifüj cihazı (Rotina 420R, Hettich zentrifugen, Almanya)  
LightCycler SeptiFast MGRADE kiti (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
Soğutucu blok (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
Kapiller tüp (100 mikrolitre) (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
LightCycler 2.0 cihazı (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
LC Carousel Centrifuge 2,0 cihazı (Roche Diagnostics, Almanya) (Şekil-4)  
Bilgisayar (Hewlett packard, ABD)  
SeptiFast Identification software (SIS) (Roche Diagnostics, Almanya)



SeptiFast Lys kit



SeptiFast Prep kit



LightCycler SeptiFast kit



MagNA Lyser



Kuru ısı bloğu



Thermomixer



LC Carousel Centrifuge 2,0



Kapiller tüpler



Soğutucu blok



LightCycler 2.0

**Şekil-4:** PCR yönteminde kullanılan kit ve cihazlar.

## Yöntemler

### LightCycler™ SeptiFast Sistemi (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)

Çalışmada direkt olarak kandan, kan dolaşımı enfeksiyonlarına sebep olan en yaygın 25 patojenin tanısına imkan sağlayan real time multiplaks PCR sistemi (LightCycler™ SeptiFast) kullanıldı (Tablo-5).

**Tablo-5:** SeptiFast sisteminin saptayabildiği mikroorganizmalar.

Gram negatif bakteriler	Gram pozitif bakteriler	Mantarlar
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella</i> ( <i>pneumoniae/oxytoca</i> )	Koagülaz Negatif Stafilokoklar (KNS)*	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus</i> spp.**	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter</i> ( <i>cloacae/aerogenes</i> )	<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>		

\* **KNS (Koagülaz Negatif Stafilokoklar):** *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. capitis* subsp. *ureolyticus*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. caprae*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*,

\*\* **Streptococcus türleri:** *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. constellatus*, *S. cristatus*, *S. gotdonii*, *S. intermedius*, *S. milleri*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis*, *S. viridans*.

Sistemde patojenlerin identifikasyonu tür spesifik problemler aracılığı ile yapılmaktadır. Bu problemler bakterinin ribozomal DNA'sının 16S ve 23S bölgeleri arasındaki ve fungal genomun 18S ve 5,8S ribozomal bölgeleri arasındaki internal transkribe spacer (ITS) bölgesini hedefler. Amplifikasyon boyunca spesifik PCR ürünlerinin çoğalması, eş zamanlı (real time) olarak

floresan boya ile işaretli hibridizasyon problemlerinden yayılan ışımaların ölçümü ile saptanmaktadır.

Analiz 3 basamaktan oluşmaktadır.

1. Kan örneklerin mekanik ve kimyasal lizisi ile DNA'nın ekstrakte (izole) edilmesi.

2. Hedef DNA'nın 3 paralel reaksiyon ile (gram pozitif bakteri, gram negatif bakteri ve mantar) real time PCR ile amplifikasyonu.

3. Spesifik hibridizasyon problemleri ile kontrol ve örneklerin otomatize olarak identifikasyonu.

### **Örnek Alımı**

Kan kültürü için kan alınan aynı periferik venden, PCR ile çalışmak için de 3 ml kan örneği alındı ve steril EDTA'lı tüplere konuldu. Kan kültürü şişeleri ile beraber örnekler en kısa sürede Mikrobiyoloji Merkez 7/24 Laboratuvarı'na iletildi. Burada örnekler buzdolabında +4°C'de bekletildi. En geç 3 gün içerisinde de DNA ekstraksiyonu işlemine başlandı.

### **DNA Ekstraksiyonu**

Kontaminasyondan kaçınmak için tüm moleküler işlemler üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı.

Örnek hazırlaması işlemi laminar akım altında biyolojik kabinde gerçekleştirildi. Kullanım öncesi biyolojik kabin çamaşır suyu ile temizlendi. UV'den etkilenmeyen malzemeler ve biyolojik kabin en az 1 saat UV altında bekletilerek kontaminasyona neden olabilecek mikroorganizma DNA'larından arındırıldı. Çalışma boyunca pudrasız eldiven kullanıldı.

SeptiFast Lys MGRADE kitinin içerisinde çıkarılan, cam ve seramik boncuklar içeren lizis matriksi (LM) flakonunun içine 1500 mikrolitre kan örneği aktarıldı ve sonrasında MagNA Lyser cihazına yerleştirildi. MagNA Lyser cihazınının 70 saniye 7000 pm ayarında çalışması sağlanarak hücrelerin

mekanik lizisi gerçekleştirildi. Mekanik lizisi gerçekleştirilen örnekler cihazın dışında oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

SeptiFast Prep MGRADE kiti içerisinde, her bir örnek için 5'er tane olacak şekilde 15 mililitrelik falcon tüpleri çıkarıldı, üzerlerine hastanın adı, soyadı ve protokol numarası yazıldı. Daha sonra her bir hasta için falcon tüplerine 1'den 5'e kadar numara verildi.

Birinci falcon tüpüne 150 mikrolitre proteinaz K (PK) eklendi. MagNA Lyser cihazından çıkarılan lizis matriksi flakonunda mekanik olarak parçalanmış kan örneğinden 1000 mikrolitre, proteinaz K eklenmiş 1 numaralı falcon tüpüne aktarıldı. İçerisinde kan örneği ve proteinaz K olan 1 numaralı falcon tüpü kısa süreli olarak vortekslendi. Daha önce -20°C'de saklanırken oda sıcaklığında çözünmeye bırakılan internal kontrol (IC) homojenizasyon sağlamak amacıyla kısa süreli olarak vortekslendi. Internal kontrolden 10 mikrolitre alınıp 1 numaralı falcon tüpüne eklendi ve internal kontrol eklenmiş halde bulunan 1 numaralı falcon tüpü kısa süre vortekslendi.

Internal kontrol, üretici firma tarafından LightCycler SeptiFast MGRADE kiti içerisinde bir flakonun içinde hazır olarak bulunmaktadır. Internal kontrol hedef DNA'dan farklı, sentetik çift zincirli DNA molekülü karışımı içermektedir. Tüm örneklerin mekanik lizisinden hemen sonra eklenen internal kontrol, ekstraksiyon ve amplifikasyon işlemleri uygun şekilde yapılmış ise analiz kısmında da görülmektedir. Böylece internal kontrol sayesinde DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu aşamalarının düzgün yapılıp yapılamadığı kontrol edilebilmektedir.

SeptiFast Prep MGRADE kitinden çıkarılan, guanidinium thiocyanate içeren 2 flakon lizis tamponu (LB), 1 numaralı falcon tüpüne eklendi ve kısa süre vorteks ile karıştırıldı. Lizis tamponu eklenen 1 numaralı falcon tüpü Eppendorf Thermomixer cihazında 56°C'de 15 dakika boyunca 500 rpm'de çalkalandı.

Eppendorf Thermomixer cihazından çıkarılan 1 numaralı falcon tüpüne SeptiFast Prep MGRADE kitinden çıkarılan 1 flakon bağlayıcı tampon (BB) eklendi ve kısa süre vortekslendi.

SeptiFast Prep MGRADE kitinde bulunan, fiberglas yapısında olan ve DNA'yı tutabilme özelliğine sahip filtre kolonlar, boş durumdaki 2 numaralı falcon tüpüne yerleştirildi.

İçerisinde örnek, proteinaz K, internal kontrol, lizis tamponu (LB) ve bağlayıcı tampon (BB) bulunan 1 numaralı falcon tüpündeki karışımın ilk yarısı (2,7 mililitre), filtre kolon yerleştirilmiş olan 2 numaralı falcon tüpüne aktarıldı. Üzerine karışım eklenmiş filtre kolonlu 2 numaralı falcon tüpü 1900 g'de, 1 dakika santrifüj edildi. 1 numaralı falcon tüpündeki karışımın ikinci yarısı da (2,7 mililitre) santrifüjden çıkarılan filtre kolonlu 2 numaralı falcon tüpüne aktarıldı, bu sefer 1900g'de, 3 dakika santrifüj edildi. Böylece santrifüj sırasında karışım filtre kolondan geçerken, içerisinde varsa DNA'lar filtreye yapışmış oldu.

Filtre kolon, 2 numaralı falcon tüpünden çıkarıldıktan sonra boş durumdaki 3 numaralı falcon tüpüne yerleştirildi. Filtre kolon yerleştirilmiş 3 numaralı falcon tüpüne, 50% guanidinium thiocyanate, 40% etanol içeren 1 flakon inhibisyon uzaklaştırma tamponu (IRB) eklendi; 4200g'de, 2 dakika santrifüj edildi. Filtre kolon içeren 3 numaralı falcon tüpüne %0.2 NaCl, 80% etanol içeren 1 flakon yıkama tamponu (WB) eklendi ve 4200g'de, 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj edilen 3 numaralı falcon tüpünden çıkarılan filtre kolon, boş durumdaki 4 numaralı falcon tüpüne yerleştirildi ve üzerine bir şey eklenmeden 4200g'de, 1 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası 4 numaralı falcon tüpünden çıkarılan filtre kolon, 5 numaralı falcon tüpüne yerleştirildi. Daha önceden kuru ısı bloğunda 70°C'de ısıtılmış halde bekletilen elüsyon tamponundan (EB) 300 mikrolitre alınıp, filtre kolon yerleştirilmiş 5 numaralı falcon tüpüne eklendi. Elüsyon tamponu (EB) eklenmiş filtre kolonlu 5 numaralı falcon tüpü oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 4200g'de 2 dakika santrifüj edildi.

Yüksek sıcaklıktaki elüsyon tamponu (EB) ile beraber filtre kolondan süzülen ve 5 numaralı falcon tüpünün dibinde biriken sıvının tamamı örnek bilgileri üzerine yazılmış steril ependorf tüplerine aktarıldı.

DNA ekstraksiyonu yapılan örnekler, amplifikasyon yapılana kadar derin dondurucuda -20°C'de saklandı.

## DNA Amplifikasyonu

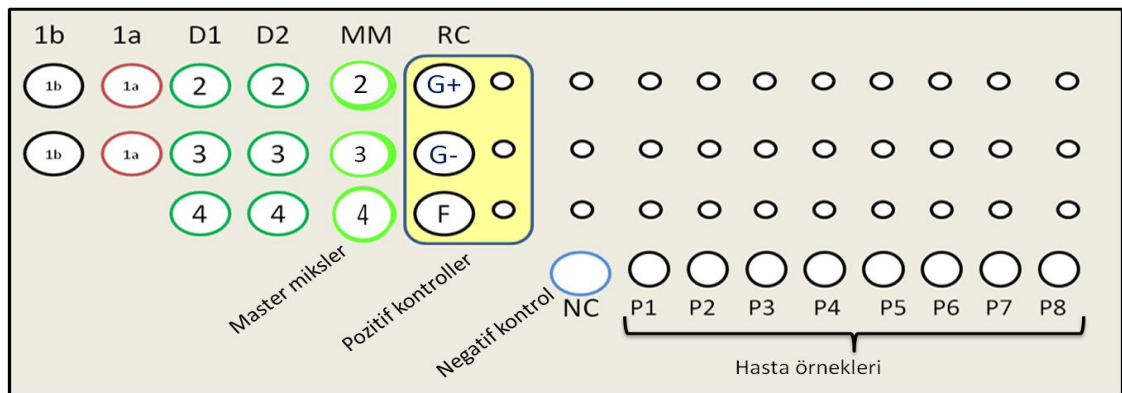
Kontaminasyon riskini azaltmak için DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu farklı odalarda çalışıldı. Ortam önceden çamaşır suyu ile temizlendi ve kullanılacak malzemeler steril edildi. Tek seferde 1 pozitif kontrol, 1 negatif kontrol ve 8 örnek amplifiye edildi.

LightCycler SeptiFast MGRADE kitinin içerisinde - 20°C'de bekleyen flakonlardan üretici firmanın önerileri doğrultusunda gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve mantarlar için 3 ayrı master miks hazırlandı.

Gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve mantarlar için ayrı ayrı hazırlanmış 3 adet pozitif kontrol, LightCycler SeptiFast MGRADE kitinin içerisinde çıkarılıp oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı.

