

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Rüçhan Sertöz

ERKEN YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEKİ
BAKTERİYEM ETKEN OLARAK SAPTANAN GRAM
POZİTİF BAKTERİLERİN VE DRENÇ GENLERİNİN
HIZLI TANISINDA MİKROARRAY VE LİZİS
FİLTRASYON YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayşe ARSLAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZNEL

ZM R

2017

ÖNSÖZ ve TE EKKÜR

Bu tez çalı masında kültür sonrası MALDI TOF MS tanımlama yöntemi, lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS (LFM) tanımlama yöntemi ve mikroarray yöntemi olmak üzere üç yöntemin birbiri ile karşılaştırılması ve ayrıca tanımlanan etkenlerin mikroarray yöntemi ile direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Öncelikle tez konusu seçiminden, tezin çalı ma ve yazım a amalarına kadar geçen tüm sürede bana olan yardımı ve anlayış ından dolayı tez danış manım Prof. Dr. Mehmet Ali Özinel'e, asistanlık sürecinde her yönden donanımlı bir uzman olabilmem için gerekli bilgi ve beceriye sahip olmama katkıda bulunan anabilim dalımızda görev yapan tüm hocalarıma, istatistiksel analiz konusundaki yardımlarından dolayı Prof. Dr Raika Durusoy'a, uzmanlık e itimim boyunca desteklerini esirgemeyen asistan arkadaş larım, teknisyenlerimiz ve yardımcı personelimize, tüm hayatım boyunca iyi bir insan ve iyi bir doktor olmam için bana verdikleri her türlü maddi ve manevi destek için anneme, babama ve karde lerime teşekkür ederim. Son teşekkürüm de yol arkadaş ım, hayatın getirdi i tüm yükleri beraber sırladı ım çok değerli e im Güfat Arslan'a ve verdi im en güzel kararım, çalı ma hayatımda bana hiç zorluk çıkartmayan, hayatımı güzelle tiren bitanecek kızım Güne Arslan'a.

Dr. Ayşe Arslan

tanımlama yönteminin maliyet etkinlik, hız, veritabanı geni li i, gram boyamaya gereksiniminin olmaması nedeniyle rutinde kütle spektrofotometrisi kullanabilen laboratuvarlar için rutin kullanıma girebilecek bir yöntem oldu unu dü ünülmü tür. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS tanımlama yöntemiyle, filtrasyon i lemi sonrasında filtreden yapılan süspansiyondan çalı ılacak otomatize duyarlılık test yöntemi kombine edilirse konvansiyonel yöntemlerle tanımlama ve duyarlılık için gerekli olan 48-72 saatlik süre yerine yakla ık 9-10 saatte sonuç verebilmek mümkün olacaktır.



ABSTRACT

Introduction

Bacteremia is the presence of viable bacteria in the circulating blood. Sepsis can be described as an infection causing damage to tissues and organs. If it is not diagnosed rapidly and not treated, it causes shock, multiple organ failure, and eventually death. Bacteremia and sepsis can rapidly reach the dimensions that can threaten life and have high mortality. Therefore, it is necessary to determine the etiological agent rapidly and start treatment. The aim of the study is to compare three methods for the identification of the bacteria in blood culture: Post-culture MALDI TOF MS, MALDI TOF MS (LFM) after lysis filtration and microarray method. Determination of the resistance profiles by microarray method was the additional objective of the study.

Materials and Methods

Between August 2016 and October 2016, 40 blood culture bottles in which gram positive bacteria were detected from patients in adult intensive care units of Ege University Hospital were included in the study. After obtaining positive signals from the blood culture bottles, three methods were used for identification: MALDI TOF MS from subculture, MALDI TOF MS after lysis filtration directly from the liquid sample and Verigene System BC-GP microarray (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) test method.

Results

The consistency of LFM identification and microarray method compared to post-culture identification MALDI TOF MS was 75% (30/40) and 90% (36/40) respectively. The similarity of LFM and microarray method was 83.3% (30/36). In 67.5% (27/40) of the bottles three methods gave consistent results.

Discussion

Based on the data obtained from the study, it was concluded that both lysis filtration and microarray test methods were useful for rapid diagnosis in patients with sepsis. Both lysis filtration and microarray test methods have advantages and disadvantages. As a result of our study, it is concluded that MALDI TOF MS

identification method after lysis filtration can be used in laboratories with mass spectrophotometer due to its cost efficiency, speed and database width, By combining MALDI TOF MS after lysis filtration and automatic susceptibility testing method which is made from suspension after filtration, it is possible to give results in about 9-10 hours instead of 48-72 hours.



Ç İNDEK İLER

ÖNSÖZ ve TE ŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
TABLolar	VIII
KISALTMALAR	X
1. GİR İŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL B İLG İLER	2
2.1. Tanımlar	2
2.2. Patogenez	5
2.2.1. Mikrobiyolojik faktörler ve immün yanıt	5
2.3. Etiyoloji.....	7
2.4. Epidemiyoloji.....	8
2.5. Klinik Belirti ve Bulgular.....	8
2.6. Sepsis Etkene Yönelik Tanı Testleri	9
2.6.1. Kan kültürü	9
2.6.1.1. Konvansiyonel yöntemler, identifikasyon ve duyarlılık testleri	10
2.6.1.2. Pozitif sinyal veren kan kültürü ü esinden yapılan hızlı tanı testleri (MALDI TOF ve mikroarray)	11
2.6.2. Direkt taze kan örne ğ inden yapılan moleküler testler.....	13
2.7. Gram pozitif bakterilerde antibiyotik direnci.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Gereçler ve Kimyasallar.....	18
3.2. Yöntemler.....	19
3.2.1. Kan kültürü sistemi	19
3.2.2. Pozitif kan kültürünün i lenmesi.....	20

3.3.3. Lizis filtrasyon için 1 litre lizis solüsyonu hazırlanması.....	20
3.3.4. Lizis filtrasyon için 1 litre yıkama solüsyonu hazırlanması.....	21
3.3.5. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS yönteminin uygulanması	22
3.3.6. Verigene® gram positive blood culture nucleic acid test (BC-GP) (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD)	22
3.3.7. statiksel Analiz Yöntemi.....	24
4. SONUÇLAR	25
4.1. dentifikasyon sonuçları	26
4.2. Duyarlılık testi sonuçları	32
5. TARTI MA	37

TABLolar

Tablo 1. Sepsis, ciddi sepsis ve septik şok için tanı kriterleri

Tablo 2. Septik şok patogeneğinde rol oynayan yapılar

Tablo 3. Pozitif sinyal sonrası tanımlamada izlenen yol

Tablo 4. “Verigene Blood Culture Assay” veritabanındaki bakteriler ve direnç genleri

Tablo 5. Kappa katsayısı değerlendirme tablosu

Tablo 6. Kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemi ile elde edilen sayı ve oranlar

Tablo 7. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS ile elde edilen sayı ve oranlar

Tablo 8. Mikroarray ile saptanan etkenlerin sayı ve oranları

Tablo 9. Her üç yöntemle elde edilen identifikasyon sonuçları

Tablo 10. Birbiriyle uyumsuz sonuçlar

Tablo 11. Kültür sonrası MALDI TOF MS ve LFM yöntemleri ile saptanmış en sık üç etkenin Cohen’in kappa değeri ve yorumu

Tablo 12. Kültür sonrası MALDI TOF MS ve mikroarray yöntemleri ile saptanmış en sık üç etkenin Cohen’in kappa değeri ve yorumu

Tablo 13. Etken bazında kültür sonrası MALDI TOF MS ile LFM karşılaştırılması

Tablo 14. Etken bazında kültür sonrası MALDI TOF MS ile mikroarray karşılaştırılması

Tablo 15. Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık sonuçları ile mikroarray yöntemiyle belirlenen direnç paternlerinin karılaştırılması

Tablo 16. Uyumsuz bulunan direnç profilleri

Tablo 17. Tüm sonuçların karılaştırılması



KISALTMALAR

MALDI TOF: Matrix assisted light desorption ionization time of flight

MS: Kütle spektrofotometrisi

LFM: Lizis filtrasyon sonrası uygulanan MS MALDI TOF

SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

MODS: Multipl organ disfonksiyon sendromu

ARDS: Eri kin solunum yetmezli i sendromu

DM: Diabetes Mellitus

KBY: Kronik Böbrek Yetmezli i

KKY: Konjestif Kalp Yetmezli i

LPS: Lipopolisakkarit

TNF: Tümör nekrozis faktör

PAF: Platelet aktive edici faktör

MHC: Major histokompatibilite kompleksi

KNS: Koagülaz negatif stafilokoklar

CHCA: 4-hydroxy- -cyanocinnamic asit

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PBP: Penisilin binding protein

1.G R ve AMAÇ

Bakteriyemi kanda bakteri bulunmasıdır. Sepsis ise kona ın enfeksiyona olan immun yanıtının doku ve organlara hasar vermesi ile ortaya çıkan, erken tanı konulmaz ve tedavi edilmezse oka, çoklu organ yetmezli ine, sonuçta da ölüme yol açan hastalık olarak ifade edilebilir (1). Bakteriyemi ve sepsis hızlıca hayatı tehdit edebilecek boyutlara ula abilen, yüksek mortaliteyle seyreden ve sa lık harcamalarına büyük etkisi olan ciddi klinik tablolardır (2).

Sepsisin insidansı tam olarak bilinmemekle birlikte, görülme sıklı nda ve bakım maliyetlerinde son yıllarda önemli artı lar oldu u dikkati çekmektedir. Dünya çapında yılda yakla ık 20-30 milyon yeni vaka görüldü ü bildirilmi tir. Tıptaki tüm geli melere ra men mortalite hala %30-60 arasında seyretmektedir (3). ABD’de “*Ulusal Hastaneden Taburculuk Ara tırması*”ndaki verilere göre 2000-2008 yılları arasında sepsis nedeniyle hastaneye yatı lar yakla ık iki kat artmı tir (4). Yine ABD’de yılda 750.000 yeni sepsis vakası görüldü ü ve yılda yakla ık 215.000 olgunun sepsis nedeniyle kaybedildi i belirtilmektedir. ABD’de sepsis olgularının tedavisi için yıllık ortalama 16,7 milyar dolar harcanmakta ve bu rakam her yıl %1,5 oranında artı göstermektedir (5).

Sepsiste ilk 24 saat içinde uygun ve etkili antimikrobiyal tedaviye ba lanması prognoz ve mortalite açısından son derece büyük bir öneme sahiptir. Sepsisli hastalarda mikroorganizma izole edilene kadar geçen sürede genellikle hastanın klini ine uygun ampirik tedavi protokolleri uygulanır. Etkene yönelik do ru antibiyotik tedavisine ne kadar erken ba lanır ise prognozun da o derecede iyi oldu u ve mortalitenin azaldı ı birçok çalı ma ile gösterilmi tir. Antimikrobiyal tedavi almayan ya da yanlı tedavi alan olgularda ölüm oranları kaybedilen her saat ba ına %7 oranında artı göstermektedir (6,7).

Bakteriyeminin kesin tanısı kan kültüründe etkenin üretilmesiyle konur. Kültür günümüzde halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak otomatize kan kültürü sisteminde mikroorganizmanın izole edilmesi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlanması için sinyal pozitifli inden sonra en az 48-72 saatlik bir süre geçmesi gerekti inden, hızlı sonuç verebilen testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda etkeni aynı gün içerisinde saptayabilen ve saptanan etkenin tedaviye yön

verici önemli direnç paternlerinin belirlenebileceği moleküler tabanlı testler kullanılmaya başlanmıştır (8,9).