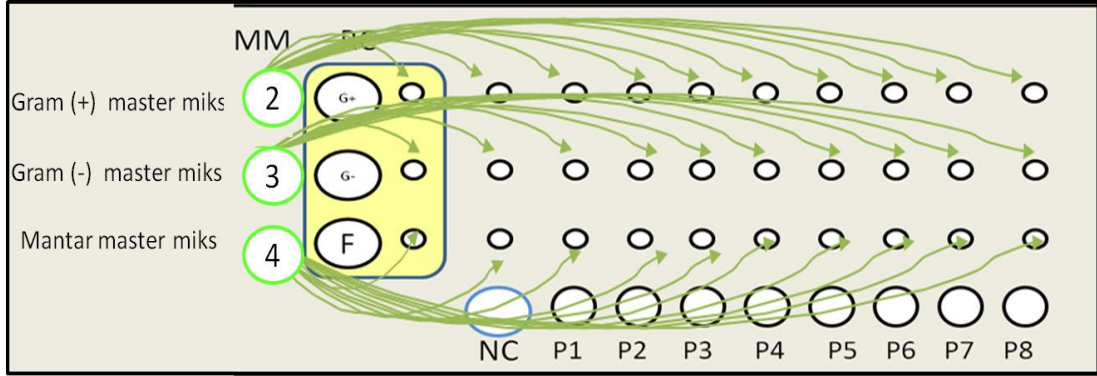
LightCycler SeptiFast MGRADE kitinin içinde bulunan negatif kontrol (NC) için de kan örnekleri ile aynı DNA ekstraksiyon işlemleri uygulandı ve -20°C'de saklandı. DNA ekstraksiyonu yapılmış hasta örnekleri ve negatif kontrol oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı.

LightCycler 2.0 cihazı için özel olarak üretilmiş 100 mikrolitrelik kapiller tüpler, steril penset yardımı ile soğutucu bloktaki ilgili kuyucuklara yerleştirildi (Şekil-5).



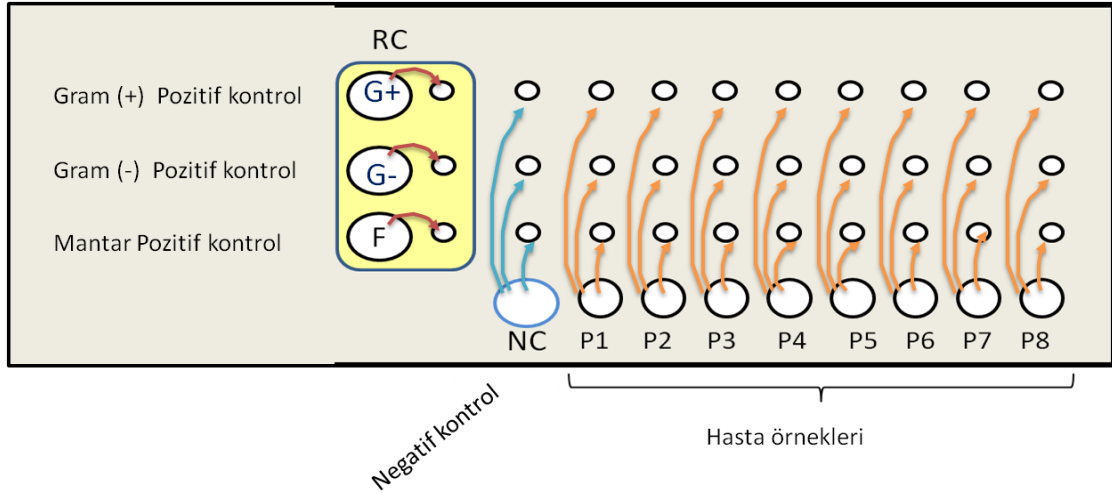
Şekil-5: Soğutucu bloktaki kuyucukların şematik gösterimi.

Gram pozitif bakteri, gram negatif bakteri ve mantarlar için hazırlanmış master mikserlerden (MM 2, MM 3, MM 4) 50'şer mikrolitre alınıp soldan sağa tüm kapiller tüplere dağıtıldı (Şekil-6).



**Şekil-6:** Master mikserlerin dağıtılması.

Negatif kontrol, hasta örnekleri ve en son pozitif kontrolden 50'şer mikrolitre dikey olarak ilgili kapiller tüplere dağıtıldıktan sonra özel kapatma kalemi ile kapiller tüplere kapakları takıldı (Şekil-7).



**Şekil-7:** Negatif kontrol, hasta örnekleri ve pozitif kontrollerin dağıtımı.

Kapağı kapatılmış kapiller tüpler özel aparatına yerleştirildikten sonra LC Carousel Centrifuge 2,0 cihazı ile santrifüj edildi.

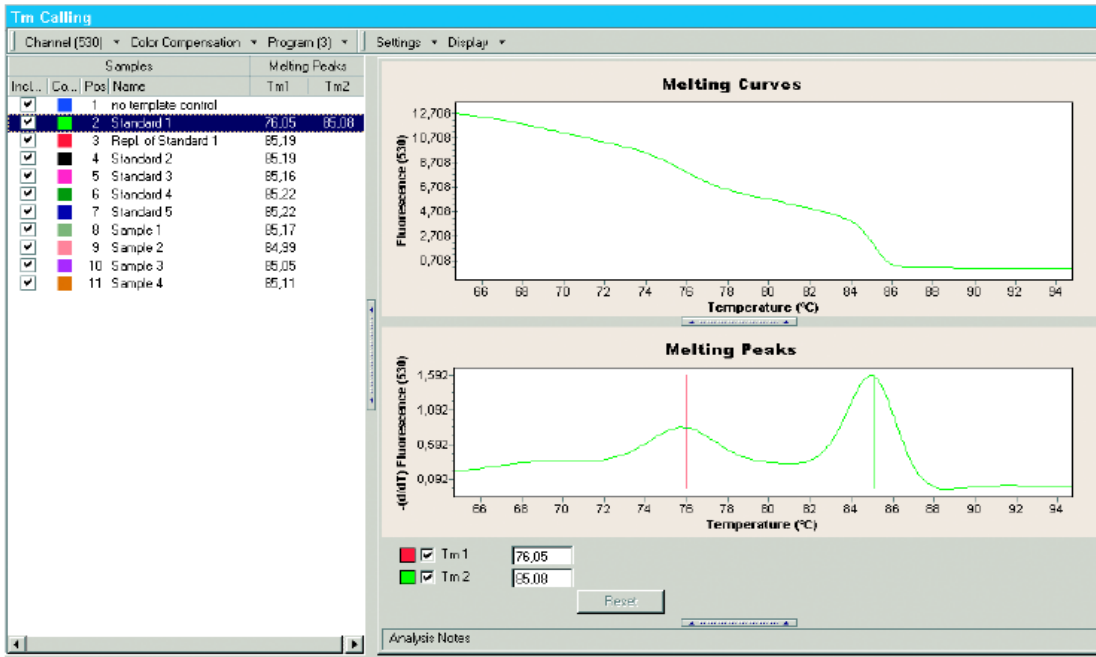
Bilgisayar üzerinden LightCycler 2,0 cihazı için gerekli ayarlamalar ve kontroller yapıldı. Santrifüj edilmiş kapiller tüpler LightCycler 2,0 cihazına yerleştirildi ve otomatik olarak amplifikasyon işlemi başlatıldı.



## PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Amplifikasyon sürecinde spesifik ürünlerin artışının gerçek zamanlı olarak (real time) saptanması için floresan boya ile işaretli hibridizasyon problemleri kullanıldı. Spesik PCR ürünleri artışına bağlı olarak oluşan ve yayılan floresan ışımalar, cihaz tarafından 4 farklı algılama kanalında (610, 640, 670 ve 705 nm) ölçüldü.

Amplifikasyon tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin özgülüğünü daha da pekiştirmek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapıldı. Manuel olarak erime pikleri (T<sub>m</sub>) belirlendi (Şekil-8).



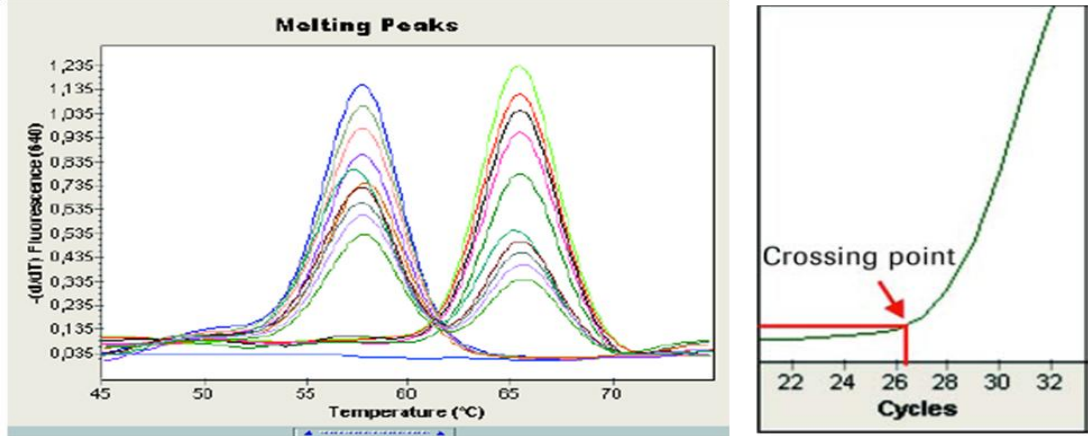
Şekil-8: Erime eğrisi analizi örneği.

Örneklerin ve kontrollerin erime eğrisi analizi, pik yüksekliği gibi birçok veri SeptiFast Identification Software (SIS, Roche Diagnostics) yazılımı ile analiz edildi.

SeptiFast sisteminde prob ve hedef DNA arasındaki homolojinin derecesine, sekans (dizi) uzunluğuna bağlı olarak erime eğrisinde değişiklikler olmaktadır.

SIS yazılımı gram pozitif bakteriler için erime piklerini (T<sub>m</sub>) ve amplifikasyon eğrisi geçiş noktasını (curve crossing point) baz alarak analiz yapmaktadır. Amplifikasyon eğrisi geçiş noktası, KNS ve streptokoklar için

kontaminasyon nedeni ile oluşabilecek yanlış pozitiflikleri azaltmak için değerlendirmeye alınmaktadır. Böylece iş akışı sırasındaki kontaminasyon nedeniyle saptanabilecek düşük konsantrasyondaki KNS'ler ve streptokoklar dikkate alınmamaktadır. Gram negatif bakteriler ve mantarlar için ise sistem tarafından erime pikleri (Tm) baz alınarak analiz yapılmaktadır (Şekil-9).



**Şekil-9:** Erime pikleri (Tm) ve amplifikasyon eğrisi geçiş noktası (curve crossing point).

SIS yazılımı, tüm verileri değerlendirdikten sonra otomatik olarak örnekte saptanan mikroorganizma türlerini ekrana yansıttı (Şekil-10). İnternal kontrol, pozitif kontrol veya negatif kontrol çalışmadığında analiz geçersiz sayıldı ve test tekrarlandı.

SeptiFast Identification Software 2.0.0.37

Click Print Button in order to print the results. (Step 2/2)

Roche

SeptiFast Identification Software 2.0.0.37 6/1/2012 9:11:28 page 1

Imported LC File:  
20120531\_septifasthastalar 1. grup

Last modified date: 6/1/2012 8:27:48  
Operator: System Admin  
LC Instrument-ID: LC\_16839  
LCS Version: LCS4 4.1.1.21  
Macro: SeptiFast\_2.0\_04469046001  
CCC File Name: SeptiFast\_CCO\_20120531\_01

Specimen	Assay	Data	Results	Flags
SeptiFast sample 1	G(+)		⊖	
	G(-)	ch640 t57.34 h0.52	K. pneumoniae/oxytoca	
SeptiFast sample 2	F		⊖	
	G(+)		⊖	
SeptiFast sample 3	G(-)		⊖	
	F	ch610 t64.24 h0.78	A. baumannii	
SeptiFast sample 4	G(+)		⊖	
	G(-)	ch610 t64.51 h0.02	A. baumannii	
SeptiFast sample 5	F		⊖	
	G(+)		⊖	
SeptiFast sample 6	G(-)	ch610 t64.00 h0.68	A. baumannii	
	G(+)	ch640 t57.12 h0.09	K. pneumoniae/oxytoca	
	F	ch610 t58.00 h0.87	A. fumigatus	
SeptiFast sample 7	G(+)		⊖	
	G(-)		⊖	
SeptiFast sample 8	F		⊖	
	G(+)		⊖	
SeptiFast sample 8	G(-)		⊖	
	F		⊖	

Run Flags

Assay Flags

Assay	Flags
G(+)	
G(-)	
F	

**Şekil-10:** PCR sonuç raporu örneği

## Kan Kültürü Alma

Klinisyen tarafından sepsis olduğundan şüphelenilen hastalardan, UÜ-SK Kan Kültürü Alınması Talimatı'na (Doküman kodu: TA-EÖK-37. Tarih: 04.05.2012) uygun olarak farklı venlerden, 5-30 dakika ara ile 2 veya 3 kan kültürü örneği alındı. Ancak PCR ile karşılaştırırken sadece eş zamanlı kan kültürü şişeleri değerlendirmeye alındı.