Bu çalışmada, otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal alınan kan kültüründe üreyen bakterinin tanımlanması amacıyla kültür sonrası matrix assisted light desorption/ionization time of flight (MALDI TOF MS) tanımlama yöntemi, lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS (LFM) tanımlama yöntemi ve mikroarray yöntemi olmak üzere üç yöntemin birbiri ile karşılaştırılması ve ayrıca tanımlanan etkenlerin mikroarray yöntemi ile direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Sepsis, Yunanca çürüme anlamına gelen sözcükten türetilmiştir. Eski çağlarda bir yaranın hava ile temas etmesi, sonra çürümesi ve kan akımına katılması ile sepsis tablosunun oluştuğuna inanılırdı. Koch, Pasteur, Semmelweis ve Lister enfeksiyon ile ilgili bilgileri açıkladı ve enfeksiyonun sepsise neden olduğunu görüldüğü ilk ortaya atılan fikirler olmuştur. Ondokuzuncu yüzyıldan sonra 1914 yılında Schottmueller çalışmaları ile sepsisin bakteri enfeksiyonuna bağlı olduğunu kabul görmeye başlanmıştır (10).

Günümüzdeki tanımlara bakılacak olursa sepsis ve bakteriyemi birbirleriyle ilişkili fakat farklı klinik tablolardır. Sepsis tanımlamasındaki karışıklığın giderilmesi amacıyla 1991 yılında Society of Critical Care Medicine (SCCM) ve American Collage of Chest Physicians (ACCP)'ın konsensus toplantısında enfeksiyon, bakteriyemi, sepsis, septik sok, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), ve multipl organ disfonksiyon sendromuna (MODS) tanımlar geliştirilmiştir (11).

2.1. Tanımlar

Enfeksiyon: Mikroorganizmaların normalde steril olduğu bilinen konak dokusunda bulunmasına ve konağın mikroorganizmanın invazyonuna karşı olduğu inflamatuvar yanıt tablosudur.

Bakteriyemi: Kanda bakteri bulunmasıdır.

Sepsis: Enfeksiyona kar ı olu an sistemik inflamatuvar yanıttır.

Ciddi sepsis: Sepsise organ disfonksiyonu, dola ım yetmezli i ya da hipotansiyonun e lik etti i durumdur.

Septik ok: Uygun sıvı replasmanına kar ın hipotansiyon ve okun gözlendi i sepsis tablosudur.

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) a a ıdaki durumların iki ya da daha fazlasının bulunmasıyla karakterize klinik tablodur:

- i. Vücut ısısı $> 38^{\circ}\text{C}$ veya $< 36^{\circ}\text{C}$
- ii. Kalp hızı > 90 atım/dk
- iii. Solunum sayısı > 20 /dk ya da $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$
- iv. Lökosit sayısı > 12.000 hücre/ mm^3 , < 4.000 hücre/ mm^3 ya da $> \%10$ immatür hücre formları

Multipl organ yetmezli i (MODS): Sepsis ve septik ok ile birlikte bozulmuş organ fonksiyonu, eri kin solunum yetmezli i sendromu (ARDS), böbrek yetmezli i, karaci er yetmezli i ve yaygın damar içi pıhtılaşma (dissemine intravasküler koagülasyon - D K) gibi klinik durumların bulunmasıdır (11).

1991 yılındaki ACCP/SCCM uzla ı konferansındaki tanımlar üzerinde farklı görüşler sebebiyle sepsis fizyopatolojisini daha iyi ifade edebilen tanımlamalara ihtiyaç duyuldu u anlaşılmı tır. Bu nedenle 2001 ve 2012 yıllarında 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) gibi toplulukların katılımıyla sepsis tanım konferansları yapılmı tır. 2001 konferansında, daha önceki yıllarda belirlenmi maddeler geçerli olmakla birlikte, C-reaktif protein(CRP), prokalsitonin(PCT), laktik asit, kreatinin, bilirubin gibi birçok biyokimyasal parametredeki artı nın da sepsis tanı kriterlerine eklenmesi önerilmi tir. 2012

konferansı sonucunda ise 2001’de kabul edilen kriterler üzerinde küçük de i iklikler yapılmı tır (Tablo 1) (12).

Tablo 1. Sepsis, ciddi sepsis ve septik ok için tanı kriterleri

<p>Sepsis :Gösterilmi yada üphe edilen enfeksiyon ve a a idakilerden birden fazlasının bulunması</p> <p>Genel Ate (vücut ısısı $> 38.3^{\circ}\text{C}$) veya hipotermi (vücut ısısı $< 36^{\circ}\text{C}$) Kalp atım hızı $> 90/\text{dk}$ veya ya için normal de erden > 2 standart sapma Takipne (solunum sayısı $> 30/\text{dk}$) Mental durum de i ikli i Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatte $> 20\text{ml/kg}$) Hiperglisemi (diyabetin olmadı ı durumlarda kan ekerinin $>110 \text{ mg/dl}$ veya $7,7 \text{ mM/l}$ olması)</p> <p>inflatuar Lökositoz (beyaz küre sayısı $>12000/\text{mm}^3$) Lökopeni (beyaz küre sayısı $< 4000/\text{mm}^3$) Normal beyaz küre sayısı mevcutken immatür form $> \%10$ olması CRP’nin normal de erden > 2 standart sapması PCT’nin normal de erden > 2 standart sapması</p> <p>Hemodinamik Arteriyel hipotansiyon: <ul style="list-style-type: none">• Sistolik basıncın $< 90 \text{ mmHg}$• Ortalama arteriyel basıncın $< 70 \text{ mmHg}$• Sistolik basıncının yeti kinlerde $> 40 \text{ mmHg}$ dü mesi veya ya göre normal de erden < 20 standart sapma olması</p> <p>Organ disfonksiyonu Arteriyel hipoksemi ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$) Akut oligüri (en az iki saat idrar çıkı ı $< 0.5 \text{ mL/kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ veya 45 mM/l) Kreatininde $0,5 \text{ mg/dl}$ artı Koagülasyon anormallikleri (INR > 1.5 veya aPTT $> 60 \text{ s}$) leus (ba ırsak seslerinin olmaması) Trombositopeni (trombosit sayısı $< 100000 /\text{mm}^3$) Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin $> 4 \text{ mg/dl}$ veya 70 mmol/l)</p> <p>Doku perfüzyonu Hiperlaktatemi ($>1 \text{ mmol/l}$) Kapiller dolu ta azalma veya deride renk de i ikli i</p>
<p>Ciddi sepsis: Sepsis + organ disfonksiyonu</p>
<p>Septik ok: Sepsis + intravenöz sıvı tedavisine dirençli hipotansiyon ya da laktat yüksekli i</p>

2.2. Patogenez

Sepsis patogenezinde öncelikle bakterinin organizmaya yerleşimi ve konak savunması ile olan etkileşimi rol oynar. Hastalığın ortaya çıkmasına, konak savunmasının immün yanıtı ve bakteriyel virülans faktörleri etki eder. Sepsis için bazı predispozan faktörler vardır. Bunlar; altta yatan ciddi hastalık, yaş (yenidogan, > 65 yaş), primer hastalık (Siroz, DM, KBY, KKY vb.), konak savunma mekanizmalarının zayıflaması (nötropeni, malignite, disproteinemiler, kortikosteroid ve diğer immunosupresif tedaviler), geniş travma ve yanıklar, lokal enfeksiyonlar, septik abortus, lohusalık, yakın geçmişte uygun olmayan antibiyoterapi, YBÜ’nde bakım, invaziv damar kateterleri, fazla miktarda parenteral sıvı veya kan ve kan ürünleri verilmesi, hemodiyaliz, diğer invaziv kateter ve girişimler (üriner kateter ve girişim, entübasyon, endotrakeal tüp, mekanik ventilatör), büyük cerrahi girişimler olarak özetlenebilir (13).

Sepsis, bakterilerin kan dolaşımına damardışı bir enfeksiyon odağından yayılımı sonucu girmesiyle ya da benzeri intravasküler sebeplerden (damar içi kateter, septik tromboflebit, endokardit, mikotik anevrizmalar gibi) kaynaklanabilir. Sepsiste primer enfeksiyon odağı en sık üriner sistem, genital sistem, solunum sistemi, deri ve yumuşak doku ve kateterlerdir. Toplum kökenli sepsislerde en sık odak solunum sistemi ve üriner sistem, nozokomiyal sepsislerde ise intravasküler ve üriner kateterlerdir. Yoğun bakım ünitelerinde ise uzun süreli yatılardan dolayı beklendiği gibi nozokomiyal pnömoniler ön plandadır (13).

2.2.1. Mikrobiyolojik faktörler ve immün yanıt

Sepsisi tetikleyen etken ne olursa olsun (bakteri, mantar, virüs ya da parazit) enfeksiyon ile başlayan bu etki sonuçta konakta bir immün yanıtı neden olur ve bu yanıt patolojinin esasını oluşturur. Mikroorganizmaya ait spesifik moleküller (bakteri duvarı komponentleri, endotoksinler, bakteri ve virus genetik elemanları) immün yanıtı tetikler. Septik şok patogenezinde rol oynayan bakteriyel yapılar tablo 2’de sunulmuştur (14).

Tablo 2. Septik şok patogenezinde rol oynayan yapılar (14)

Bakteriyel yapı	Kaynak
Endotoksin (LPS, lipid A)	Bütün gram negatif bakteriler
Peptidoglikan	Bütün bakteriler
Lipoteikoik asit	Gram pozitif bakteriler
Ekzotoksinler	<i>S. aureus</i> (a- hemolizin) <i>S. pyogenes</i> (Streptolizin – O) <i>E.coli</i> (<i>E. coli</i> hemolizini) <i>Aeromonas spp.</i> (Aerolizin)
Süperantijenler	<i>S. aureus</i> (Toksik şok sendromu toksini-I Enterotoksin A-F) <i>S. pyogenes</i> (Pirojenik ekzotoksin A+C)
Enzimler	<i>S. pyogenes</i> (1L-1b konvertaz) <i>C.perfringens</i> (Fosfolipaz C)

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısal komponentleri (peptidoglikan ve teikoik asitler), kapsül antijenleri ve ekzotoksinler [*S. aureus*'un toksik şok sendromu toksinleri (TSST), *S.pyogenes*'in pirojenik toksinleri] gibi bileşenler inflamasyona neden olur. Gram negatif bakteriyemide ise toksisiteden sorumlu olan lipopolisakkarid (LPS) yapısındaki endotoksinlerdir. Bu antijenik yapı ve toksinler dolağımdaki mononükleer fagositik hücreleri CD14 reseptörüne bağlanarak uyarırlar. Monositlerden tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin 1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve trombositleri aktive eden faktör (PAF) salınır. IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive ederek γ -interferon, IL-2, IL-4, granulosit-monosit-koloni-stimulan faktörlerin (GM-CSF) salgılanmasını sağlarlar. Bu sitokinler lokal enfeksiyonun yenilmesinde çok yararlı olurken, büyük miktarlarda sentezlenerek dolağıma karışmaları yaygın endotel hücre hasarı ile sonuçlanır. Endotel hasarı, kapiller permeabilite artışı, kanın mikrosirkülasyonda göllenmesi, dolağımdaki kan volümünün azalması şok ve organ yetersizliği ile sonuçlanır(10,14).