Cilt antisepsisi için girişim yapılacak ven bölgesi önce 30 saniye % 70'lik etil alkol veya %60'lık isopropil alkol ile ileri geri hareketler ile silindi, Sonra en az 30 saniye %1-2 povidon iyodin solüsyonu veya %2'lik klor heksidin solüsyonu ile merkezden periferde daireler çizilerek uygulandı. Uygulamayı takiben antiseptik etkinin oluşması için 1,5-2 dakika beklendi.

Kan kültür şişesi olarak BACTEC PLUS (+) Aerobic/F (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD) kullanıldı. Örnek alınmadan önce kan kültür şişesinin üzerindeki plastik kapak kaldırılıp %70'lik alkol ile silindi. Her bir kan kültür şişesi için 8-10 mililitre kan alındı. Kan kültür şişelerine kan konulduktan sonra da, lastik tıpa üzerindeki olası kanın temizlenmesi için tekrar %70'lik alkol ile silindi.

Kan kültür şişelerinin oda sıcaklığında 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmasına özen gösterildi. Laboratuvarda kan kültür şişeleri Bactec 9240 (BD, Sparks, MD, ABD) sisteminde inkübe edildi. Burada şişedeki pH değişimleri cihaz tarafından 7 gün boyunca her 10 dakikada bir kaydedildi. Pozitif sinyal alınan şişelerden %5 koyun kanlı agara (BD BBL™) pasaj yapıldıktan sonra 35<sup>0</sup>C'de 18-24 saat inkübe edildi. Oluşan koloniler Gram boyanma özelliğine göre ilgili otomatik identifikasyon paneline (BD Phoenix™ PMIC/ID-70 ve BD Phoenix™ NMIC/ID-99) 0,5 McFarland bulanıklık oluşacak şekilde aktarıldı. Paneller Phoenix™ 100 BD sisteminde (BD, Sparks, MD, ABD) inkübe edildi ve değerlendirildi.

## **Kan Kültürü Dışındaki Diğer Kültürler**

Klinisyenin isteği doğrultusunda alınan diğer örneklerden de rutin mikrobiyolojik prensiplere bağlı kalınarak kültürler yapıldı. Üreme olduğunda mikroorganizma identifikasyonu yapıldı ve antibiyotik duyarlılığı çalışıldı.

## **Bilgilerin Toplanması**

Hastada örnek alımı sırasında ateş, tansiyon, nabız bilgileri; üriner sonda, ventilatör, santral vasküler kateter varlığı örnek alan kişi tarafından kaydedildi.

Hastalara ait demografik (yaş, cinsiyet, boy, kilo) ve klinik bilgiler; immünsüpresyon durumu, geçirilmiş operasyon bilgileri, kullandığı antibiyotikler, Glasgow koma skoru, APACHE II skoru hasta dosyasından elde edildi ve Enfeksiyon Hastalıkları Konsültanı'na doğrulandı.

Hastaların biyokimyasal ve hematolojik laboratuvar bilgileri hastane içi elektronik bilgi işlem sisteminden elde edildi.

PCR örneği ile eş zamanlı olarak alınan kan kültürü şişesine ilişkin ayrıntılı bilgiler (kan kültür pozitifliği zamanı, üreme sonucu vb.) ve yakın dönemdeki olası enfeksiyon odaklarına ilişkin kültür sonuçları Mikrobiyoloji Laboratuvarı kayıtlarından elde edildi.

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

Elde edilen PCR sonuçları, çalışma sona erene kadar Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve klinisyenler ile paylaşılmadı.

## Verilerin Değerlendirilmesi

**Sepsis şiddeti (sepsis, ağır sepsis, septik şok):** ACCP/SCCM'nin 1991 yılında yaptıkları ortak bir toplantıda aldıkları kararlar doğrultusunda, konsültan enfeksiyon hastalıkları uzmanı eşliğinde değerlendirildi.

**Etken patojen:** Kontaminasyon olmayan kan kültürü üremeleri gerçek enfeksiyon etkeni olarak kabul edildi. PCR ile saptanan mikroorganizmanın gerçek enfeksiyon etkeni olup olmadığı retrospektif olarak; enfeksiyon odağı, kan kültürü ile uyumu ve diğer klinik örnek kültür sonuçlarına bakılarak değerlendirildi.

**Kan kültürü kontaminasyonu:** Epidermis florasında yer alan mikroorganizmalar (KNS'ler, difteroidler, streptokok türleri vs.) eş zamanlı olarak alınan iki kan kültürü şişesinden sadece birisinde üremiş ise, 48 saat içinde alınan iki kan kültüründen sadece birisi pozitif ise, olası enfeksiyon odaklarında (vasküler kateter vb.) aynı mikroorganizma ürememiş ise sonuç kontaminasyon olarak değerlendirildi.

**PCR kontaminasyonu:** PCR ile saptanan KNS ve streptokok türleri aşağıdaki kriterlere göre kontaminasyon olarak kabul edildi:

1. Eş zamanlı alınan kan kültürü negatif,
2. Kan kültüründeki kontaminan üreme için geçen zaman >24 saat,
3. Diğer kültürlerde mikroorganizma üremesi yok.

**Önceden antibiyotik tedavisi alma ve almama:** Örnek alımından önceki 48 saat içinde antibiyotik tedavisi alan hastalar “önceden antibiyotik tedavisi almış” olarak tanımlandı.

Örnek alımından önceki 48 saat içinde antibiyotik kullanmayan hastalar ise “önceden antibiyotik tedavisi almamış” olarak tanımlandı.

**PCR ile tedavi değişikliği:** PCR ile saptanan mikroorganizmanın lokal antimikrobiyal duyarlılık profili dikkate alınarak iki araştırmacı tarafından bağımsız olarak değerlendirildi.

Saptanan mikroorganizma kullanılan antibiyotiklerin en az birine duyarlı ise ampirik tedavi uygun olarak nitelendirildi, değil ise tedavi değişikliği gerekli denildi.

PCR henüz sepsis tanısında altın standart olmadığı için ve sınırlı sayıda mikroorganizmayı saptayabildiği için PCR negatif sonuca göre yapılabilecek deeskalasyonlar dikkate alınmadı.

### **İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler SPSS 13,0 (Chigago, IL) programında yapıldı. Kategorik değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları için Fisher'in ki-kare testi kullanıldı.

Kan kültürü ve PCR yöntemleri arasındaki uyum Cohen'in kappa katsayısı kullanılarak değerlendirildi.

## BULGULAR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 14 Mayıs 2012 ve 07 Kasım 2012 tarihleri arasında yatmakta olan ve nozokomiyal sepsis tanısı alan 67 hastadan toplam 78 sepsis atağına ait örnek çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen 24'ü kadın(%36), 43'ü erkek(%64) erişkin hastada yaş ortalaması 55,7(21-95) idi.

Kontrol grubu olarak 11'i kadın(%50), 11'i erkek(%50) toplam 22 sağlıklı erişkinden örnek alındı. Kontrol grubunda yaş ortalaması 39 (28-62) idi. En sık alta yatan hastalıkların hipertansiyon ve diabetes mellitus olduğu görüldü. Hastaların bazılarında birden çok sayıda alta yatan hastalık mevcut iken, % 29,8'inde alta yatan herhangi bir hastalık yoktu (Tablo-6).

**Tablo-6:** Nozokomiyal sepsis tanısı alan olguların komorbid hastalıkları.

Alta yatan hastalık	Sayı	Yüzdesi
Diabetes Mellitus	10	%14,9
Hipertansiyon	16	%23,8
Kronik akciğer hastalığı	9	%13,4
Kronik kalp hastalığı	6	%8,9
Kronik renal yetmezlik	5	%7,4
Merkezi sinir sistemi ve serebrovasküler hastalık	9	%13,4
Hematolojik malignite	5	%7,4
Solid organ malignitesi	8	%11,9
Solid organ transplantasyonu	5	%7,4
Diğer (romatoid artrit, talasemi minör)	2	%2,9
Yok	20	%29,8

Hastaların 55'i(%82) yoğun bakım ünitelerinde yatmakta iken, 12'si(%18) yoğun bakım dışı kliniklerde yatmakta idi. Yoğun bakım ünitelerindeki hastalar ağırlıklı olarak Anestezi ve Reanimasyon bölümünde tedavi görmekteydi (n: 45).

Yoğun bakımda yatan ve sepsis atağı geçiren hastalarda APACHE II skoru ortalama 18,4 (7-43) olarak hesaplandı.

Sepsis atağı geçiren hastaların 63'ü(%80,7) mekanik ventilasyon desteğinde idi. Hastaların 71'inde(%91) üriner sonda ve 64'ünde(%82) santral venöz kateter mevcut idi.

Sepsisi şiddetine göre değerlendirildiğimizde ataklar sırasında hastaların %29,5'i sepsis, %38,5'i ağır sepsis, %32'si septik şokta idi. Hastaların yatış yerine göre sepsisin şiddetini sınıfladığımızda, yoğun bakımda sepsis gelişen hastalarda, ağır sepsis ve septik şok oranları daha yüksek bulundu (Tablo-7).

**Tablo-7:** Sepsis artaklarının geliştiği bölümler ve sepsis şiddeti.

Yoğun bakımda gelişen sepsis atakları (n: 64)		
Sepsis	13	(%20,3)
Ağır (ciddi) sepsis	27	(%42,2)
Septik şok	24	(%37,5)
Yoğun bakım dışı kliniklerde sepsis atakları (n: 14)		
Sepsis	10	(%71,4)
Ağır (ciddi) sepsis	3	(%21,5)
Septik şok	1	(%7,1)

Her ne kadar hastaların tamamında ölçüm yapılamamış olsa da, ölçüm yapılabilen sepsis ataklarının çoğunda C-Reaktif Protein (CRP) ve prokalsitonin (PCT) değerlerinin yüksek olduğu saptandı (Tablo-8).



**Tablo-8:** Sepsis atağı sırasında hastaların CRP ve PCT değerleri

C-Reaktif Protein (CRP) ölçülen atak sayısı:	54
CRP >0,5 mg/dL	54 (%100)
CRP >5 mg/dL	45 (%83,3)
Prokalsitonin (PCT) ölçülen atak sayısı:	38
PCT >0,5 ng/dL	34 (%89,4)
PCT >2ng/dL	23 (%60,5)

Tüm sepsis atağı geçiren hastalarda 28 gün içerisinde mortalite oranı %41,7, hastane içi mortalite oranı ise %49,2 olarak bulundu. Daha ayrıntılı irdelediğimizde yoğun bakımda yatanlarda(%44,4) ve septik şok(%66,6) olgularında 28 gün içinde mortalite oranınının daha yüksek olduğu belirlendi.

Sepsis ataklarına en sık neden olan enfeksiyon odağının yoğun bakımda akciğer, yoğun bakım dışında ise üriner sistem ve santral venöz kateterler olduğu saptandı. Bazı hastalarda birden çok enfeksiyon odağı bulunmasına rağmen, 14 hastada enfeksiyon odağı saptanamadı (Tablo-9).

**Tablo-9:** Sepsis atakları sırasında mikrobiyolojik olarak dokümanite edilmiş enfeksiyon odakları.

	Yoğun bakım (n:64)	Yoğun bakım dışı (n:14)	Toplam (n:78)
Akciğer	<b>41 (%64)</b>	1 (%7,1)	42 (%53,8)
Üriner sistem	18 (%28,1)	<b>3 (%21,4)</b>	21 (%26,9)
Santral venöz kateter	26 (%40,6)	<b>3 (%21,4)</b>	29 (%37,1)
Batın	3 (% 4,6)	1 (%7,1)	4 (%5,1)
Deri ve yumuşak doku	6 (%9,3)	0 (%0)	6 (%7,6)
Odak saptanamayan	7 (%10,9)	7 (%50)	14 (17,9)

Kontrol grubunda kan kültürü pozitifliği saptanmadı. Sepsis hasta grubundaki 4(%5,2) kan kültürü üremesi kontaminasyon olarak değerlendirildi. Sepsis ataklarında kan kültürü ile etken mikroorganizmayı saptama oranı %32 olarak hesaplandı (Tablo-10).

**Tablo-10:** Sepsis hasta grubu ve kontrol grubundaki kan kültürü sonuçları.

	Sepsis grubu (n:78)	Kontrol grubu (n:22)
Kan kültürü pozitif (etken)	25 (%32)	0 (%0)
Kan kültürü pozitif (kontaminasyon)	4 (%5,1)	0 (%0)
Kan kültürü negatif	49 (%62,9)	22 (%100)

PCR ile kontrol grubundaki örneklerden biri pozitif sonuç verdi. Sepsis hasta grubundaki 1 pozitif PCR sonucu kontaminasyon olarak değerlendirildi. Sepsis ataklarında PCR'ın etken mikroorganizmayı saptama oranı %44,9 olarak hesaplandı (Tablo-11).

**Tablo-11:** Sepsis hasta grubu ve kontrol grubundaki PCR sonuçları.

	Sepsis grubu (n:78)	Kontrol grubu (n:22)
PCR pozitif (etken)	35 (%44,9)	0 (%0)
PCR pozitif (kontaminasyon)	1 (%1,3)	1 (%4,5)
PCR negatif	42 (%53,8)	21 (%95,5)

Sepsis ataklarında kan kültürü ile PCR sonuçlarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda, iki yöntem arasında istatistiksel olarak orta derecede uyum olduğu görüldü (Tablo-12).

**Tablo-12:** Sepsis ataklarında kan kültürü ve PCR sonuçlarının uyumu.

	Kan kültürü pozitif	Kan kültürü negatif	Kan kültürü kont*	Toplam
PCR pozitif	20 (%25,6)	15 (%19,2)	-	35 (%44,9)
PCR negatif	5 (%6,4)	33 (%42,3)	4 (%5,1)	42 (%53,8)
PCR kont*	-	1 (%1,3)	-	1 (%1,3)
Toplam	25 (%32)	49 (%62,9)	4 (%5,1)	78 (%100)

Kappa değeri: 0,445 ( p<0,001)

Genel uyum oranı: 20+33/78: <b>%67,9</b>	(%95 CI** %58-78)
PCR'ın pozitif kan kültürü ile uyumu: 20/25: <b>%80</b>	(%95 CI** %71-89)
PCR'ın negatif kan kültürü ile uyumu: 33/49: <b>%67,3</b>	(%95 CI** %57-78)

\*kont: Kontaminasyon

\*\*CI: Güven aralığı

Sepsis atağı sırasında gönderilen 78 kan kültürü çiftinden 29'unda hepsi de bakteri olan toplam 31 mikroorganizma türü izole edildi. İzole edilen 31 bakteri türünden 27 tanesi etken olarak kabul edilirken, geriye kalan 4 mikroorganizma türünün ise kontaminasyon olduğuna karar verildi (1 *Corynebacterium matruchotii*, 1 *Staphylococcus capitis* spp. ureolyticus, 2 *Staphylococcus epidermidis*). Bu sonuçlara göre kan kültüründen izole edilen mikroorganizma türlerinin %87'si etken, %13'ü kontaminasyon olarak değerlendirildi (Tablo13).

**Tablo-13:** Kan kültürü ile izole edilen mikroorganizma türleri sayısı.

Mikroorganizma	Etken	Kont*	Toplam
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4		4
<i>Corynebacterium matruchotii</i>		1	1
<i>Escherichia coli</i>	1		1
<i>Enterococcus faecalis</i>	2		2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1		1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6		6
<i>Staphylococcus aureus</i>	2		2
<i>Staphylococcus capitis</i> spp. <i>ureolyticus</i>	1	1	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	2	5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3		3
<i>Staphylococcus hominis</i>	2		2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2		2
Toplam	27 (%87)	4 (%13)	31 (%100)

\* Kont: Kontaminasyon

Kan kültüründe üreyen, kontaminasyon veya etken olarak kabul edilen toplam 31 mikroorganizma türü dikkate alındığında, kan kültürü dışındaki diğer kültür sonuçları ile uyumu %38,7 idi. Sadece etken kabul edilen 27 mikroorganizma türü dikkate aldığımızda ise kan kültürü dışındaki diğer kültür sonuçları ile uyumu % 44,4'e yükseldi (Tablo-14).

**Tablo-14:** Kan kültüründe üreyen mikroorganizmaların diğer bölgelerden alınan kültürler ile uyumu.

Diğer kültürler ile	Uyumsuz	Uyumlu	Toplam
<i>A. baumannii</i>	2	<b>2</b> (2 ETA <sup>a</sup> )	4
<i>C. matruchoyii</i>	1 (1 kont*)	-	1
<i>E. coli</i>	-	<b>1</b> (1 yara)	1
<i>E. faecalis</i>	2	-	2
<i>K. oxytoca</i>	1	-	1
<i>K. pneumoniae</i>	1	<b>5</b> (3 ETA <sup>a</sup> , 1 safra, 1 v.kateter <sup>b</sup> )	6
<i>S. aureus</i>	1	<b>1</b> (1 idrar)	2
<i>S. capitis spp ureolyticus</i>	2 (1 kont*)	-	2
<i>S. epidermidis</i>	5 (2 kont*)	-	5
<i>S. haemolyticus</i>	1	<b>2</b> (2 v.kateter <sup>b</sup> )	3
<i>S. hominis</i>	2	-	2
<i>S. maltophilia</i>	1	<b>1</b> (1 v.kateter <sup>b</sup> )	2
Toplam (etken)	15 (%55,5)	<b>12 (%44,4)</b>	<b>27</b>
Toplam (kont* + etken)	19 (%61,2)	<b>12 (%38,7)</b>	<b>31</b>

\* kont: Kontaminasyon

<sup>a</sup> ETA: Endotrakeal aspirat kültürü

<sup>b</sup> v.kateter: Santral venöz kateter kültürü

Sepsis atağı sırasında PCR için alınan 78 örneğin 36'sında toplam 53 mikroorganizma türüne ait DNA saptandı. Bu mikroorganizma türlerinin 49'u bakteri, 4 tanesi ise mantar türü idi. Sadece 1 mikroorganizma (KNS) etken olarak kabul edilmedi. Dolayısıyla PCR ile saptanan mikroorganizmaların %98,1'i etken olarak kabul edildi (Tablo-15).

**Tablo-15:** PCR ile saptanan mikroorganizma türleri.

<b>Mikroorganizma</b>	<b>Etken</b>	<b>Kont*</b>	<b>Toplam</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7		7
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1		1
<i>Candida albicans</i>	1		1
<i>Candida parapsilosis</i>	2		2
<i>Enterobacter cloacae / aerogenes</i>	5		5
<i>Enterococcus faecalis</i>	5		5
<i>Enterococcus faecium</i>	1		1
<i>Escherichia coli</i>	2		2
<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i>	8		8
<i>Koagülaz negatif stafilokok (KNS)</i>	13	1	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3		3
<i>Staphylococcus aureus</i>	2		2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2		2
Toplam	52 (%98,1)	1 (%1,9)	53

\* Kont: Kontaminasyon

PCR ile saptanan kontaminasyon ve etken kabul edilen tüm mikroorganizma türlerinin, kan kültürü dışındaki diğer kültür sonuçları veya mikrobiyolojik incelemeler ile uyumu %54,7 olarak bulundu. Sadece etken olduğu kabul edilen mikroorganizma türlerinin kan kültürü dışındaki diğer kültür sonuçları ve mikrobiyolojik incelemeler ile uyumu ise %55,7 olarak hesaplandı (Tablo-16).

**Tablo-16:** PCR ile saptanan mikroorganizmaların diğ er vücut bölgelerinden alınan kültürler ile uyumu.

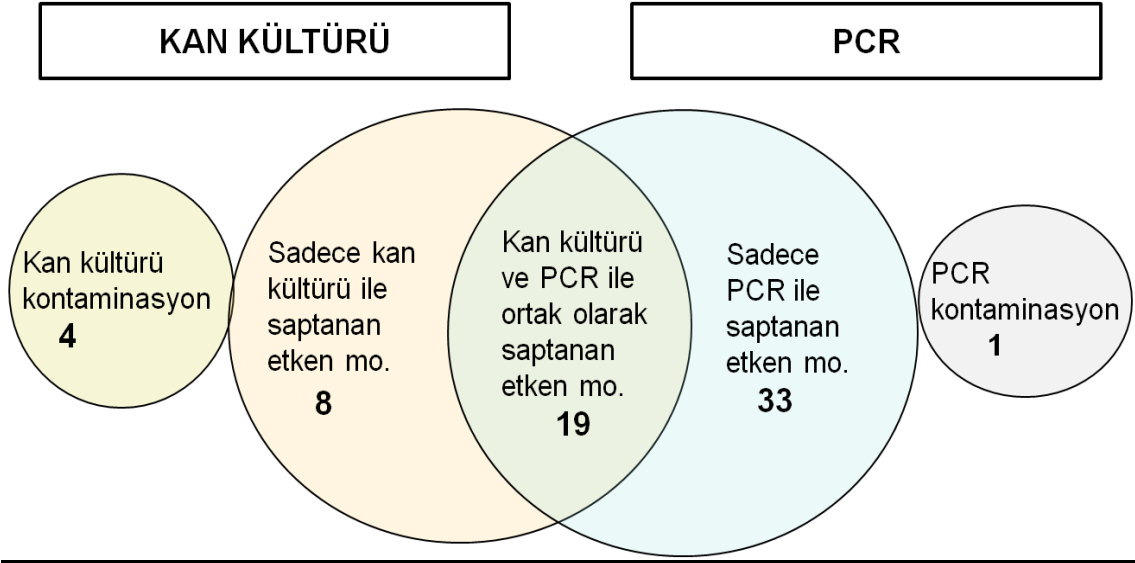
Diğ er kültürler ile	Uyumsuz	Uyumlu	Toplam
<i>A. baumannii</i>	1	<b>6</b> (5 ETA <sup>a</sup> , 1 ETA <sup>a</sup> + v. kateter <sup>b</sup> )	7
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<b>1</b> (1 yüksek serum galaktomannan)	1
<i>Candida albicans</i>	-	<b>1</b> (1 v. kateter <sup>b</sup> )	1
<i>Candida parapsilosis</i>	1	<b>1</b> (1 v. kateter <sup>b</sup> )	2
<i>E. cloacae / aerogenes</i>	5	-	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	<b>4</b> (2 yara-pü, 2 v. kateter <sup>b</sup> )	5
<i>Enterococcus faecium</i>	-	<b>1</b> (1 ETA <sup>a</sup> )	1
<i>Escherichia coli</i>	-	<b>2</b> (2 yara-pü)	2
<i>K. pneumoniae/ oxytoca</i>	1	<b>7</b> (1 yara-pü, 2 v.kateter <sup>b</sup> , 1 safra, 2 ETA <sup>a</sup> , 1 ETA <sup>a</sup> + dren mayii)	8
KNS	12 (1kont*)	<b>2</b> (2 v.kateter <sup>b</sup> )	14
<i>P. aeruginosa</i>	1	<b>2</b> (1safra, 1 v.kateter <sup>b</sup> )	3
<i>S. aureus</i>	1	<b>1</b> (1 idrar)	2
<i>S. maltophilia</i>	1	<b>1</b> (1 v.kateter <sup>b</sup> )	2
Toplam (etken)	23 (%44,2)	<b>29 (%55,7)</b>	52
Toplam (kont <sup>a</sup> +etken)	24 (%45,2)	<b>29 (%54,7)</b>	53

\* kont: Kontaminasyon

<sup>a</sup> ETA: Endotrakeal aspirat kültürü

<sup>b</sup> v.kateter: Santral venöz kateter kültürü

Kan kültürünü ve PCR'ı birlikte değerlendirdiğimizde, 78 sepsis atağında toplam 65 mikroorganizma türü izole edilmiştir. Bu türlerin 19 tanesi her iki yöntem ile aynı atakta izole edilmiştir. Kan kültürü, PCR'ın saptayamadığı 8'i etken, 4'ü kontaminasyon olarak değerlendirilen toplam 12 mikroorganizma türünü üretmiştir. PCR ise kan kültürünün saptayamadığı 33'ü etken, biri kontaminasyon olarak değerlendirilen toplam 34 mikroorganizma türünü saptamıştır (Şekil-11).



**Şekil-11:** Sepsis hastalarından kan kültürü ile ve PCR ile saptanan mikroorganizma türlerinin sayısı.

Kan kültürü ve PCR tarafından saptanan mikroorganizma türlerini ele aldığımızda iki yöntem arasındaki uyumun istatistiksel olarak yeterli olmadığı görüldü (Tablo-17).

**Tablo-17:** Kan kültürü ve PCR'ın izole edilen mikroorganizmalar bazında uyumu.

	Kan kültürü pozitif	Kan kültürü negatif	Kan kültürü kont*	Toplam
PCR pozitif	19	33	-	52
PCR negatif	8	33	4	45
PCR kont*	-	1	-	1
Toplam	27	67	4	98

Kapa değeri: 0,160 p=0,072

PCR'in kan kültürü ile genel uyumu: 19+33/98: %53 (%95 CI** %43-63)
PCR'in pozitif kan kültürü ile uyumu: 19/27: % 70,3 (%95 CI** %61-79)
PCR'in negatif kan kültürü ile uyumu: 33/67: %49,2 (%95 CI** %39-59)

\*kont: kontaminasyon, \*\*CI: güven aralığı



Kan kültüründe üreyen ve etken olarak kabul edilen mikroorganizma türlerinin, PCR ile de saptanması oranı %70,37 olarak hesaplandı. Özellikle *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* türlerinde kan kültürü ile PCR sonuçları arasında daha yüksek oranda uyum söz konusu idi.