Endotoksin ayrıca kompleman sistemini de aktive eder. Açığa çıkan C3a ve C5a bazofil ve mast hücrelerini uyarak, histamin bağta olmak üzere çoğu hipotansiyona neden olan vazoaaktif bazı mediatörlerin salgılanmasına neden olur.

Endotel hücreleri tarafından salgılanan nitrik oksit (NO) sepsisteki yaygın vazodilatasyondan sorumludur. Sepsiste endotoksin etkisi ile hücrelerden salınan sitokinlerin çoğu trombin yapımını uyarmakta ve koagülasyon sistemi aktive olmaktadır. Pıhtılaşma proteinlerinin tüketimi kanamaya yol açmakta, hastalarda hem kanama, hem trombüs gelişimi birlikte görülmektedir. Diğer taraftan fibrin, plazmin tarafından parçalanarak fibrinolizise neden olmaktadır. Dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) olarak tanımlanan bu tablo sepsisteki kötü prognozun en önemli nedenlerinden biridir (15,16).

2.3. Etiyoloji

Gram pozitif bakteriler antibiyotiklerin kullanıma girmesinden önce en sık etkenler olarak görülürken, antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile gram negatif bakteriler öne çıkmaya başlamıştır (17). Günümüzde yoğun bakımlarda damar içi kateter gibi invaziv girişimlerin çoğalmasıyla, gram pozitif etkenler yeniden artı göstermektedir. Son yıllarda gram negatif ve gram pozitif etkenler birbirilerine yakın sıklıkta izlenmektedir. Çeşitli çalışmalarda, sepsislerin %27-74'ünde gram pozitif bakterilerin, %20-64'ünde gram negatif bakterilerin etken olduğu, %15 ve daha az oranda ise polimikrobiyal etken izole edildiği gösterilmiştir (18,19).

Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu sepsislerde en sık etkenler koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *Staphylococcus aureus* ve enterokok türleridir. Gram negatif bakterilerin neden olduğu sepsislerde ise en sık etkenler de genellikle birlikte, ülkemizdeki çalışmalarda *Acinetobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp* olarak bildirilmiştir. En sık izole edilen anaerob bakteriler de *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium* türleridir (18-20). *Candida* türlerinin görülme sıklığı genellikle bakterilerin takip etmektedir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde en sık izole edilen mantarlar *C.albicans*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'tir (21).

2.4. Epidemiyoloji

Dünya geneline bakıldığında yılda her yıl 20-30 milyon yeni sepsis vakası görülmektedir. Sepsis sıklıkla ölümcül seyreder ve mortalitesi yaklaşık %20-60 arasında değişmektedir (22). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde koroner dâğılımın bakımlarda ikinci en sık ölüm nedenidir ve ölüm nedenleri içerisinde onuncu sırada yer almaktadır (23). Bazı ülkelerde gebelikte kanama ve tromboemboliden daha fazla ölüme neden olduğu bildirilmiştir (3). Son on yılda sepsis vakalarında %8-13 artış görülmüştür. Sepsis insidansının artmasında antibiyotiklerin yaygın ve gereksiz kullanımı, ileri yaş, organ transplantasyonu, HIV pozitiflik, malignite gibi sepsise zemin hazırlayan duruma sahip hastaların sayısında artış, intravasküler ve üriner kateterizasyon gibi girişimlerin yaygınlaşması gibi faktörler etkili olmaktadır (24).

ABD'de yılda 750.000 sepsis olgusu görüldüğü ve yaklaşık 250.000 olgunun sepsis nedeniyle kaybedildiği belirtilmektedir, kabaca ölüm oranı %35'tir. Ülkemizde yoğun bakım ünitelerinde yapılan çalışmalarda ise hastane kaynaklı bakteriyemi ve sepsis insidansı %7,6 – 17,2 arasında bildirilmektedir (25,26).

2.5. Klinik Belirti ve Bulgular

Sepsisin klinik bulguları enfeksiyonun yerine, neden olan mikroorganizmanın türüne, akut organ disfonksiyonu olup olmasına, altta yatan hastalığa ve tedavi başlamaya kadar geçen süreye bağlı olarak değişiklik gösterir. Enfeksiyon bulguları ve organ disfonksiyonu her zaman çok açık bir şekilde anlamlandırmadan yol gösterici olarak uluslararası toplantılarla belirlenmiş kılavuzlar kullanılabilir (27).

Akut organ disfonksiyonu çoğunlukla solunum sistemi ve kardiyovasküler sistemi etkiler. Solunumsal etkilenme en çok; kardiyak nedenlere bağlı olmayan bilateral infiltrasyonun eşlik ettiği hipoksemi ile karakterize olan akut respiratuar distres sendromu (ARDS) olarak karşımıza çıkar (28). Kardiyovasküler etkilenme göstergeleri hipotansiyon ve laktat seviyelerindeki yükselmedir. Bu durumda uygun sıvı tedavisi uygulansa bile hipotansiyon devam eder ve sonuç olarak miyokardiyal disfonksiyon görülebilir (12).

Sepsisten etkilenen di er organlar da beyin ve böbreklerdir. Santral sinir sistemi tutulu u en sık oryantasyonda bozulma ve deliryum olarak kar ımıza çıkar. Kritik öneme sahip olan polinöropati ve miyopati de özellikle yo un bakımda uzun süredir yatan hastalarda sıklıkla görülür (29). Akut böbrek hasarı idrar çıkı ında azalma, serum kreatinin seviyesinde artı ve renal replasman tedavisine ihtiyaç duyulan klinik bir tablodur. Ciddi sepsiste sık görülen di er durumlar; paralitik ileus, transaminazlarda artı , glisemik kontrolün sa lanamaması, trombositopeni, yaygın damar içi pıhtıla ma (disseminated intravascular coagulation-DIC), adrenal disfonksiyon, ötroid hasta sendromu olarak sıralanabilir (27).

2.6. Sepsis Etkene Yönelik Tanı Testleri

2.6.1. Kan kültürü

Bakteriyemiye neden olan mikroorganizmayı izole etmek ve tedavi için do ru antibiyogram sonucuna ula mak için en önemli ve hala günümüzde de altın standart olarak kabul edilen tanı yöntemi kan kültürüdür. Kültürde üreyen mikroorganizmaların en kısa sürede tanımlanması, etken olup olma dına karar verilmesi, etken olarak kabul edilenlerin antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılarak tedavinin do ru yönlendirilmesi mortalite ve morbiditenin azaltılmasında çok önemlidir.

Bakteriyemi veya fungemiden klinik olarak üphe edilen durumlarda, endokardit öntanısı oldu unda, vücut sıcaklı ının normal de erlerin dı ında oldu u durumlarda, nabız ve kan basıncının anormalle ti i durumlarda, solunum sayısının arttı ı durumlarda, hastanın bilinç durumu de i ti inde, lökopeni veya lökositoz izlendi inde kan kültürleri alınmalıdır. Sepsiste ate kesin bir kriter de ildir. Yenido anlar ve geriatric ya grubunda ate yanıtı alınamayabilir. Ayrıca yo un bakımda açıklanamayan pulmoner, renal ya da hepatik fonksiyon bozuklu u olan, menenjit, osteomyelit gibi enfeksiyon oda ı bilinen, immün yetmezlikli, hemodinamik bozuklukları olan, kapak replasmanlı veya endokarditli hastalardan kan kültürü ate yükseklili beklenmeksizin alınabilir (30).

Kan kültürü, rutin de il klinik gereklilikler do rultusunda uygulanan bir teknik olmalıdır. Bakteriyemi veya fungemi üphesinde eri kinlerde ayrı venlerden iki set kan kültürü alınmalıdır (çocuklarda bir veya iki set). Kan kültürleri sepsis veya bakteriyemi üphesinde olabildi ince antibiyotik tedavisi ba lanmadan önce alınmalıdır. Otomatize sistemlerde kullanılan besiyerleri klinik kullanımda olan antibiyotiklerin ço unun nötralizasyonu için gerekli reçine kombinasyonları içermektedir. Bu sebepten hasta antibiyotik tedavisi almı olsa da, kültür alma endikasyonları mevcut ise kan kültürü alınmalıdır.

Kan birçok mikroorganizmanın kolayca üreyebilece i bir ortamdır. Bu yüzden kan alma i lemi sırasında deri antisepsisi çok önemlidir. Do ru antisepsi yapılmadı nda koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) veya *Corynebacterium spp.* gibi cilt florasında bulunan bakteriler yanlı de erlendirmelere yol açabilir. Standart uygulama olarak cildin önce %70 propil alkol ile, ardından %1-2'lik povidon iyot ile silinmesi önerilir. Povidon iyodun maksimum antiseptik etki olu turabilmesi için 1,5-2 dk. cilde temas etmesi gereklidir.

Alınan kan miktarı mikroorganizmanın üretilmesinde önemli bir etkiye sahiptir. BACTEC 9240 otomatize kan kültür sistemi ile gerçekleştirilen çalı mada, kan miktarının 10 ml'den ba layarak 40 ml'ye kadar artırıldı nda alınan sonuçlar de erlendirilmi ve 20 ml örne in 10 ml'ye göre %30, 30 ml'nin ise yine 10 ml'ye göre %47 oranında kültür pozitifli i artı ı sa ladı ı belirlenmi tir. Örnek 40 ml'ye çıkarıldı nda ise 30 ml'ye göre sadece %7'lik pozitiflik artı ı gözlenmi tir. Bu sonuçlara göre, eri kinlerde her kültür için 20-30 ml örnek alınması önerilmi tir. Günümüzde klasik olarak kabul edilen kural, rutinde eri kinlerde her bir kan kültürü i esi için 8-10 ml, pediatrik ya grubunda ise 5-6 ml alınmasıdır. Örnek alınmadan önce veya alındıktan sonra buzdolabına konulmamalıdır. Kan kültürü örnekleri alındıktan sonra en geç iki saat içerisinde laboratuvara ula tırılmalıdır (30).

2.6.1.1. Konvansiyonel yöntemler, identifikasyon ve duyarlılık testleri

Günümüzdeki modern otomatize kan kültürü sistemleri ile kan kültürü

İ elerine ekim yapıp cihaza yüklendikten kısa bir süre sonra üremenin göstergesi olan pozitif sinyal alınabilmektedir. İnkübatör ve çalkalama prensibi ile çalışan bilgisayar destekli otomatize sistemde İ eler sürekli izlenir. İ edeki O₂ miktarının azalması veya CO₂ miktarının artmasıyla de İ en kolorimetrik veya florometrik ölçümler yapılır. İ ede herhangi bir üreme saptanırsa cihaz ekranında üremenin olduğunu belirten uyarı olur. Otomatize kan kültürü sistemlerinde olguların yaklaşık %90'ından ilk 48 saat içinde üreme sinyali alınmaktadır (30). Üreme yok diyebilmek için ise kan kültürü İ elerini en az yedi gün enkübe etmek gerekir (31). Pozitif kan kültürü İ elerinden laboratuvarın çalışmaya protokolü doğrultusunda gram boyama yapılır ve katı besiyerine subkültür yapılır. Tanımlanan etkenin antibiyotik duyarlılık testleri yapılır. Ancak, pozitif sinyal sonrası üretilen mikroorganizmanın klasik yöntemlerle identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için en az 48-72 saatlik bir zaman dilimine ihtiyaç duyulmaktadır (30).