Ancak kan kültürü ile üretilen ve etken olarak kabul edilen 27 mikroorganizma türünden 8 tanesi(%29,6) PCR ile saptanamamıştır. Bir kan kültürü setinde aynı anda üremesi saptanan *E.faecalis* ve *S. epidermidis* bakterileri, etken olduğu düşünülmesine rağmen PCR ile saptanamamıştır. Yine farklı sepsis ataklarında kan kültürü ile üretilen 2 adet *A. baumannii*,1 adet *E. faecalis*, 3 adet KNS türü (*S. capitis* spp ureolyticus, *S. hominis*,*S. haemolyticus*) etken olarak kabul edilmesine ve PCR master listesinde yer almasına rağmen PCR ile saptanamamıştır.

PCR ile saptanan ve etken olarak kabul edilen 52 mikroorganizma türünden sadece 19 tanesi (%36,5) kan kültüründe üretilebilmiştir. Yani PCR kan kültürüne göre fazladan 33 adet etken olduğu düşünülen mikroorganizma türü saptadı. PCR özellikle *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* gibi mantar türlerini ve *Pseudomonas aeruginosa*'yı saptamada kan kültüründen daha iyi bir performans gösterdi (Tablo-18).

**Tablo-18:** Sepsis ataklarında kan kültürü ve PCR ile saptanan mikroorganizma türleri.

Mikroorganizma saptanan yöntem	Sadece kan kültürü	Kan kültürü ve PCR	Sadece PCR	Toplam
<i>A.baumannii</i>	2 (etken)	2 (etken)	5 (etken)	9 (etken)
<i>A. fumigatus</i>			1 (etken)	1 (etken)
<i>C. albicans</i>			1 (etken)	1 (etken)
<i>C. parapsilosis</i>			2 (etken)	2 (etken)
<i>C. matruchoyii</i>	1 (kont*)			1 (kont*)
<i>E. cloacae / aerogenes</i>			5 (etken)	5 (etken)
<i>E. faecalis</i>	2 (etken)		5 (etken)	7 (etken)
<i>E. faecium</i>			1 (etken)	1 (etken)
<i>E. coli</i>		1 (etken)	1 (etken)	2 (etken)
<i>K. pneumoniae/ oxytoca</i>		7 (etken)	1 (etken)	8 (etken)
Koagülaz negatif stafilokok (KNS)	4 (etken) + 3 (kont*)	5 (etken)	8 (etken) + 1 (kont*)	17 (etken) + 4 (kont*)
<i>P. aeruginosa</i>			3 (etken)	3 (etken)
<i>S. aureus</i>		2 (etken)		2 (etken)
<i>S. maltophilia</i>		2 (etken)		2 (etken)
<b>Toplam</b>	<b>12</b> (8 etken) (4kont*)	<b>19</b> (19 etken) (0 kont*)	<b>34</b> (33 etken) (1 kont*)	<b>65</b> (60 etken) (5 kont*)

\* kont: Kontaminasyon

Sepsis atağı sırasında birden fazla mikroorganizma saptanan 2 adet kan kültürü seti var idi. PCR ile ise tek seferde birden çok mikroorganizma saptayabilme yeteneğinin daha fazla olduğu görüldü. PCR ile 7 örnekte aynı anda ikişer tane, 5 örnekte ise aynı anda 3 tane mikroorganizma türü saptandı (Tablo-19).

**Tablo-19:** Tek seferde birden çok mikroorganizma türü saptanan sepsis atakları

Yöntem	Birlikte izole edilen mikroorganizmalar
Kan kültürü	<i>E.faecalis</i> + KNS*
Kan kültürü	<i>E.coli</i> + <i>K. Oxytoca</i>
PCR	<i>E.coli</i> + <i>E. faecalis</i> + KNS*
PCR	<i>C. parapsilosis</i> + <i>E. cloacae/ aerogenes</i> + KNS*
PCR	<i>A.fumigatus</i> + <i>A.baumannii</i> + <i>K. pneumoniae/ oxytoca</i>
PCR	<i>A.baumannii</i> + <i>E. cloacae/ aerogenes</i> + KNS*
PCR	<i>E. faecalis</i> + <i>E.coli</i> + <i>K. pneumoniae/ oxytoca</i>
PCR	<i>E. faecalis</i> + KNS*
PCR	<i>E. faecium</i> + <i>A.baumannii</i>
PCR	<i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae/ oxytoca</i>
PCR	<i>K. pneumoniae/ oxytoca</i> + KNS*
PCR	<i>K. pneumoniae/ oxytoca</i> + <i>E. faecalis</i>
PCR	<i>C. albicans</i> + KNS*
PCR	<i>A.baumannii</i> + KNS*

\*KNS: Koagülaz negatif stafilokok.

Hem kan kültürü, hem de PCR ile çoklu olarak saptanan tüm mikroorganizma türleri etken olarak kabul edildi.

Yoğun bakım ve yoğun bakım dışında gelişen sepsis ataklarını ayrı ayrı değerlendirdiğimizde her iki grupta da PCR'ın kan kültüründen daha yüksek oranda etken mikroorganizma saptandığı görüldü. Öte yandan PCR'ın sepsis ataklarında etken mikroorganizmayı yakalama oranı yoğun bakımda, yoğun bakım dışına göre daha yüksekti (Tablo-20).

**Tablo-20:** Yoğun bakım ve yoğun bakım dışında gelişen sepsis ataklarında kan kültürü ve PCR'in etken mikroorganizmayı saptama sayıları ve oranları.

	Yoğun bakım (n: 64 )	Yoğun bakım dışı (n:14)
Kan kültürü pozitifliği	22 (%34,3)	3 (%21,4)
PCR pozitifliği	30 (%46,8)	5 (%35,7)

(p= 1,00)

Ancak istatistiksel olarak yoğun bakım ve yoğun bakım dışında gelişen sepsis ataklarında kan kültürü ve PCR pozitifliği oranları arasında anlamlı bir fark bulunamadı (p= 1,00).

Örnek alımı öncesi antibiyotik kullanılan 45 sepsis atağında kan kültürü pozitifliği %28,8 oranında, PCR pozitifliği % 46,6 oranında gerçekleşti (Tablo-21). Fakat istatistiki olarak sepsis atağı öncesi antibiyotik alan ve almayan hastalar arasında kan kültürü ve PCR pozitifliği açısından anlamlı bir fark görülemedi (p=0,725).

**Tablo-21:** Örnek alımı öncesi antibiyotik alımı olan ve olmayan sepsis ataklarında, kan kültürü ve PCR yönteminin pozitif sonuç verme oranları.

	Antibiyotik alanlarda* (n: 45)	Antibiyotik almayanlarda** (n:33)
Kan kültürü pozitifliği	13 (%28,8)	12 (%36,3)
PCR pozitifliği	21 (%46,6)	14 (%42,4)

(p= 0,725)

\*: Kan örneği alınırken antibiyotik alan hastalar.

\*\* :Kan örneği alınırken son 48 saatte antibiyotik almayan hastalar.

Sepsis atağı öncesi antibiyotik almaya başlamış olgularda kan kültürü ile etken olduğu düşünülen 14 mikroorganizma türü saptanmış iken PCR yöntemi ile bu sayı 33 olmuştur (Tablo-22). Ancak bu fark istatistiki olarak anlamlı bulunamamıştır (p=0,450).

**Tablo-22:** Örnek alımı öncesi antibiyotik alımı olan ve olmayan sepsis ataklarında, kan kültürü ve PCR ile saptanan mikroorganizma türleri sayısı.

	Antibiyotik alanlarda* (n: 45)	Antibiyotik almayanlarda** (n:33)
Kan kültürü ile saptanan mikroorganizma türü sayısı	14	13
PCR ile saptanan mikroorganizma türü sayısı	33	19

(p= 0,450 )

\*: Kan örneği alınırken antibiyotik alan hastalar

\*\* :Kan örneği alınırken son 48 saatte antibiyotik almayan hastalar

Sepsis hastalarında kan kültürü ve PCR birlikte değerlendirildiğinde sepsis ataklarında etkeni saptama oranı %51,2 olarak bulundu.

Laboratuvarımızda kullandığımız kan kültürü sisteminde bakteri üremedi demek için 7 gün beklenmektedir. Laboratuvar rutin işleyişi içinde ise bu çalışma dahilindeki kan kültüründe üreme olmayan şişelerde (49 sepsis hastası ve 22 kontrol grubunda) ortalama sonuçlanma süresi 185 saat (7 gün 17 saat) olarak hesaplandı.

Sepsis ataklarında bakteri üreyen (kontaminasyon ve etken) toplam 29 kan kültürü örneğinde, üreme olduğunu gösteren pozitif sinyalin oluşumu ortalama 37,8 saat (1 gün 13 saat) sonra gerçekleşmiştir. Bakteri identifikasyonu ise ortalama 87,2 saatte (3 gün 15 saat) gerçekleştirilmiştir.

Üremelerin etken olduğu düşünülen kan kültürlerinde (n:25) pozitif sinyal verme süresi ortalama 37,2 saatte, örnek alımından bakteriyel identifikasyon sonuçlana kadar geçen süre ortalama 84,4 saatte gerçekleşmiştir.

Üremelerin kontaminasyon olduğu düşünülen örneklerde (n:4), pozitiflik süresi ortalama 41,6 saat, identifikasyon sonuçlanması ise ortalama 104,7 saat sürmüştür.

PCR ve kan kültürü sonuçlarının uyumlu pozitif olduğu örneklerde (n:18) ortalama pozitif sinyal oluşma süresi 38,4 saat, ortalama identifikasyon süresi ise 87,5 saat olmuştur.

PCR ile mikroorganizma DNA ekstraksiyonu ve identifikasyon süresi aynı anda çalışılan örnek sayısına ve deneyim artışına bağlı değişiklikler göstermiş olsa da ortalama 6 saat 15 dakika sürmüştür.

Toplam 78 sepsis atağında PCR sonuçları ile retrospektif olarak değerlendirme yapıldığında, tedavi değişikliği yapılabilecek 10 atak (%12,8) olduğuna karar verildi. Bu tedavi değişikliklerinden birisi antifungal değiştirilmesi, ikisi mevcut ampirik tedaviye yeni antibiyotik eklenmesi, yedisi ise gerekli antibiyotiğe daha erken başlanabilmesi şeklinde olabileceği belirlendi (Tablo-23).

**Tablo-23:** PCR sonuçlarına göre sepsis ataklarında yapılabilecek tedavi değişiklikleri.

<b>Antifungal değiştirilebilir (n:1)</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i> sonucu öğrenildikten sonra flukonazol kesilip fungizon başlanabilirdi (n:1).
<b>Antibiyotik eklenebilir (n:2)</b>
<i>E. faecalis</i> sonucunun öğrenilmesi ve hastada VRE kolonizasyonu öyküsü olması nedeniyle teikoplanin kesilip, daptomisin başlanabilirdi (n:1).
PCR ile <i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i> sonucu öğrenildikten sonra sefepim başlanabilirdi (n:1).
<b>Antibiyotik daha erken başlanabilir (n:7)</b>
<i>A. baumannii</i> için kolistin daha erken başlanabilirdi. Ardışık kan kültüründe sadece kolistsine duyarlı <i>A. baumannii</i> üremiş ancak hasta örnek alımından 2 gün sonra kolistin başlanamadan ex olmuş (n:1).*
<i>A. baumannii</i> için kolistin daha erken başlanabilirdi. Hastanın diğer kültürlerinde de sadece kolistsine duyarlı <i>A. baumannii</i> üremeleri olmuş (n:2).*
KNS için teikoplanin daha erken başlanabilirdi. Eş zamanlı kan kültüründe de metisiline dirençli KNS üremesi olmuş (n:2).**
<i>S. maltophilia</i> için trimetoprim/sülfometaksazol daha erken başlanabilirdi. Kan kültüründe de <i>S. maltophilia</i> üremesi olmuş (n:2).

\* Hastanemizde yoğun bakım hastalarından üretilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının büyük kısmı kolistin dışındaki antibiyotiklere direnç göstermektedir.

\*\* Hastanemizde yatan hastaların çoğunda özellikle de katetere bağlı enfeksiyonlardan izole edilen KNS'lerin çoğu metisiline dirençli suşlar olmaktadır.

## TARTIŞMA

Sepsis tanısında canlı bakteri ve mantarları üretebilen, ayrıca antibiyotik duyarlılığı çalışılmasına imkan veren kan kültürü, klinisyenler için en önemli tanı ve doğrulama yöntemidir (28, 29).

Ancak kan kültür sistemlerinin duyarlılığı hala istenen seviyede değildir. Son yıllarda sepsis tanılı değişik hasta gruplarında yapılmış olan çalışmalarda kan kültürü pozitifliğinin %50'yi pek aşamadığı bildirilmiştir (29, 32-44).