2.6.1.2. Pozitif sinyal veren kan kültürü İ esinden yapılan hızlı tanı testleri (MALDI TOF ve mikroarray)

Kültürü yapılan mikroorganizmayı daha çabuk tanımlamak için son yıllarda hızlı sonuç veren sistemler üzerinde çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda mikroorganizmanın kütle spektrometrisini ölçme prensibine dayanan MALDI TOF MS yönteminde ilerlemeler kaydedilmiştir ve bakteri proteinlerinin pikleri incelenerek tanımlayıcı diziler oluşturulmuştur. Günümüzde, VITEK MS (bioMérieux, Fransa), Bruker Biotyper (Bruker-Daltonik, ABD), Axima/Saramis (Shimadzu, Japonya) ve Andromas (Andromas SAS, Fransa) olmak üzere dört adet MALDI TOF MS sistemi mevcuttur (33). Bu sistemlerde tanımlaması yapılacak olan mikroorganizmaya ait kültürden alınan koloni kimyasal bir matriksle bir araya getirilir. Bu amaçla kullanılabilen matriksler 4-hydroxy-2-cyanocinnamic acid ("alphacyano" veya 4-HCCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid) dir. Tanımlanmak istenen koloni veya ekstraktı 'target slayt' adı verilen metal slayta yayılır, üzerine matriks solüsyonu eklenir kristalize olduktan (kuruduktan) sonra cihaza yerleştirilir. Cihaz içerisinde slayt üzerine lazer atılır uygulanır. Lazer enerjisi matriks moleküllerinin aktivasyonunu sağlayarak mikroorganizma-matriks kompleksinde mikro patlamalar

meydana getirir. Ardından bu moleküller iyonlaştırılır ve slayttan ayrılarak serbest hale geçerler. Cihaz içindeki elektrotlar sayesinde 20 kV civarında elektrik potansiyeline maruz bırakılarak iyonize moleküller detektöre doğru hızlandırılır. Spektrofotometredeki vakum, iyonlarla hava moleküllerinin çarpışmasını engeller. Bu nedenle iyonların hızı sadece *kütle/yük (m/z)* oranıyla gösterilen kütle ve molekülün yüküne bağlı hale gelir. MALDI TOF MS uygulamalarında hemen her zaman moleküller benzer şekilde yüklendikleri için uçuş süresi temelde kütleyle bağlıdır. İyonlar kütlelerine göre belirli sürelerde detektöre çarparlar, dolayısıyla küçük kütleli iyonlar detektöre önce ulaşır. Bir MALDI TOF MS spektrumunda x eksenini proteinlerin m/z oranını, y eksenini de bu proteinlerin yoğunluğunu gösterir. Sonuçta mikroorganizmaya ait proteinlerin, çarpma zamanına göre kütle spektrumu oluşturulur ve kaydedilir. MALDI TOF MS ile tanımlama yapan sistemlerde, yeni kaydedilen spektrum, mevcut veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılır ve sonucun güvenilirliği yüzde olarak değerlendirilir (32).

Mikroarray, “çip” olarak adlandırılan cam veya nitroselüloz membran gibi katı yüzeyler üzerine tutturulan tür ve gen spesifik problemlerin DNA ve RNA çalışmaları için kullanılan teknolojidir. Yüzeye tutturulan DNA parçaları (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) prob olarak belirlenmiştir. Mikroarray teknolojisi, DNA'nın bir substrata bağlanıp bilinen bir gen ya da fragment ile prob hazırlanması şeklinde tanımlanabilecek ‘Southern Blotting’ tekniğinden türetilmiştir. Bu yeni teknikte membran yerine camın kullanılması, radyoaktivitenin yerini floresan işaretlerin alması ve bağlanmayı sağlayacak yöntemlerin hassaslaşmasıyla çalışmaların verimi ve elde edilen bilgilerin miktarı artmıştır. Komplementer oligonükleotidler kullanarak çok sayıda hedef nükleik asit dizisini aynı anda saptama potansiyelinden dolayı mikroarray teknolojisi, antimikrobiyal direncinin tanısında da umut verici bir yöntemdir. Sepsiste etiyolojik tanıya olanak sağlayan mikroarray yöntemi ticari olarak mevcuttur (33). Piyasadaki mikroarray sistemleri Prove-it Sepsis (MobiDiag, Finlandiya), Film Array Blood Culture Identification Panel (BioFire, USA), Verigene System BC-GP/BC-GN (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) dir (34).

2.6.2. Direkt taze kan örne inden yapılan moleküler testler

Sepsis tanısıyla takip edilen vakalarda erken tanı ve tedavinin mortaliteyi belirgin bir şekilde azalttığı göz önünde bulundurulacak olursa hızlı tanımlama günümüzde daha fazla önem kazanmaktadır. Kandaki mikroorganizmanın en hızlı şekilde tanımlanması farklı bir yöntem gerek duyulmaksızın direkt taze kan örne inden gün içerisinde etkenin saptanması ile olur. Direkt kan örne inden mikroorganizmanın tanımlanması ve bazı direnç paternlerinin saptanması moleküler yöntemler ile yapılabilir (34). Direkt kan örne inden yapılan PZR temelli yöntemler konvansiyonel kültüre göre çok daha kısa sürede sonuç vermesi, özellikle çalışmalarda duyarlılık ve özgüllük yüksek olduğu gösterilmesi, hem bakteri hem de mantarların saptanabilmesi, klinisyenin doğru antibiyoterapiye başlamasının daha çabuk sağlanması gibi avantajları mevcuttur. Bu yöntemler broad-range nükleik asit amplifikasyonu ve multiplex PCR testleridir, ancak hiçbirinin henüz FDA (Food and Drug Administration) tarafından onayı yoktur (34).

Broad-range PCR testlerinde kan örneklerinde bakterilere ait 16S ya da 23S rRNA ve mantarlara ait 18S rRNA genleri araştırılır. Amplifikasyondan sonra ampliconlar kapiller sekans analizi veya spesifik C problemleriyle hibridizasyon ile tanımlanabilir (35). Multiplex PCR testi kan örne inden direkt olarak patojenin tanımlanmasına olanak sağlar ve aynı anda tek örnekte birçok etkenin DNA hedefleri saptanabilir. Konvansiyonel kan kültürüyle karşılaştırıldığında PCR bazlı teknikler daha hızlı ve duyarlı olmalarına rağmen genel olarak bu yöntemlerin kan kültürünün yerini alamayacağı sadece destekleyici olacaktır. Kan kültürü ve PCR'ın kombine kullanımı bu yöntemlerin tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha duyarlı olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca antibiyotik direncinin tümü PCR tarafından belirlenemez (34).

2.7. Gram pozitif bakterilerde antibiyotik direnci

Uygunsuz antibiyotik kullanımının giderek artması beraberinde direnç sorununu da getirmiştir. Direnç esas olarak gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde büyük bir sorun olarak karşımıza çıksa da gram pozitif bakterilerdeki antibiyotik direnci de gitgide artmakta ve tedavi açısından sorun yaratmaktadır.

Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA), koagülaz negatif stafilokok (KNS) ve vankomisin dirençli enterokok (VRE) oranları dramatik ekilde artmaktadır (36). Antibiyotiklere direnç genelde dört mekanizmaya dayanır: ilacın inaktivasyonu, ilacın hedefine ulaşmasının engellenmesi, hedefin duyarlılığının azaltılması, duyarlı olmayan yeni bir hedef kazanımı (37).

Penisilin ile 1940'lı yıllarda tedavi edilmeye başlanan *S.aureus* infeksiyonlarında, hızla penisilin direnci gelişti ve 1960'lı yıllarda -laktamaza dirençli metisilin, oksasilin, nafsilin gibi yarı sentetik penisilinler kullanılmaya başlandı. Ancak 1961 yılında ilk metisilin dirençli MRSA'nın gösterilmesi direnç gelişiminin önemini daha da artırdı (38). Sıklıkla tedavide kullanılan beta laktam antibiyotiklere direnç; -laktamaz üretimi veya mecA geni tarafından kodlanan PBP2a oluşması ve yeni proteine antibiyotik affinitesinin azalması sonucu meydana gelmektedir (38).

Beta laktam antibiyotiklerin primer hedefi hücre duvarı sentezinin son basamağını katalizleyen penisilin binding proteinler (PBP) dir. Penisilin de bu proteinlere bağlanarak hücre duvar hasarı ve sonuçta bakterinin ölümüne neden olur. PBP'ler kromozomal kontrol altındadır ve ortaya çıkan mutasyonlar PBP'lerin sayılarını ya da beta laktamlara olan afinitelerini değiştirir (39). Penisilinlere direnç mikroorganizmanın penisilin parçalayan enzim (-laktamaz) üretimiyle bağlantılı olabilir. -laktamazlar penisilinlerin ve sefalosporinlerin -laktam halkasını kırarak açar ve aktivitelerini yok eder. Bazı -laktamazlar plazmidik (örneğin *S.aureus* penisilinazı), bazıları ise kromozomaldır (örneğin çoğu gram negative bakteri türü).

Penisiline karşı olan direnç mekanizması en fazla penisilinaz aracılığıyla olur. 1940'larda penisilin klinik kullanıma girmesiyle birlikte Stafilokok izolatlarında penisilin kullanım öncesi %1'den az olan direnç oranı günümüzde %80'lere ulaşmıştır. Bu durum penisilinazın bakteriofajlarla horizontal geçişine bağlıdır (37).

Metisilin penisilinaza dirençli penisilin türüdür. *S.aureus* ve KNS'lerdeki metisilin direnci, PBP2' veya PBP2a olarak adlandırılan ilave bir PBP'den kaynaklanır. PBP2a, düşük molekül ağırlıklı PBP'lerin B1 alt sınıfına aittir ve düşük -laktam afinitesine sahiptir (42). PBP2' veya PBP2a olarak adlandırılan bu ilave PBP mecA tarafından kodlanır (40). Bu gen stafilokok genomuna entegre

olmu , kazanımı yabancı bir DNA dizisi üzerinde ta ınır (stafilokokkal kaset kromozomu-SCCmec). Metisiline kar ı olu an direnç tüm -laktamları ve bunların derivelerini kapsar (37).

Pnömonoklardaki penisilin direnci PBP2x' aracılı ıyla olur (42). Yüksek dirençli pnömonok su larındaki PBP2x' PBP2b ve PBP1a'ların de i imiyle ortaya çıkar. Pnömonoklardaki -laktam direnci ise di er non-PBP genleri ile ili kilidir (AT). Ayrıca Pnömonoklarda bulunan mozaik genler de penisilin, kinolon, tetrasiklin direnci ile ili kilidir (43).

Enterokoklarda, penisiline kar ı artımı bir direnç vardır çünkü B1 alt sınıfından bir veya iki dü ük afiniteli PBP üretirler. *E.faecium*'un kromozomal kodlanan dü ük afiniteli PBP5'i, stafilokok PBP2a ile genetik olarak benzerdir. Yüksek seviyeli -laktam direnci nokta mutasyonları ve/veya PBP5'in a ın ekspresyonu sonucu olu ur (45).

Glikopeptidler; vankomisin ve teikoplanin, hücre duvarı sentezinin son a amalarını inhibe eder. Glikopeptidler peptidoglikan öncüllerinin terminal D-alanil-Dalanin ile kompleksler olu turarak çapraz ba lanma reaksiyonlarını önlerler. Glikopeptid direnci glikopeptid üreten bakterilerden kaynaklandı ı dü ünülen, konjüгатif bir element üzerinde bulunan büyük bir van gen kümesinin edinilmesinden kaynaklanmaktadır. Van geni normal peptidoglikan sentezini bozar ve glikopeptidlere azalmı ba lanma afinitesi olan D alanil-D-laktatla biten yeni bir peptidoglikan öncüsünün sentezine neden olur. Gen ekspresyonu ve regülasyonu mekanizması ile farklılık gösteren VanA, VanB ve VanD olmak üzere üç tip direnç determinanı vardır (45) . VanA, indüklenebilir yüksek seviyeli vankomisin ve teikoplanin direnci, VanB vankomisine kar ı indüklenebilir direnç, VanD ise indüklenebilir veya orta düzey vankomisin ve teikoplanin direnci anlamına gelir. Van gen kümeleri ile ili kili transfer genleri, bu direnç paternlerinin yayılmalarına katkıda bulunur. *S.aureus* tarafından üretilen bir cinsiyet feromonuna yanıt veren enterokokkal vankomisin direnç plazmiti ve *E.faecalis*'ten *S.aureus*'a VanA'nın ba arılı bir ekilde deneysel olarak aktarılması, klinik *S. aureus* izolatlarında van genlerinin ortaya çıkı ı ile ilgili büyük kaygılar yaratmıştır (46). Direnç multifaktöriyeldir ve su lar arasında farklılık gösteren mekanizmalara ba lıdır (47). *S. aureus*' un vankomisin direnç stratejilerinden biri de artımı hücre duvarı sentezi

ve çapraz bağlanmaların azalması ile yanlış hedeflerin oluşmasıdır (47). Kalınlımlı hücre duvarı vankomisinini yakalar, ortamdan uzaklaştırır ve hücre zarında bulunan lipid-II 'nin öldürücü hedefe ulaşmasını önler. Glikopeptid direncinin genetik temeli henüz tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak dirençte pek çok gen rol oynuyor gibi görünmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Ağustos 2016-Ekim 2016 tarihleri arasında bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi erişkin yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastaların, otomatize kan kültürü sisteminde pozitif sinyal veren antibiyotik absorban ve kömür içermeyen kan kültürü şişeleri (BacT/Alert FA-FN Plus, Biomerieux, Fransa) dahil edildi. Pozitif sinyal sonrası kan kültürü şişelerinden alınan örnek %5 koyun kanlı agar ve EMB agar besiyerlerine inoküle edildi ve aynı zamanda Gram boyalı preparatları hazırlandı. Gram boyama sonuçları değerlendirilip, gram pozitif bakteri görülen örneklerden 24 saatlik inkübasyon sonucu oluşan koloniler MALDI TOF MS sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. Tanımlanan örnekten bir sonraki adımda Vitek 2™ (Biomerieux, Fransa) otomatize duyarlılık cihazı ile etkenin antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı.

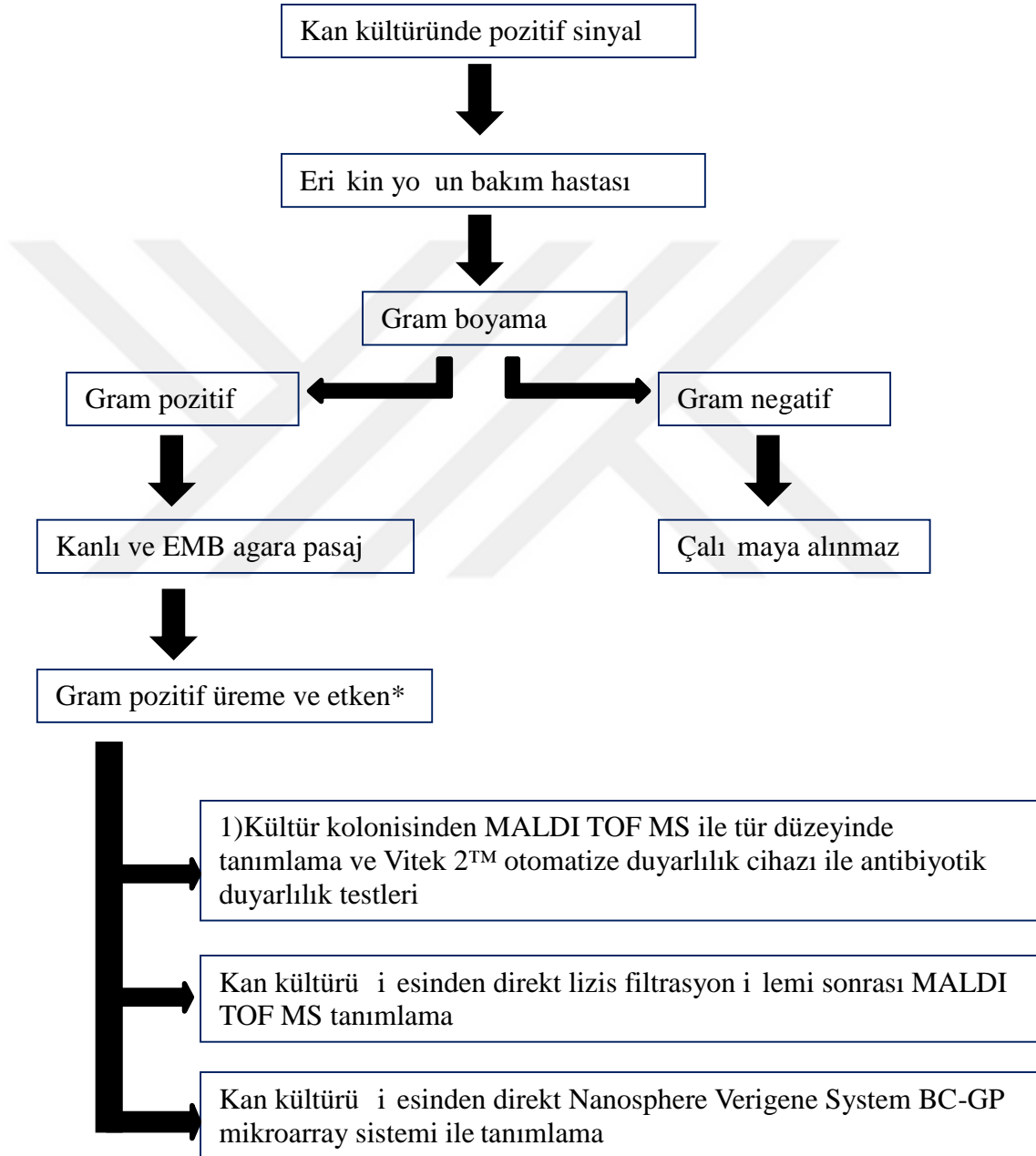
Gram pozitif üreme saptanan, etken olarak değerlendirilen ve mikroarray veri tabanında bulunan türleri içeren örnekler çalışmaya dahil edildi. Üreme sonrasında kültür kolonisinden MALDI TOF MS ile tür düzeyinde tanımlama ve Vitek 2™ (Biomerieux, Fransa) otomatize duyarlılık cihazı ile antibiyotik duyarlılık testleri yapıldı.

Ez zamanlı olarak yönergelere uygun yöntemlerle hazırlanmış solüsyonlar ve gereçler ile pozitif sinyal saptanan şişelerden alınan 2 ml örneğe lizis filtrasyon işlemi uygulanıp ardından Vitek MS MALDI TOF (Biomerieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapıldı.

Son olarak aynı kan kültürü şişelerinden alınan 0,35 mL kan kültürü örneği kullanılarak kapalı sistem nükleik asit ekstraksiyon ve amplifikasyon sonrasında nanopartikül problemleri ile çalışan Nanosphere Verigene System BC-GP mikroarray

(Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) test yöntemi kullanılarak Gram pozitif etkenin ve direnç genlerinin tanımlanması gerçekleştirildi. Uygulanan algoritma tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3. Pozitif sinyal sonrası tanımlamada izlenen yol



*mikroarray veri tabanında bulunan gram pozitif türler

Subkültürden yapılan MALDI TOF MS tanımlama, pozitif sinyal veren i eden yapılan lizis filtrasyon sonrası MS MALDI TOF (LFM) ve mikroarray test yöntemlerinin sonuçları karşılaştırıldı.

3.1. Gereçler ve Kimyasallar

BacT/Alert 3D otomatik kan kültürü cihazı (bioMérieux, Fransa)

Previ Color Gram boyama cihazı (bioMérieux, Fransa)

Vitek MS MALDI TOF MS cihazı (bioMérieux, Fransa)

Vitek MS MALDI TOF MS plate (bioMérieux, Fransa)

Vitek MS MALDI TOF MS CHCA matrix (bioMérieux, Fransa)

%5 Koyun Kanlı Agar (bioMérieux, Fransa)

Eozin Metilen Blue Agar (bioMérieux, Fransa)

Verigene System BC-GP test kartları (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD)

Brij O10 [Polioksietilen (10) oleil eter] (Amresco, ABD, Kat. No: 1B1335)

Sodyum Klorid (NaCl) (Amresco, ABD, Kat. No:0241)

3-[Sikloheksilamino]-1-Propan-Sulfonik Asit (CAPS) (Amresco, ABD, Kat. No: 0365)

Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich, ABD, Kat. No: 71636)

Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich, ABD, Kat. No: S5881)

Hidroklorik asit (HCl) (Sigma-Aldrich, ABD, Kat. No: H1758)

Enjektör uçlu 0,2 μm porlu polietersülfon filtre (Minisart®, Sartorius. Almanya Kat. No:16532)

Polyester balmıklı eküvyon (Cleanmo Corp, Çin, Kat. No: CM-PS743) (Texwipe TX743 muadili)

Millipore Express PLUS Membran Filtre, polietersulfon, 0.45 µm, 25 mm (HPWP02500) Merck-Millipore, ABD.

Vakum aspiratör (El yapımı)

El yapımı filtre tutacağı (MAS Grup Ltd. ti. vakum parçaları, Türkiye)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kan kültürü sistemi

Kan kültürü örnekleri BacT-Alert 3D (bioMérieux, Fransa) tam otomatik kan kültürü sisteminde inkübe edildi. BacT/Alert 3D mikrobiyal saptama sistemi, örneklerdeki üremeyi sürekli izleyen, inkübe eden ve çalkalayan kolorimetrik bir sistemdir. Örnek cihaza yerleştirildikten sonra, pozitif veya negatif olarak saptanana kadar periyodik olarak izlenir. BacT/Alert FA-FN Plus (bioMérieux, Fransa) kan kültürü için eleri, katı-faz reflektometrelerle sürekli izlenen karbondioksit sensörlerine sahiptir. BacT/Alert bilgi işlem sistemi sensör okumalarını denetler ve hangi örneklerin negatif, hangilerinin pozitif olduğunu karar veren bir veritabanına sahiptir. Üreme olmadu unun saptanması durumunda, cihaz tarafından sesli ve görüntülü alarm verilir. Örnekte beş günlük süre içerisinde herhangi bir üreme görülmez ise sonuç negatif olarak bildirilir.