Kan örneği almadan önce antimikrobiyal tedavi uygulanması kan kültürü duyarlılığının daha da azalmasına neden olmaktadır (39).

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 (33,48).

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 mikroorganizma identifikasyonuna 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 (51, 52).

Kan kültür sistemlerindeki yetersizlikler nedeniyle sepsis tanısında başka metotlar gündeme gelmiştir. Çalışmamızda bu yeni metotlardan direkt olarak kan örneğinden, yaklaşık 6 saatte, sepsis ile ilişkili 25 önemli bakteri ve mantar türü DNA'sının varlığını saptayabilen, multipleks real time PCR temelli yöntemi (LightCycler™ SeptiFast) test ettik.

SeptiFast ile birçok hasta grubunda, yoğun bakım ünitelerinde (33, 40, 41, 62-65), yoğun bakım dışı kiniklerde (29), İmmünkompromize veya nötropenik hastalarda (36, 44, 45, 63, 66), hastane genelinde (34, 38, 39, 42,

43,67) ve toplum kökenli sepsisleri araştırmak için acile başvuran hastalarda (35, 37, 68) pek çok çalışma yapılmıştır (Tablo-23).

**Tablo-23:** SeptiFast kullanılarak yapılan çalışmalarda sepsis hastalarının seçildiği gruplar ve ele alınan sepsis atakların sayısı.

Çalışma	Hasta grubu	Örnek sayısı
F. Bloos ve ark. 2010 (33)	Yoğun bakım hastaları	206
J. Benito ve ark. 2010 (62)	Yoğun bakım hastaları	106
C. Dierkes ve ark. 2009 (34)	Hastane geneli	101
S. Varani ve ark. 2009 (45)	İmmünkompemize hastalar	154
D. Bravo ve ark. 2011 (63)	Nötropenik hastalar	33
	Yoğun bakım hastaları	53
L. Pasqualini ve ark. 2012 (29)	Dahiliye kliniğinde yatanlar	391
M.V. Mauroa ve ark. 2012 (44)	İmmünkompromize hastalar	79
P. Josefson ve ark. 2011 (35)	Toplum kökenli sepsis	1093
L. Dubska ve ark. 2012 (64)	Solid organ malignitesi olan yoğun bakım hastaları	85
N. Mancini ve ark. 2008 (36)	Hematolojik malignitesi olan hastalar	103
M. Avolio ve ark. 2010 (37)	Acil bölümü hastaları	144
B. Lucignano ve ark. 2011 (38)	Çocuk hastanesi geneli	1673
P.M. Rath ve ark. 2012 (65)	Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan hastalar	225
L. Ephraim ve ark. 2010 (68)	Acil bölümü hastaları	306
U. Lodes ve ark. 2012 (40)	Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatanlar	148
F. Wallet ve ark. 2010 (41)	Yoğun bakım hastaları	100
K. Grif ve ark. 2012 (67)	Hastane geneli	71
E. Tschiedel ve ark. 2012 (42)	Çocuk hastalar	110
D. Maubon ve ark. 2010 (66)	Maligniteli erişkin hastalar	110
K. Yanagihara ve ark. 2010 (43)	Hastane geneli	407
H. Westh ve ark. 2009 (39)	Çok merkezli	558



Bizim de hedefimiz ağırlıklı olarak yoğun bakım hastaları ve kısmen yoğun bakım dışı kliniklerde yatan hastalarda gelişen sepsis atakları idi. Yoğun bakımda yatan hastaların altta yatan hastalıkları nedeniyle durumların daha kritik olması, genelde antibiyotik kullanırken sepsis atağı geliştiğinden kan kültürünün duyarlılığının azalmış olması bu hasta grubuna ağırlık vermemizdeki önemli etkenlerdi.

Çalışmamızda sepsis ataklarında etken mikroorganizmayı saptama oranı kan kültürü ile %32, PCR ile %44,9 olarak bulundu. SeptiFast ile yapılan diğer çalışmalarda ise kan kültürü pozitifliğinin %8-41, PCR pozitifliğinin %11-41 arasında değiştiği bildirilmektedir (33, 34, 36, 38, 39, 42-44, 69). Bu çalışmalara bakıldığında etken yakalama konusunda PCR yönteminin daha başarılı olduğunu söyleyebiliriz.

SeptiFast ile yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında, çalışmamızda kan kültürü ve PCR ile pozitiflik saptama oranının daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo-23).

**Tablo-23:** SeptiFast ile yapılan bazı çalışmalarda kan kültürü ve PCR pozitiflik oranları.

	Kan kültürü pozitifliği	SeptiFast pozitifliği
F. Bloos ve ark. 2010 (33)	%16,5	%34,7
K. Yanagihara ve ark. 2010 (43)	%8,0	%11,3
C. Dierkes ve ark. 2009 (34)	%24	%27
N. Mancini ve ark. 2008 (36)	%20,4	%33
M.V. Mauroa ve ark. 2012 (44)	%40,5	%40,5
A. Vince ve ark. 2008 (69)	%20,5	%33,3
B. Lucignano ve ark. 2011(38)	%10,3	%14,6
H. Westh ve ark. 2009 (39)	%17	%26
E. Tschiedel ve ark. 2012 (42)	%17	%24

Bu durumun nedenlerinden birinin hastanemizde özellikle yoğun bakım hastalarının çalışma dönemi boyunca aynı Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji konsültanı tarafından takip edilmesi ve örneklerin en

uygun zamanda alınması olduğunu düşünmekteyiz. Bunu destekler şekilde çalışmamızda sepsis ataklarının büyük çoğunluğunun geliştiği nispeten daha yakından takip edilen yoğun bakımlardaki hastalarda kan kültürü ve PCR'ın etkeni yakalama oranı yoğun bakım dışındakilere göre daha yüksek bulunmuştur.

Öte yandan diğer çalışmalardaki hasta popülasyonunun durumu, sayısı, çalışmanın retrospektif veya prospektif olarak yapılması, antibiyotik kullanım oranlarının farklılığı, kullanılan kan kültür sistemlerinin farklı oluşu gibi nedenlerin de farklılıklara yol açabileceği göz ardı edilmemelidir.

Çalışmamızda 15 sepsis atağında (%19,2) kan kültürü ile herhangi bir mikroorganizma üremesi olmamasına rağmen, PCR ile etken olduğu düşünülen mikroorganizmalar saptanmıştır. Değişik oranlarda da olsa PCR açısından umut verici olan bu durum birçok çalışmada da bildirilmiştir (Tablo-24).

**Tablo-24:** SeptiFast kullanılarak yapılan bazı çalışmalardaki kan kültürü ve PCR pozitifliği oranları.

	Kan kültürü negatif PCR pozitif	Kan kültürü pozitif PCR negatif	Kan kültürü pozitif PCR pozitif	Kan kültürü negatif PCR negatif
F. Bloos ve ark. 2010 (33)	%22	%3	%13	%62
M. Avolio ve ark. 2010 (37)	%7	%9	%21	%63
C. Dierkes ve ark. 2009 (34)	%14	%9	%14	%63
N.Mancini ve ark. 2008 (36)	%14	%1	%19	%66
A. Vince ve ark. 2008 (69)	%23	%10	%10	%57
Westh ve ark. 2009 (39)	%14	%3	%11	%72
E. Tschiedel ve ark. 2012 (42)	%13	%6	%11	%70

Birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da sepsis ataklarında PCR ile kan kültürüne göre daha fazla sayıda mikroorganizma türü saptanmıştır (29, 36, 38, 39, 43).

Çalışmamızda kan kültüründe hiç mantar üremesi olmamasına rağmen, PCR ile etken olduğu düşünülen 2 adet *Candida parapsilosis*, 1 adet *Candida albicans* ve 1 adet *Aspergillus fumigatus* türü saptandı. SeptiFast ile yapılan başka çalışmalarda da benzer şekilde PCR ile kan kültürüne göre

daha yüksek oranda mantar türü saptandığı belirtilmiştir (34, 36, 38, 43, 44, 68, 69).

Fungal enfeksiyonlar özellikle yüksek mortalite oranına sahiptirler (70). Hastane kökenli mantar enfeksiyonlarında en sık etken olarak *Candida albicans*'ı görmekteyiz. Ancak son yıllarda azol grubu antifungaller ile tedavisi güç olan non albicans *Candida* türlerinin oranı artmaktadır (71, 72). Yine önemli fungal enfeksiyon etkenlerinden *A. fumigatus* konvansiyonel kan kültürü yöntemleri ile saptanamamaktadır (73).

Çalışmamızda da 1 adet *E. faecium* türü PCR ile saptanmasına rağmen kan kültüründe üretilmemiştir. SeptiFast'in *E. faecium* türünü kan kültürüne göre daha yüksek oranda saptadığını gösteren bazı çalışmalar da mevcuttur (34, 36). *E. faecium* özellikle de vankomisine karşı direnç geliştirebildiğinden hastane enfeksiyonları açısından ciddi problemlere yol açabilmektedir.

Çalışmamızda da sepsis ataklarında kan kültüründe hiç *P. aeruginosa* türü ürememesine rağmen, PCR ile etken olduğunu düşündüğümüz 3 *P. aeruginosa* türü saptanmıştır. SeptiFast'in, kan kültürüne göre *P. aeruginosa* türünü kan kültürüne göre daha yüksek oranda tespit ettiğini gösteren çalışmalar vardır (36, 38). *P. aeruginosa* çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmesi ile özellikle yoğun bakım hastalarında ciddi problemlere yol açabilmektedir.

Kan kültürü veya PCR ile saptanan tüm mikroorganizma türleri etken olarak kabul edilmemektedir. Deri saprofitleri, KNS ve streptokok türleri nedeni ile kan kültüründe yüksek oranda kontaminasyon riski vardır. Ancak bu mikroorganizmalar kateter ilişkili bakteriyemilere de yol açabildiğinden bunları etken kabul edip etmeme konusunda sıkıntılar yaşanmaktadır.

SeptiFast sistemi, iş akışının değişik aşamalarındaki kontaminasyonu yansıtabilecek düşük konsantrasyonlardaki KNS ve streptokok türleri DNA'sının algılanmasını önleyecek şekilde tasarlanmıştır (27). Bunu destekler şekilde çalışmamızda, SeptiFast ile yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi PCR ile kan kültürüne göre daha düşük oranda kontaminasyon saptanmıştır (27, 34, 38, 39).

Çalışmamızda 22 sağlıklı erişkinden oluşan kontrol grubunda kan kültüründe herhangi bir üreme olmamasına rağmen PCR ile bir örnekte *Enterobacter cloacae/aerogenes* saptandı. Kontrol grubu olarak cerrahi bölümde yatan hastalardan 111 örnek alınan bir başka çalışmada %3,6 kan kültür pozitifliğine karşın %4,5 PCR pozitifliği satandığı bildirilmiştir (33).

Bu durum kanda mikroorganizma DNA'sı saptamanın sepsis açısından ne kadar anlamlı olduğu sorusunu gündeme getirmektedir. Mikrobiyal DNA'nın, patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP's) arasında olduğu ve Toll-like reseptör 9 (TLR-9) üzerinden sistemik inflamasyonun, dolayısıyla sepsis tablosunun başlamasına katkısı olabileceği bilinmektedir (74).

Öte yandan enfeksiyona neden olmayan ölü bakteri DNA'larının yanlış pozitif sonuç verebileceği göz ardı edilmemelidir. Kandaki DNA varlığının klinik olarak ne kadar anlamlı olduğunun daha iyi anlaşılması için bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda 5(%6,4) sepsis atağında kan kültürü sistemleri ile etken olduğu düşünülen mikroorganizmalar üretilmesine rağmen PCR sonuçları negatif bulundu. Mikroorganizma bazında ise kan kültüründe üretilen ve etken olduğu düşünülen ancak PCR ile saptanamayan 8 mikroorganizma türü (2 *A. baumannii*, 2 *E. faecalis*, 4 KNS) oldu. Kan kültürü ile etken mikroorganizma üremesi olduğu halde PCR ile bunların saptanamadığı birçok başka çalışmada da gösterilmiştir (33, 34, 36, 37, 39, 42, 69). Bu nedenle PCR negatif sonuçlarına temkinli yaklaşılması gerekmektedir.

PCR'ın negatif sonuç verme nedenlerinden birisi kan kültürüne göre alınan kan volümünün daha düşük olması olabilir. Her bir kan kültür şişesi için 8-10 mL kan alınırken, SeptiFast için 1,5 mililitre kan kullanılmaktadır. Öte yandan üretici firma bu miktarın yeterli olduğunu belirtmektedir.

Mantar ve gram pozitif bakterilerde kalın hücre duvarı nedeniyle DNA'yı açığa çıkarmanın daha zor olduğu, dolayısı ile de PCR duyarlılığının azalabileceği belirtilmiştir (33). Ancak çalışmamızda gram negatif hücre

duvarı yapısına sahip 2 *A. baumannii* türünün kan kültüründe üremesine rağmen PCR ile saptanamamış olması bu görüşü sorgulatmaktadır.