Çalın mada erik in yo un bakım ünitelerinde (Anesteziyoloji ve Reanimasyon, Kalp Damar Cerrahisi, Ç Hastalıkları, Gö üs Hastalıkları, Nöroloji, Beyin ve Sinir Cerrahisi, Genel Cerrahi, Enfeksiyon Hastalıkları) yatan hastalardan alınan ve Nanosphere Verigene System BC-GP mikroarray (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) sisteminin veri tabanında bulunan gram pozitif bakteri üremesi saptanan kan kültürü için eleri kullanıldı.

3.2.2. Pozitif kan kültürünün i lenmesi

Pozitif olarak saptanan kan kültürü i elerinden enjektör yardımıyla alınan örnekten, 2-3 damla %5 koyun kanlı agar besiyerine (bioM rieux, Fransa) ve 2-3 damla EMB agar besiyerine (bioM rieux, Fransa) damlatılarak ekim yapıldı. 1-2 damla kan kültürü sıvısı da lama yayılıp Previ-Color (bioM rieux, Fransa) Gram boyama cihazı ile boyandı. Gram pozitif kok veya basil formu izlenen eri kin yo un bakım hastalarından alınan kan kültürü i eleri çalı mada kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

12-24 saat sonra, etkenin tür düzeyinde tanımlanması için MALDI TOF MS cihazının örnek slaytına koloniden alınan örnek aktarıldı ve üzerine CHCA matrix damlatılarak fiksasyonu ve kristalizasyonu sa landı. MALDI TOF MS cihazında tür düzeyinde tanımlanan patojen Nanosphere Verigene System BC-GP (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) cihazının veritabanındaki patojen bakteriler içerisinde ise kan kültürü i esi çalı maya dâhil edildi. Bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri Vitek 2 (bioM rieux, Fransa) otomatize sistem ile yapıldı ve elde edilen sonuçlar EUCAST 2015 (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) tablolarındaki öneriler do rultusunda raporlandı.

3.3.3. Lizis filtrasyon için 1 litre lizis solüsyonu hazırlanması

“%0,6 Brij 97+ 0,4M CAPS, pH: 11,7”

Gereçler

60 mL %10'luk Brij 97 [Polioksietilen (10) oleil eter] Stok solüsyonu*

88,5 gram [3- (sikloheksilamino) -1- propansülfonik asit (CAPS)]

2 litre distile su

5N NaOH (yakla ık 60 mL yeterli) (20,25 gram NaOH 100 mL'de çözülür)

1N NaOH (1 mL yeterli) (4 gram NaOH 100 mL'de çözülür)

0,2 µm porlu polietersülfon filtre (MiniSart® enjektör filtre)

***%10'luk Stok solüsyon hazırlanması (200mL)**

Brij 97 i esi +4°C'den çıkartılıp 36°C inkübatörde 30 dakika bekletildi. 200 mL'lik cam kap içerisine 20 gram Brij 97 tartıldı. Bu kaba 160 mL distile su eklenip,

manyetik karı tırcıda orta hızda üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak iki saat karı maya bırakıldı. ki saat sonunda distile su 200 mL'ye tamamlanarak, tekrar manyetik karı tırcı ile yava devirde dönmeye bırakıldı. Bu solüsyon, homojenize olduktan sonra steril bir ba ka kap içerisine 0,2 µm porlu polietersülfon filtreden süzülerek +4°C'de saklandı.

Lizis solüsyonunun hazırlanması

Bir litrelik dereceli silindirik kaba 88,5 gram CAPS, üzerine 400 mL distile su ve ardından 40 mL 5N NaOH eklendi. Alüminyum folyo ile üzeri kapatılarak manyetik karı tırcıda orta hızda tamamen çözünene dek karı maya bırakıldı, 100 mL daha distile su eklenerek karı tırmaya devam edildi. pH metre probu karı ıma daldırıldı ve pH 11,7±0,01 düzeyine ula ana kadar 5N NaOH eklenip, pH stabilize olana dek, be dakika daha probla takip edilerek karı tırmaya devam edildi. Daha sonra pH metre probu içinden çıkartılarak ve solüsyon iyice berrak hale gelene kadar karı maya bırakıldı. Solüsyonun içerisine 60 mL %10'luk Brij 97 stok solüsyonu eklendi. 10 dakika karı maya bırakıldı, tekrar pH ölçümü yapıldı ve pH 11,7±0,01 düzeyine ula ana kadar 5N veya 1N NaOH eklendi. Elde edilen solüsyon yeterli büyüklükteki bir dereceli cam kaba aktarıldıktan sonra, bir litre olana kadar distile su ile tamamlanarak 10 dakika daha karı tırıldı. Bu sırada pH metre ile ölçüm yapılarak pH 11,7±0,01 düzeyine ula ana kadar NaOH eklendi. Son olarak elde edilen solüsyon 0,2 µm porlu polietersülfon filtreden süzülerek 50 cc'lik steril kaplara üzerlerine tarih yazılarak bölü türüldü.

3.3.4. Lizis filtrasyon için 1 litre yıkama solüsyonu hazırlanması

“20mM Sodyum fosfat + %0,05 Brij 97+ %0,45 NaCl, pH:7,2”

Gereçler

Na₂HPO₄ (Sodyum fosfat, dibazik, anhidroz)

%10'luk Brij 97 Stok solüsyonu (lisis solüsyonunda kullanılan stok solüsyonu)

%0,45 NaCl (500 mL %0,9'luk NaCl 1000 cc distile su ile tamamlanarak)

5N ve 1N HCl [1N HCl:8.98mL HCl 100 mL distile su ile tamamlanarak,

dansite:1,16, a ırlık oranı:%35]

0,2 µm porlu polietersülfon filtre (MiniSart® enjektör filtre)
50 cc'lik steril kaplar

Yıkama solüsyonunun hazırlanması

900 mL %0,45'lik NaCl içine 5 mL %10'luk stok solüsyonu, elde edilen karı ıma da 2,84 gram Na₂HPO₄ eklenerek ve manyetik karı tırcıya konuldu. Karı ım pH metre ile sürekli ölçülerek ve HCl eklenerek pH 7,2'ye ayarlandı. %0,45'lik NaCl ile solüsyon 1000 cc'ye tamamlandı. 0,2 µm porlu polietersülfon filtreden süzülerek 50 cc'lik steril kaplara, üzerlerine tarih yazılarak bölü türüldü.

3.3.5. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS yönteminin uygulanması

Lizis filtrasyon sırasında pozitif kan kültürü i esinden alınan 2 ml kan kültürü sıvısına 1 mL lizis solüsyonu (%0,6 Brij 97+ 0,4M CAPS, pH: 11,7) eklenip be saniye vortekslendi. Elde edilen lizat iki dakika bekletildikten sonra 2 cm çapında 0.45 µm'lik kalınlıktaki polietersülfon filtreden 40 sn boyunca damlatılarak vakum aspirasyon cihazı yardımıyla filtre edildi. Kalan pellet 3 ml yıkama solüsyonu (20 mM Sodyum fosfat + %0,05 Brij 97+ %0,45 NaCl, pH 7,2) ile üç kez yıkandı. Filtrede kalan rezidü pellet polyester ba lıklı sürüntü çubu uyla (Cleanmo TX743) Vitek MS tanımlama tablasına aktarıldı ve CHCA (-Siyano-4-hidroksisinnamik asit) matriks uygulaması sonrası tanımlama gerçekleştirildi.

3.3.6. Verigene® gram positive blood culture nucleic acid test (BC-GP) (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD)

Verigene® Gram Pozitif Kan Kültürü Nükleik Asit Testi (BC-GP), potansiyel olarak bakteriyemi etkeni olabilecek Gram pozitif bakterilerin e zamanlı olarak saptanması ve tanımlanması için kalitatif, multipleks, in vitro bir tanı testidir. BC-GP testi, gram pozitif bakteri içeren BACTEC™ Plus Aerobik/F ve BacT/ALERT FA FAN® kan kültür i elerini kullanarak do rudan gerçekleştirilir.

BC-GP testinde *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* ve *Listeria spp.*'nin

cins düzeyinde saptanması için tuf gen hedeflerini tespit eden prob lar kullanılır. Tür düzeyinde tespit ise *S.aureus*, *S.anjinosus* grubu ve *S.pneumonia* için gyrB; *S.epidermidis*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *S.agalactiae* ve *S.pyogenes* için hsp60; *S.lugdunensis* için ise sodA gen hedefleri ile olur. Buna ek olarak, vanA ve vanB'yi saptayarak vankomisin direnci , mecA'yı saptayarak metisilin direnci bilgisini verir (48). Birden fazla etken oldu unda, van aracılıklı vankomisin direncinin *E. faecalis*'e ya da *E. faecium*'a, mecA aracılı metisilin direncinin *S. aureus*'a ya da *S. epidermidis*'e kar ılı olup olmadığını belirleyemez.

Sistem Verigene Processor SP ve Verigene Reader olmak üzere iki komponentten oluşmaktadır. Verigene Processor SP test protokolünü iki adımda gerçekleştirir.

(i) Örnek hazırlama: Pozitif kan kültürü ni elerinden hücre lizisi ve manyetik boncuk tabanlı nükleik asit ekstraksiyonu.

(ii) Hibridizasyon: Bir mikroarray formatındaki ve aracı hedefe özel yakalama DNA'sının bakteriyel DNA hibridizasyonu ve yakalanmış bakteriyel nükleik asitlere altın nanopartiküllü prob hibridizasyonu. Yakalama sahalarında ba ılı altın nanopartikül problemlerinin gümüş ile güçlendirmesi, okuyucu tarafından optik olarak değerlendirilebilen altın-gümüş agregatları ile sonuçlanmaktadır.

Her ekstraksiyon tepsi lizis/ba ılıyıcı tampon, parçalayıcı enzimleri, yıkama solüsyonları ve tampon solüsyonları gibi nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve test sonucu elde etmek için gerekli tüm solüsyonlarla önceden doldurulmuş haldedir ve bu malzemeler 2-8 °C sıcaklıkta saklanır. Her bir kullanım tepsi (utility tray) nükleik asitlerin ekstraksiyonu için gerekli çözeltiler ile önceden yüklenmiş olarak hazır ve -20°C'de saklanır.

Test çalışmasında, tek kullanımlık materyaller (ekstraksiyon tepsi, kullanım tepsi, pipetler) 15 dakikada oda ısısında bekletildikten sonra Verigene Processor SP'ye yüklendi, 350 µL pozitif kan kültürü örneğini ekstraksiyon tepsinde pipetlendi. Daha sonra test kartu nu numarası ile örnek bilgileri girilerek Verigene Reader'da test başlatıldı.

Otomatize ve kapalı sistemde ekstraksiyon, amplifikasyon ve sinyal güçlendirimi basamakları iki saat içinde tamamlandıktan sonra test kartu nunun

substrat slaytı Verigene Reader'a yerle tirilerek test sonuçları de erlendirildi. Sistem BC GP' nin veritabanına ait hedef bakteri ve genleri saptanması durumunda "Detected", olmaması durumunda "Not Detected" olarak kalitatif sonuç verdi. Geçersiz sonuçlar da Verigene yazılım sistemi tarafından "No Call" olarak verildi. Testin veritabanında bulunan bakteriler ve direnç genleri tablo 4'de gösterildi.