PCR sürecinde düşük düzeydeki bakteriyel DNA ile yüksek düzeydeki insan genomik DNA'sı arasında yarışma (kompetitasyon) olabileceği, bunun sonucunda da testin duyarlılığının azalabileceği belirtilmiştir (75). SeptiFast ile yapılan bir çalışmada da lökosit sayısının  $>30.000/\text{mm}^3$  olduğu 3 olguda PCR'ın inhibe olduğu gözlenmiştir (41). Ancak çalışmamızdaki kan kültürü ile etken mikroorganizma üremesi olup PCR'ın negatif sonuç verdiği olgularda lökosit sayısı ortalaması tüm sepsis hastalarının lökosit sayısı ortalamasından daha düşüktü ve bu olguların hiç birinde lökosit sayısı  $>30.000 \text{ mm}^3$  değildi.

PCR yöntemi ile mikroorganizma saptanamaması teknik nedenlerle olabileceği gibi teorik olarak hedef bölgedeki genetik değişim nedeniyle de gelişebilir. Bu konuda daha çok çalışma yapılması gerekmektedir.

Bilindiği gibi mevcut kan kültürü sistemlerinde, örnek alımı öncesi antibiyotik kullanımı duyarlılık azalmasına yol açmaktadır. Öte yandan mikroorganizma DNA'sının varlığını tespit eden PCR temelli testlerin antibiyotik kullanımından etkilenmediği belirtilmektedir (62). Nitekim SeptiFast ile yapılan birçok araştırmada antibiyotik alan hastalarda PCR'ın kan kültüründen daha yüksek oranda pozitiflik ve mikroorganizma türü saptadığı gösterilmiştir (27, 29, 38, 39, 42-44, 69). Bu durumu destekler şekilde çalışmamızda da örnek alımı öncesi antibiyotik alımı olan sepsis ataklarında kan kültürünün pozitif sonuç verme oranı(%28,8) PCR yönteminden(%46,6) daha düşük bulundu. Benzer şekilde çalışmamızda örnek alımı öncesinde antibiyotik kullanılan sepsis ataklarında saptanan mikroorganizma türü sayısı da PCR ile daha fazla olmuştur (kan kültürü ile 14 etken tür, PCR ile 33 etken tür).

Çalışmamızda sepsis ataklarında kan kültürü ile PCR sonuçlarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda, iki yöntem arasında %67,9 oranında uyum olduğu saptandı. Bu uyumun istatistiksel olarak orta derecede olduğu belirlendi. SeptiFast ile yapılan diğer çalışmalarda kan kültürü ile PCR arasındaki uyumun %67-85 arasında değişmekte olduğunu görülmektedir

(33, 34, 36, 37, 39, 42, 69). Öte yandan çalışmamızda mikroorganizma bazında iki yöntem arasında istatistiksel olarak yeterli uyum söz konusu değildi. PCR ile saptanan mikroorganizma türü sayısı kan kültürüne göre belirgin olarak daha fazla olduğundan bu durum şaşırtıcı değildir.

Mikroorganizma düzeyinde kan kültürü ve PCR'ın birlikte yakalama oranı yüksek olan türlerin *S. aureus*, *K. pneumoniae* olduğunu saptadık. Diğer çalışmalarda da *S. aureus* (37, 38, 44) ve *K. pneumoniae* (37,44) türleri için benzer durumun söz konusu olduğu raporlanmıştır.

Tahmin edilebileceği gibi tek başına konvansiyonel kan kültürü sistemleri yerine SeptiFast ve kan kültürü kombine olarak kullanıldığında, sepsis ataklarında daha yüksek sayıda pozitiflik ve mikroorganizma türü saptanmıştır (27, 38, 39, 68). Çalışmamızda da sepsis hastalarında kan kültürü ve PCR birlikte değerlendirildiğinde sepsis ataklarında etkeni saptama oranı %51,2'ye, saptanan mikroorganizma türü sayısı ise 60'a yükselmiştir. Bu artış miktarları umut verici olsa da etkenin yakalanamadığı diğer hastalardaki tanısal eksiklikleri gidermek için mevcut sistemlerin performansının artırılmasına veya yeni metotlara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda SeptiFast ile sonuç verme süresi yaklaşık 6 saat 15 dakikada gerçekleşmiştir. Diğer çalışmalarda da benzer süreler görülmektedir (36).

Bazı çalışmalarda daha kısa zamanda gerçekleşmiş olduğu belirtilse de, çalışmamızda kan kültür sisteminin üremelerin etken olduğu düşünülen örneklerde pozitif sinyal verme süresi laboratuvar rutinde ortalama 37,2 saatte gerçekleşmiştir (39, 68). Kan kültürü ile pozitif sinyal alındıktan sonra identifikasyona yönelik 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 etken olduğu düşünülen bakterinin identifikasyonu ortalama 84,4 saatte gerçekleşmiştir. Her ne kadar çalışma boyunca kan kültüründe ürememiş olsa da, mantar türleri için bu sürenin daha da uzun olabileceği aşikardır.

Özellikle kan kültüründe üremenin olmadığı örneklerde sonuç verme süresi oldukça uzamaktadır. Laboratuvar rutinizde kan kültürü ile negatif sonuç ortalama 7 gün 17 saatte verildi. PCR'ın özellikle bu olgularda zaman açısından daha avantajlı olduğu görülmektedir.

Her ne kadar SeptiFast daha duyarlı ve daha hızlı olsa da MRSA dışında antibiyotik direncini saptayamamaktadır (stafilokoklardaki mec-A geni dışında). Kan kültürünün SeptiFast karşısındaki en önemli avantajı antibiyotik duyarlılık testlerinin çalışmasına, dolayısıyla hedefe yönelik antibiyotik veya antifungalın başlanmasına imkan sağlamasıdır (39). Öte yandan kan kültürü sonuçları, ampirik tedavi yetersizliği ile ilişkili kötü sonuçları etkilemek için çok geç elde edilmektedir (56).

Yapılan bir çalışmada septik hastaların en az %10'unda geniş spektrumlu ampirik antibiyotik tedavisine rağmen sorumlu olduğu iddia edilen mikroorganizmayı etkileyen antibiyotik kullanılmadığı gösterilmiştir (2).

Her ne kadar kültür dışı yaklaşımların ampirik antibiyotik tedavisinin ilk dozunu erteletecek kadar hızlı olmamasına rağmen, antibiyotik tedavisinin tekrar ayarlanması veya deeskalasyon süresini büyük oranda kısaltabileceği, dolayısı ile dirençli patojenlerin gelişimini, hastanede kalış süresini ve ek masrafları azaltabileceği bildirilmiştir (76).

Bu nedenle SeptiFast ile yapılan birçok çalışmada PCR'ın sepsis ataklarında tedaviye etkisi değerlendirilmiştir. Hızlı sonuç veren PCR yöntemi ile sepsis olgularında uygunsuz tedavinin azaltılabileceği görülmüştür (34, 41, 42, 44, 63, 66, 67)

Çalışmamızda olası tedavi düzenlemeleri retrospektif olarak değerlendirildi. Bu nedenle tedavi yaklaşımındaki değişiklikleri uygulama ve sonuçlarını görme olanağı bulamadık. Çalışmamızda tedavi değişikliği yapılabilecek 10 sepsis atağı (%12,8) olduğuna karar verildi. Bu konuda SeptiFast ile yapılan diğer çalışmalarda da benzeri oranlar elde edilmiştir (Tablo-25).

**Tablo-25:** SeptiFast sonucuna göre tedavi düzenlenmesi oranları.

<b>Çalışma</b>	<b>Tedavi düzenlenmesi oranı</b>
C Dierkes ve ark. 2009 (34)	%7,7
K Grif ve ark. 2012 (67)	%11,3
F. Wallet ve ark. 2010 (41)	%8
D. Maubon ve ark. 2010 (66)	%10
E. Tschiedel ve ark. 2012 (42)	%13

Laboratuvar rutininde SeptiFast PCR'ın kullanımının önündeki engellerin başlıcaları suboptimal duyarlılığı, eğitilmiş personel ihtiyacı ve yüksek maliyeti olarak görülmektedir.

SeptiFast testinin kapsadığı mikroorganizmalar, kan dolaşımı enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ının nedenidir (54, 58). Ancak etkenlerin %10'unu tanımlayamamaktadır. Bunların arasında *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Haemophilus* spp., *Bacteroides* spp., *Citrobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas fluorescens* gibi önemli patojenler de yer almaktadır. Gelecekte PCR sistemleri menülerinin daha da genişletilmesi gerekmektedir. Öte yandan daha önce belirtildiği gibi SeptiFast master listesinde yer alan mikroorganizmalar da zaman zaman kan kültüründe üremesine rağmen PCR ile saptanamayabilmektedir.

Yapılan bir çalışmada SeptiFast'in maliyeti yaklaşık olarak kan kültürü çiftinin 10 katı kadar (sonuçlara bağlı olarak 7,6 ile 12,6 arasında değişebilir) olduğu belirtilmiştir(42). Kit maliyeti dışında bu sistem ile çalışabilmek için özel eğitilmiş personele ve dikkatli performansa ihtiyaç olduğu da unutulmamalıdır. Bu nedenle maliyet etkinlik açısından değerlendirme yaparken çalışılacak örnek ve personel sayısını da göz önünde bulundurmak gerekmektedir.

Özellikle manuel olarak yapılan DNA ekstraksiyon işlemleri sırasında büyük bir konsantrasyon, dikkat ve zaman gerekmektedir. Yaklaşık 3,5 saat boyunca ekstraksiyon yapan kişinin sadece bu işe kanalize olması gerektiği



dolayısıyla başka bir iş yapamayacağını gözlemledik. Dolayısıyla PCR çalışmasının insan hatası ve iş gücünü azaltacak şekilde tasarlanarak daha verimli kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Nitekim çalışmaya başladıktan sonra DNA ekstraksiyonunun otomatize sistemlerce gerçekleştirildiği bir çalışmanın yapıldığını gördük. İspanya'da yapılan bu çalışmada, 106 klinik örnek üzerinden kan kültürü, manuel SeptiFast ve otomatize SeptiFast sistemleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak otomatize SeptiFast sisteminin, manuel SeptiFast sistemine göre tüm çalışma süresini 6,54 saatten 3,57 saate indirdiği görülmüştür. Ayrıca otomatize sistem ile manuel sisteme göre duyarlılığın da arttığı belirtilmiştir (62).

Yaptığımız çalışma gibi manuel SeptiFast sistemi kullanılacak ise günde 1 kez yapılacağını düşündüğümüzde en kötü ihtimal ile yaklaşık 18 saat sonra sonuç alınabilecektir. Bu durum da süre açısından kan kültür sistemine göre belli bir avantaj sağlanmış olur.

Öte yandan çalışma yapacak kişinin çalıştığı hastanedeki sepsis atağı sayısı da önemlidir. Merkezimiz gibi 741 yatak kapasitesine sahip hastanede 7 aylık süre içinde yaklaşık 150 adet sepsis atağı geliştiği düşünülür ise, bazı günler hiç örnek gelmeyeceği aşıkardır. Bu yüzden 1 personeli sadece bu iş için görevlendirmek uygun olmayacaktır.

Otomatize SeptiFast 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.