Tablo 4. "Verigene Blood Culture Assay" veritabanındaki bakteriler ve direnç genleri

<i>Staphylococcus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus anginosus group</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Listeria spp.</i>	<i>mecA</i> <i>vanA</i> <i>vanB</i>
--	--	---	---

3.3.7. statiksel Analiz Yöntemi

Elde edilen veriler istatikselsel analiz yöntemi olarak Cohen'nin Kappa katsayısı SPSS 18.0 programı ile analiz edildi. Cohen'in kappa katsayısı iki de erleyici arasındaki kar ıla tırmalı uyu manın güvenilirli ini ölçen bir istatistik yöntemidir (49). Cohen'in kappa ölçüsü her biri N tane maddeyi C tane birbirinden kar ılıklı hariç olan kategoriye ayıran iki de erleyicinin arasında bulunan uyu mayı ölçer. Ortaya çıkan kategorik de i ken oldu u için bir parametrik olmayan istatistik türüdür. Cohen'in kappa ölçüsü bu uyu manın bir ans eseri olabilece ini de ele aldı ı için basit yüzde orantı olarak bulunan uyu madan daha güçlü bir sonuç verdi i kabul edilir. Cohen'in kappa ölçüsü sadece iki tane de erleyiciyi ele alır (49). En sık saptanan üç bakteri olan Koagülaz Negatif Stafilokok, *S.aureus*, *Enterococcus* türlerinin kültür sonuçları ile lizis filtrasyon ve mikroarray testleri ile uyumu hesaplandı. Cohen'in kappa de erinin de erlendirilmesinde Landis ve Koch'un tablosu kullanıldı (50) (Tablo 5).

Kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemi ile elde edilen sonuç altın standart

kabul edilerek duyarlılık hesaplandı. Altın standart olarak kullanılan kültür sonrası MALDI TOF yönteminin moleküler bir yöntemle verifikasyonu yapılamadı ı için özgüllük hesaplanamadı.

Tablo 5. Kappa katsayısı de erlendirme tablosu

Katsayı	Yorum
< 0	Hiç uyu ma olmaması
0.0 — 0.20	Önemsiz uyu ma olması
0.21 — 0.40	Orta derecede uyu ma olması
0.41 — 0.60	Ekseriyetle uyu ma olması
0.61 — 0.80	Önemli derecede uyu ma olması
0.81 — 1.00	Neredeyse mükemmel uyu ma olması

4. SONUÇLAR

Çalı maya A ustos 2016-Ekim 2016 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi eri kin yo un bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan alınan ve çalı ma kriterlerine uygun olan gram pozitif bakteri üremesi saptanan 40 kan kültürü i esi dahil edildi. Gram negatif üremesi olan, birden fazla etken üreyen, pediatrik hastalar ve serviste yatan hastalardan alınan kan kültür örnekleri çalı maya dahil edilmedi. Çalı maya alınan pozitif sinyal veren tüm kan kültürü örnekleri u kategorilerde de erlendirildi:

- Kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle identifikasyon ve otomatize duyarlılık testleri ile direnç fenotipi belirlenmesi
- Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS ile identifikasyon
- Mikroarray yöntemiyle etken identifikasyonu ve direnç genotipinin belirlenmesi

4.1. dentifikasyon sonuçları

Çalı maya alınan toplam 40 etkeninin kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle yapılan identifikasyonunda en sık saptanan  etken; Koagülaz negatif stafilokok (KNS) (15, %37.5), *Stapylococcus aureus* (10, %25), *Enterococcus faecium* (7, %17.5) olarak sıralanmı tır. KNS' lerin türleri sadece tabloda belirtilmek için yazılmı tır, kar ıla tırma yapılırken tümü KNS olarak de erlendirilmı tır. Kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemi, Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF (LFM) yöntemi ve mikroarray yöntemleri ile elde edilen identifikasyon sonuçları ayrı tablolar halinde Tablo 6,7,8'de sırasıyla verilmi tır.

Kültür sonrası MALDI TOF MS, LFM yöntemi ile ve pozitif sinyal sonrası, direkt kan kültürü i esinden uygulanan mikroarray yöntemi ile elde edilen bakteri tanımlama sonuçları da Tablo 9'da kar ıla tırmalı olarak sunulmu tur. Kültür sonrası MALDI TOF MS identifikasyonu ile LFM identifikasyonu kar ıla tırıldı ında %75 (30/40) benzerlik saptanmı tır. Kültür ile kombine MALDI TOF MS altın standart olarak kabul edildi inde, duyarlılık %75 olarak hesaplanmı tır. Kültür sonrası MALDI TOF MS identifikasyonu ile mikroarray sonuçları birbiriyle %90 (36/40) oranında benzerlik göstermi tır. Kültür sonrası MALDI TOF MS identifikasyonu altın standart olarak kabul edildi inde, duyarlılık %90 hesaplanmı tır. LFM ile mikroarray yöntemlerinin birbirleri ile benzerli i %83.3 (30/36) bulunmu tur. Her  yöntemin birlikte tutarlı sonuç verdi i örneklerin oranı ise %67.5 (27/40) olarak hesaplanmı tır. Uyumsuz bulunan 13 örnek tablo 10'da verilmi tır.

Kültür sonrası MALDI TOF MS ile LFM yöntemleri ile en sık saptanan  etken olan KNS, *S.aureus*, *E.faecium* türleri ele alınarak iki yöntem arasındaki uyum Cohen'nin kappa katsayısı ile hesaplanmı sonuçlar ve uyum de erleri tablo 11'de gsterilmı tır. Aynı ekilde en sık saptanan  etken ele alındı ında, kültür sonrası MALDI TOF MS ile mikroarray yönteminin uyumu Cohen'in kappa katsayısı ile hesaplanmı ve Tablo 12'de sunulmu tur. Kültür sonrası MALDI TOF MS ile LFM yöntemleri arasında yapılan etken bazında tek tek kar ıla tırma tablo 13'de, kültür sonrası MALDI TOF MS ile mikroarray yöntemleri arasında yapılan etken bazında tek tek kar ıla tırma tablo 14'de sunulmu tur.

Sekiz kültür i esinden LFM tanı yöntemiyle sonuç elde edilemezken, iki kan kültürü i esinden yapılan çalı mada kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle elde edilenden farklı bakteri tanımlanması yapılmı tır. LFM yöntemi kullanılarak tanımlama yapılamayan sekiz örne in kültür sonrası MALDI TOF MS sonuçları u ekildedir; üç örnekte KNS, iki örnekte *E.faecium*, bir örnekte *S.aureus*, bir örnekte *S.mitis*, bir örnekte de *E.faecalis* identifiye edilmi tir. Farklı cins tayini yapılan iki örnekten birincisinde LFM yöntemiyle *C.striatum* olarak tanımlanan bakteri kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *E.faecalis*, ikincisinde ise LFM yöntemiyle *L.grayi* olarak tanımlanan bakteri kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *S.sanguinis* olarak tanımlanmı tır.

Çalı maya alınan 40 örne in ikisinde (%5) mikroarray yönteminde “No Call” hatası alınmı ve bu örnekler “tanımlama yapılamadı” olarak kabul edilmi tir. Mikroarray yöntemiyle tanımlanamayan her iki etken de kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *S.aureus* olarak identifiye edilmi tir. Bir örnekte de Mikroarray yöntemiyle herhangi bir etken saptanamamı tır. Mikroarray yöntemiyle etken saptanamayan bu örnekte kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *E.casseliflavus* identifiye edilmi tir.

Tablo 6.Kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemi ile elde edilen sayı ve oranlar

ETKEN	SAYI	ORAN(%)
KNS	15	%37.5
<i>S.aureus</i>	10	%25
<i>E.faecium</i>	7	%17.5
<i>E.faecalis</i>	5	%12.5
<i>E.casseliflavus</i>	1	%2.5
<i>S.mitis</i>	1	%2.5
<i>S.sanguinis</i>	1	%2.5
Toplam	40	%100

Tablo 7. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS ile elde edilen sayı ve oranlar

ETKEN	SAYI	ORAN(%)
KNS	12	%30
<i>S.aureus</i>	9	%22.5
<i>E.faecium</i>	5	%12.5
<i>E.faecalis</i>	3	%7.5
<i>E.casseliflavus</i>	1	%2.5
<i>C.striatum</i>	1	%2.5
Listeria grayi	1	%2.5
Ba arısız	8	%20
Toplam	40	%100

Tablo 8.Mikroarray ile saptanan etkenlerin sayı ve oranları

ETKEN	SAYI	ORAN(%)
KNS	16	%40
<i>S.aureus</i>	8	%20
<i>E.faecium</i>	7	%17.5
<i>E.faecalis</i>	4	%10
<i>Streptococcus sp</i>	2	%5
No call hatası	2	%5
Yok	1	%2.5
Toplam	40	%100

Tablo 9. Her üç yöntemle elde edilen identifikasyon sonuçları

	KÜLTÜR	L Z S F LTRASYON	M KROARRAY
1	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>
2	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>
3	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
4	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.lugdunensis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
5	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>
6	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	Yok	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
7	<i>S.aureus</i>	Yok	<i>S.aureus</i>
8	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	Yok	<i>Stapylococcus spp.</i>
9	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>
10	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>
11	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>
12	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	No Call
13	KNS(<i>S.hominis</i>)	KNS(<i>S.hominis</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>
14	<i>S.mitis</i>	Yok	<i>Streptococcus spp.</i>
15	<i>E.faecalis</i>	Yok	<i>E.faecalis</i>
16	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
17	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>
18	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>
19	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>
20	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>
21	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>
22	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
23	<i>E.faecium</i>	Yok	<i>E.faecium</i>
24	KNS(<i>S.hominis</i>)	KNS(<i>S.hominis</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>
25	<i>E.casseliflavus</i>	<i>E.casseliflavus</i>	Yok
26	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	Yok	<i>Stapylococcus spp.</i>
27	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
28	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>
29	<i>E.faecium</i>	Yok	<i>E.faecium</i>
30	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>
31	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>
32	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>
33	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
34	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>
35	<i>E.faecalis</i>	<i>C.striatum</i>	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
36	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	No Call
37	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
38	<i>S.sanguinis</i>	<i>L.grayi</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
39	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>
40	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>

Tablo 10. Birbiriyle uyumsuz sonuçlar

KÜLTÜR	L Z S F LTRASYON	M KROARRAY
6 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	Yok	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
7 <i>S.aureus</i>	Yok	<i>S.aureus</i>
8 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	Yok	<i>Stapylococcus spp.</i>
12 <i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	No Call
14 <i>S.mitis</i>	Yok	<i>Streptococcus spp.</i>
15 <i>E.faecalis</i>	Yok	<i>E.faecalis</i>
23 <i>E.faecium</i>	Yok	<i>E.faecium</i>
25 <i>E.casseliflavus</i>	<i>E.casseliflavus</i>	Yok
26 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	Yok	<i>Stapylococcus spp.</i>
29 <i>E.faecium</i>	Yok	<i>E.faecium</i>
35 <i>E.faecalis</i>	<i>C.striatum</i>	KNS(<i>S.epidermidis</i>)
36 <i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	No Call
38 <i>S.sanguinis</i>	<i>L.grayi</i>	<i>Streptococcus spp.</i>

Tablo 11. Kültür sonrası MALDI TOF MS ve LFM yöntemleri ile saptanmış en sık üç etkenin Cohen'in kapa de eri ve yorumu