Çalışmamız tek merkezli ve nispeten az sayıda hasta ve kontrol grubu ile yapıldığından dolayı sonuçları genelleştiremeyebiliriz ancak ülkemizde erişkin 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 ve yeni doğan servisleri gibi alınabilen

kan miktarının kısıtlı olduğu bölümlerde sepsis ataklarında kan kültürüne ek olarak SeptiFast sisteminin kullanılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKÇA

1. Doğanay M, Alp Meşe E. Sepsis. 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.
2. 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.
3. Jorgensen JH, Mirrett S, McDonald LC, et al. Controlled Clinical Laboratory Comparison of BACTEC Plus Aerobic/F Resin Medium with BacT/Alert Aerobic FAN Medium for Detection of Bacteremia and Fungemia. J Clin Microbiol 1997;35:53-8.
4. Matot I, Sprung CL. Definition of sepsis. Intensive Care Med 2001;27:3-9.
5. 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.
6. 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.
7. Calandra T, Cohen J. The International Sepsis Forum Consensus Conference on Definitions of Infection in the Intensive Care Unit. Crit Care Med 2005;33:1538-48.
8. Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, et al. Guidelines for the Management of Intravascular Catheter-related Infections. Clin Infect Dis 2001;32:1249-72.
9. Akalın H. Sepsis: Tanımlar, Tanı, Etiyoloji ve Epidemiyolojide Yeni Gelişmeler. Klimik dergisi 2007;20:7,8
10. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 Through 2000. N Eng J Med 2003;348:1546-54.
11. Smith RL. Prevention of Infection in the Intensive Care Unit. Curr Opin Infect Dis 2006;19:323-6.
12. 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.
13. Akalın H. Yoğun Bakım Ünitesi İnfeksiyonları: Risk Faktörleri ve Epidemiyoloji. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2001;5:5-16.
14. Arslan H, Gürdoğan K. Yoğun Bakım Ünitelerinde Gözlenen Hastane İnfeksiyonları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 1999;3:165-70.
15. Yosunkaya A, Tuncer S, Reıslı R, Uzun S, Ökesli S. Reanimasyon Ünitemizde 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. Sevim E, Çelik İ. Karlıdağ GE. Fırat Üniversitesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde Gelişen Nozokomiyal Sepsiste Mortalite için Risk Faktörleri Fırat Tıp Dergisi 2011;16:71-7.
  18. Akalın H. Sepsis Sendromu. Dündar İH.(çeviri editörü). Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi kitabında. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. 231-9.
  19. Weinstein MP, Towns ML, Quartery SM et al. The Clinical Significance of Positive Blood Cultures in the 1990s; A Prospective Comprehensive Evaluation of Microbiology, Epidemiology, and Outcome of Bacteremia and Fungemia in Adults. Clin Infect Dis 1997;24:584.
  20. H. Güler, H. Akalın, Y. Heper ve ark. Toplum Kökenli Sepsis: 125 Olgunun Retrospektif Değerlendirmesi. Flora 2010;15:11-5.
  21. Eşel D, Doğanay M, Alp E, Sümerkan B. Prospective Evaluation of Blood Cultures in a Turkish University Hospital: Epidemiology, Microbiology and Patient Outcome. Clin Microb Infect 2003;9:1038-44.
  22. Aygen B, Kayabaş Ü, Güven M, Doğanay M, Sümerkan B, Yıldız O. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yoğun Bakım Üniteleri Nozokomiyal Enfeksiyonları Sürveysi: Epidemiyoloji, Risk Faktörleri ve Prognozu Etkileyen Faktörler. Yoğun Bakım Dergisi 2001;1:122-30.
  23. Munford RS, Suffrendini AF. Sepsis, severe sepsis and septic shock. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases kitabında 7th edition. New York: Churchill Livingstone;2010;987-1010
  24. Marik PE. Definition of sepsis: Not quite time to dump SIRS. Crit Care Med 2002;30:706-7.
  25. Aouifi A, Piriou V, Bastien O, et al. Usefulness of Procalcitonin for Diagnosis of Infection in Cardiac Surgical Patients. Crit Care Med 2000;28:3171-6.
  26. 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.
  27. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, et al. A Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Differentiation of 25 Bacterial and Fungal Pathogens from Whole Blood Samples. Med Microbiol Immunol 2008;197:313-24.
  28. Mylotte JM, Tayara A. Blood cultures: Clinical Aspects and Controversies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:157-63.
  29. 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.
  30. Hall KK, Lyman JA. Updated Review of Blood Culture Contamination. Clin Microbiol Rev 2006;19:788-802.
  31. Weinstein MP. Blood Culture Contamination: Persisting Problems and Partial Progress. J Clin Microbiol 2003;41:2275-8.

32. 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.
33. 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.
34. Dierkes C, Ehrenstein B, Siebig S, et al. Clinical Impact of a Commercially Available Multiplex PCR System for Rapid Detection of Pathogens in Patients with Presumed Sepsis. *BMC Infectious Diseases* 2009;9:126.
35. Josefson P, Strålin K, Ohlin A, et al. Evaluation of a Commercial Multiplex PCR Test (SeptiFast) in the Etiological Diagnosis of Community-onset Bloodstream Infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:1127-34.
36. 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.
37. Avolio M, Diamante P, Zamparo S, et al. Molecular Identification of Bloodstream Pathogens in Patients Presenting to the Emergency Department with Suspected Sepsis. *Shock* 2010;34:27-30.
38. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, et al. Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected Sepsis. *J Clin Microbiol* 2011;49:2252-8.
39. Westh H, Lisby G, Breyse F, et al. Multiplex Real-Time PCR and Blood Culture for Identification of Bloodstream Pathogens in Patients with Suspected Sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:544-51.
40. 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.
41. Wallet F, Nseir S, Baumann L, et al. Preliminary Clinical Study Using a Multiplex Real-Time PCR Test for the Detection of Bacterial and Fungal DNA Directly in Blood. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:774-9.
42. Tschiedel E, Steinmann J, Buer J, et al. Results and Relevance of Molecular Detection of Pathogens by SeptiFast – A Retrospective Analysis in 75 Critically Ill Children. *Klin Padiatr* 2012;224:12-6.
43. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, et al. Evaluation of Pathogen Detection from Clinical Samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction Using a Sepsis Pathogen DNA Detection Kit. *Critical Care* 2010;14:R159.
44. 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.
45. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, et al. Diagnosis of Bloodstream Infections in Immunocompromised Patients by Real-time PCR. *J Infect* 2009;58:346-51.

46. Gaibani P, Rossini G, Ambretti S, et al. Blood Culture Systems Rapid Detection How and Why (Prove it, SeptiFast). *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:13-5.
47. 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.
48. 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.
49. Standards Unit, Health Protection Agency. Investigation of Blood Cultures (For Organisms Other than Mycobacterium Species). 2012; 6:1-35.
50. Estripeaut D, Saez-Llorens X. Perinatal bacterial diseases. Feigin RD, Cherry JD, Demler-Harrison GJ, Kaplan SL (eds). *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases* kitabında 6th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009;979-1020.
51. Bauer M, Reinhart K. Molecular Diagnostics of Sepsis - Where are We Today? *Int. J. Med. Microbiol.* 2010;300:411-3.
52. Carrigan SD, Scott G, Tabrizian M. Toward Resolving the Challenges of Sepsis Diagnosis. *Clin Chem* 2004;50:1301-14.
53. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome and Associated Costs of Care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
54. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections: A Risk Factor for Hospital Mortality Among Critically Ill Patients. *Chest* 1999;115:462-74.
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. 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.
57. Dark P, Wilson C, Blackwood B, et al. Accuracy of LightCycler SeptiFast for the Detection and Identification of Pathogens in the Blood of Patients with Suspected Sepsis: A Systematic Review Protocol. *BMJ Open* 2012;2:e000392. doi:10.1136/bmjopen-2011-000392.
58. 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.
59. Uzun Ö, Akalın HE, Hayran M, Ünal S. Factors Influencing Prognosis in gram-negative Bacteremia: Evaluation of 448 Episodes in a Turkish University Hospital. *Clin Infect Dis* 1992;15:866-73.
60. 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: 751-60.

61. Dark PM, Dean P, Warhurst G. Benchto bedside review: The Promise of Rapid Infection Diagnosis During Sepsis Using Polymerase Chain Reaction Based Pathogen Detection. *Crit Care* 2009;13:217.
62. Regueiro BJ, Ledo EV, Lamas LM, et al. Automated Extraction Improves Multiplex Molecular Detection of Infection in Septic Patients. *PLoS ONE* 2010;5:e13387.
63. Bravo D, Blanquer J, Tormo M, et al. Diagnostic Accuracy and Potential Clinical Value of the LightCycler SeptiFast Assay in the Management of Bloodstream Infections Occurring in Neutropenic and Critically Ill Patients. *Int J Infect Dis* 2011;15:e326-e331.
64. Dubska L, Vyskočilova M, Minaříkova D, et al. LightCycler SeptiFast Technology in Patients with Solid Malignancies: Clinical Utility for Rapid Etiologic Diagnosis of Sepsis. *Critical Care* 2012;16:404-6.
65. Rath PM, Saner F, Paul A, et al. Multiplex PCR for Rapid and Improved Diagnosis of Bloodstream Infections in Liver Transplant Recipients. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2069-71.
66. Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, et al. Therapeutic Impact and Diagnostic Performance of Multiplex PCR in Patients with Malignancies and Suspected Sepsis. *Journal of Infection* 2010; 61:335-42.
67. Grif K, Fille M, Würzner R, et al. Rapid Detection of Bloodstream Pathogens by Real-Time PCR in Patients with Sepsis. *Wien Klin Wochenschr* 2012;124:266-70.
68. Tsalik EL, Jones D, Nicholson B, et al. Multiplex PCR to Diagnose Bloodstream Infections in Patients Admitted from the Emergency Department with Sepsis. *J Clin Microbiol* 2010; 48:26-33
69. Vince A, Lepej SZ, Barsic B, et al. LightCycler SeptiFast Assay as a Tool for the Rapid Diagnosis of Sepsis in Patients During Antimicrobial Therapy. *Critical Care* 2008;12:3
70. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 2004;39:309-17.
71. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular Trend of Hospital-Acquired Candidemia Among Intensive Care Unit Patients in The United States During 1989-1999. *Clin Infect Dis* 2002;35:627-30.
72. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. *J Clin Microbiol* 1998;36:1886-9.
73. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 609-22.
74. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9237-42

75. Jordan JA, Durso MB. Real time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* 2005; 7: 575-81.
76. 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;171:480-487.



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık öğrenimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Okan Töre ve Prof. Suna Gedikoğlu'na; her konuda yardımlarını, bilgilerini ve cömertliğini esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Uludağ Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı değerli hocam Prof. Dr. Güher Göral'a; tez çalışmasının oluşmasında, devamında ve sonuçlanmasında çok büyük desteğini hissettiğim tez danışmanım Prof. Dr. E. Halis Akalın'a; bilimsel düşüncenin nasıl olması gerektiği hususunda bana çok şey katan değerli hocam Prof. Dr. Beyza Ener'e; mesleki vizyon kazanmamda önemli pay sahibi olan ve insan ilişkileri konusunda örnek aldığım kıymetli hocam Prof. Dr. Cüneyt Özakin'a uzmanlık eğitimim boyunca destek ve emeklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Barbaros Oral, Doç Dr. Melda Sınırtaş, Doç Dr. Ferah Budak, Doç Dr. Oktay Alver'e; Enfeksiyon hastalıkları konusunda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Safiye Helvacı, Prof. Dr. Reşit Mıstık, Doç. Dr. Yasemin Heper, Doç Dr. Emel Yılmaz'a; beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Uzm. Dr. Burcu Dalyan Cilo, Uzm. Dr. Sanem Geçgel, Uzm. Dr. Özdemir Özkan, Dr. Bülent Özbek, Dr. Tuncay Topaç, Dr. Ece Gülşah Özmerdiven, Dr. Sezcan Sağlam'a; laboratuvar pratiği kazanmamdaki katkılarından dolayı çalışma arkadaşlarım Sıdıka Aşıcı, Nuran Akgül, Aynur Demirbilek, Raziye Ülker, Cahide Güçlütürk, Figen Aymak, Şebnem Gedikli, Ayşe Taşpınar, Eda Öztürk, Ali Şahin, Tezcan Okur, Burcu Çakır, Ömer Faruk Birinci, Asuman Dartar, Göknur Altındiş, Kemal Halis, İlknur Akgöğ'e; her zaman yardım elini uzatan biyolog Bekir Akça'ya; geceleri beraber nöbet tuttuğumuz teknisyen arkadaşlarım Sinan Mattaoğulları, Muharrem Binici, Ercan Öztürk, Mesut Erol, Mehmet Kaya'ya ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalımızın tüm çalışanlarına; tez çalışmam sırasındaki desteklerinden dolayı Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Ferda Ş. Kahveci, Doç. Dr. Nermin Kelebek Girgin, Doç. Dr. Remzi İşçimen'e; çalışmanın klinik

ayağının yürümesindeki büyük emeklerinden dolayı Dr. Nesrin Kebabcı'ya; istatistiksel analizlerde yardımcı olan Dr. Gökhan Ocakoğlu'na çok teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca her türlü emeğini ve desteğini koşulsuz sunan sevgili anneme, babama, kardeşime; tanıştığımız andan itibaren hep desteğini hissetiğim kayınvalidem Belkıs Kara'ya ve onun biricik kızı, kıymetli yol arkadaşım, sevgili eşim Dr. Fatma Tuğba Dinç'e ve dünyalar tatlısı, yaşama sevincim, yavrumuz Elif Defne Dinç'e varlığından dolayı sonsuz teşekkürler ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Fatih

**Soyadı:** Dinç

**Doğum yeri ve tarihi:** Elazığ, 01.01.1980

**Eğitimi:**

2007-2012 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.- Bursa

1998-2005 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi - Ankara

1994-1998 Balakgazi Lisesi - Elazığ

1991-1994 Mezre Ortaokulu - Elazığ

1989-1991 Eskice Köyü İlkokulu - Çorum

1986-1989 Sıtma Köyü İlkokulu - Çorum

**Yabancı dili:** İngilizce