ETKEN	Cohen'in Kappa de eri	YORUM
KNS	0,833	Neredeyse mükemmel uyu ma olması
<i>S.aureus</i>	0,931	Neredeyse mükemmel uyu ma olması
<i>Enterococcus spp.</i>	0,752	Önemli derecede uyu ma olması

Tablo 12. Kültür sonrası MALDI TOF MS ve mikroarray yöntemleri ile saptanmış en sık üç etkenin Cohen'in kapa de eri ve yorumu

ETKEN	Cohen'in Kappa de eri	YORUM
KNS	0,947	Neredeyse mükemmel uyu ma olması
<i>S.aureus</i>	0,857	Neredeyse mükemmel uyu ma olması
<i>Enterococcus spp.</i>	0,881	Neredeyse mükemmel uyu ma olması

Tablo 13. Etken bazında kültür sonrası MALDI TOF MS ile LFM karılaştırılması

Kültür sonrası MALDI TOF MS	LFM		
	Kültürle aynı etken	Kültürden farklı etken veya etken yok	Toplam
KNS	12 (%80)	3 (%20)	15 (%100)
<i>S.aureus</i>	9 (%90)	1 (%10)	10 (%100)
<i>E.faecium</i>	5 (%71.4)	2 (%28.6)	7 (%100)
<i>E.faecalis</i>	3 (%60)	2 (%40)	5 (%100)
<i>E.casseliflavus</i>	1 (%100)	0 (%0)	1 (%100)
<i>S.mitis</i>	0 (%0)	1 (%100)	1 (%100)
<i>S.sanguinis</i>	0 (%0)	1 (%100)	1 (%100)
Toplam	30 (%75)	10 (%25)	40 (%100)

Tablo 14. Etken bazında kültür sonrası MALDI TOF MS ile mikroarray karılaştırılması

Kültür sonrası MALDI TOF MS	M KROARRAY		
	Kültürle aynı etken	Kültürden farklı etken veya etken yok	Toplam
KNS	15 (%100)	0 (%0)	15 (%100)
<i>S.aureus</i>	8 (%80)	2 (%20)	10 (%100)
<i>E.faecium</i>	7 (%100)	0 (%0)	7 (%100)
<i>E.faecalis</i>	4 (%80)	1 (%20)	5 (%100)
<i>E.casseliflavus</i>	0 (%0)	1 (%100)	1 (%100)
<i>S.mitis</i>	1 (%100)	0 (%0)	1 (%100)
<i>S.sanguinis</i>	1 (%100)	0 (%0)	1 (%100)
Toplam	30 (%75)	10 (%25)	40 (%100)

4.2. Duyarlılık testi sonuçları

Mikroarray yöntemiyle 10 bakteride 10 adet direnç geni saptanmıştır. Konvansiyonel kültür sonrası Vitek 2 ile yapılan duyarlılık testi sonucunda elde edilen çeşitli direnç paternleri ve mikroarray yöntemi ile belirlenen direnç geni sonuçları Tablo 15’de gösterilmiştir. Mikroarray ile çalışılan 37 kan kültürünün (iki No Call hatası, birinde de etken saptanamadı) 10’unda (%27) antibiyotik direnç geni belirlenmiştir. Saptanan direnç genlerinin dokuzu (%90- 10/9) mecA ve biri de (%10- 10/1) vanA’dır. Mikroarray ile direnç geni saptanmayan 27 örneğin 13’ünde (%48.1) Vitek 2 ile antibiyotiklere direnç saptanmıştır.

Çalışmaya alınan 40 örneğin 24’ünde (%60) kültür sonrası Vitek 2 otomatize antibiyotik duyarlılık testi ile direnç profilleri belirlenmiştir. Bunların da oranı %62.5’i (15/24) mecA+ penisilinaz, %33.3’ü (8/24) penisilinaz ve %4.1’i (1/24) vanA eklenmiştir. mecA sonuçları ele alındığında, mikroarray ile saptanan 9 mecA geninin Vitek 2 sonuçları ile uyumu %88.8 (8/9) olarak bulunmuştur. mecA sonucu uyumsuz olarak saptanan bu üç örnekte mikroarray testinde kültür sonrası MALDI-TOF MS’ten farklı bir bakteri tanımlanması yapılmıştır. Mikroarray ile mecA geni saptanan 9 bakteriye karşılık gelen Vitek2 ile yapılan otomatize duyarlılık testinde tüm örneklerde penisilin direnci ön bilgisi verilmiştir. Mikroarray ile vanA geni saptanan *E.faecium* tanımlanmış örnekte otomatize duyarlılık testinde de vankomisin direnç bilgisi verilmiştir.

Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık testiyle 15 örnekte mecA+ penisilinaz saptanmıştır. Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık sonuçları ile mikroarray karşılaştırıldığında ikisinin birlikte uyumlu direnç sonucu verdiği örnek %53.3 (8/15) eklenmiştir. mecA saptanamayan yedi örneğe bakıldığında mikroarray veri tabanında bulunmayan KNS türlerinin tanımlandığı görülmüştür. Uyumsuz bulunan direnç profilleri tablo 16’da belirtilmiştir. Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık testiyle sekiz örnek için penisilin direnç bilgisi verilmiştir ancak bunların hiçbirisi için mikroarray testinde ek direnç bilgisi verilmemiştir.

Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık sonuçları ile mikroarray yöntemiyle belirlenen direnç paternlerinin karşılaştırılması Tablo 15’de sunulmuştur ; Tablo 17’de ise identifikasyon ve direnç olmak üzere tüm sonuçlar bir arada sunulmuştur.



Tablo 15. Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık sonuçları ile mikroarray yöntemiyle belirlenen direnç paternlerinin karşılaştırılması

KÜLTÜR SONUCU	OTOMATİK ZEMİN DİRENÇ YORUMU	MİKROARRAY DİRENÇ YORUMU
1 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	-
2 <i>E.faecium</i>		
3 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
4 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
5 <i>E.faecium</i>		
6 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
7 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	-
8 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	-
9 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	-
10 <i>E.faecalis</i>		
11 <i>S.aureus</i>		
12 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	No call
13 KNS(<i>S.hominis</i>)	mecA+ penisilinaz	-
14 <i>S.mitis</i>		
15 <i>E.faecalis</i>		
16 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
17 <i>E.faecium</i>		
18 <i>S.aureus</i>		
19 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
20 <i>E.faecium</i>	vanA	vanA
21 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	-
22 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
23 <i>E.faecium</i>		
24 KNS(<i>S.hominis</i>)	mecA+ penisilinaz	-
25 <i>E.casseliflavus</i>		Etken saptanamadı
26 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
27 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
28 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
29 <i>E.faecium</i>		
30 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
31 <i>E.faecium</i>		
32 <i>E.faecalis</i>		
33 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
34 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	-
35 <i>E.faecalis</i>		mecA
36 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	No call
37 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	mecA
38 <i>S.sanguinis</i>		
39 <i>E.faecalis</i>		
40 <i>S.aureus</i>	penisilinaz	-

Tablo 16. Uyumsuz bulunan direnç profilleri

KÜLTÜR SONUCU	OTOMAT ZE AB. D RENÇ YORUMU	M KROARRAY D RENÇ YORUMU
8 KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	-
13 KNS(<i>S.hominis</i>)	mecA+ penisilinaz	-
19 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
24 KNS(<i>S.hominis</i>)	mecA+ penisilinaz	-
26 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
28 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
30 KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	-
35 <i>E.faecalis</i>		mecA

Tablo 17. Tüm sonuçların kararlaştırılması

KÜLTÜR SONUCU	OTOMATİK ZEMİN DEĞERlendİRME YORUMU	L Z S F LTRASYON	M KROARRAY SONUÇ	M KROARRAY DEĞERlendİRME	
1	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	-
2	<i>E.faecium</i>		<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	
3	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
4	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.lugdunensis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
5	<i>E.faecium</i>		<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	
6	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	Yok	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
7	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	Yok	<i>S.aureus</i>	
8	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	Yok	<i>Stapylococcus spp.</i>	-
9	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	
10	<i>E.faecalis</i>		<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	
11	<i>S.aureus</i>		<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	
12	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	<i>S.aureus</i>	No Call	No Call
13	KNS(<i>S.hominis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.hominis</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>	-
14	<i>S.mitis</i>		Yok	<i>Streptococcus spp.</i>	
15	<i>E.faecalis</i>		Yok	<i>E.faecalis</i>	
16	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
17	<i>E.faecium</i>		<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	
18	<i>S.aureus</i>		<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	
19	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>	-
20	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	vanA
21	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	
22	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
23	<i>E.faecium</i>		Yok	<i>E.faecium</i>	
24	KNS(<i>S.hominis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.hominis</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>	-
25	<i>E.casseliflavus</i>		<i>E.casseliflavus</i>	yok	yok
26	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	Yok	<i>Stapylococcus spp.</i>	-
27	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
28	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>	-
29	<i>E.faecium</i>		Yok	<i>E.faecium</i>	
30	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.haemolyticus</i>)	<i>Stapylococcus spp.</i>	-
31	<i>E.faecium</i>		<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	
32	<i>E.faecalis</i>		<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	
33	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
34	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	
35	<i>E.faecalis</i>		<i>C.striatum</i>	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
36	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	<i>S.aureus</i>	No Call	No Call
37	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA+ penisilinaz	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	KNS(<i>S.epidermidis</i>)	mecA
38	<i>S.sanguinis</i>		<i>L.grayi</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	
39	<i>E.faecalis</i>		<i>E.faecalis</i>	<i>E..faecalis</i>	
40	<i>S.aureus</i>	penisilinaz	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	

5. TARTI MA

Bakteriyemi ve sepsis hızlıca hayati tehdit edebilecek boyutlara ulaşabilen, yüksek mortaliteyle seyreden ve sıklıkla harcamalarına büyük etkisi olan ciddi klinik tablolardır. Bakteriyel sepsis özellikle yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda, onkoloji ve transplant hastaları gibi immünyüpresif tedavi alan hastalarda ve cerrahi sonrasında önemli sorun yaratan tablodur. Sepsiste etken soyutlanmadan yapılan uygunsuz antibiyotik tedavisinde veya gerekli tedavi geciktirildiğinde mortalite ve morbidite artmaktadır. Sepsis nedeniyle hastaneye yatışlar, tedavi için yapılan harcamalar her yıl daha da artmakta ve tıptaki tüm gelişmelere rağmen mortalite yüksek seyretmektedir. Bu yüzden, sepsiste etkeni daha hızlı tanımlamak ve direnç hakkında bilgi vermek, tedaviyi etkin yönlendirmek mortalite ve morbiditeyi azaltmada önemli yarar sağlar.

Bakteriyemiye neden olan mikroorganizmayı izole etmek için en önemli ve hala günümüzde de altın standart olarak kabul edilen tanı yöntemi kan kültürüdür. Kan kültüründe pozitiflik sonrasında iderlerden gram boyama yapılır, katı besiyerine pasaj çekilir ardından etkenin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılır. Ancak, pozitif sinyal sonrası üretilen mikroorganizmanın klasik yöntemlerle identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için en az 48-72 saatlik bir zaman dilimine ihtiyaç duyulmaktadır. Sepsiste tedavi için geçen her saatin mortalite ve morbiditeyi arttırdığı bilindiğinden hızlı tanı testlerine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır.

Pozitif sinyal sonrası kültürü yapılan mikroorganizmayı daha çabuk tanımlamak için son yıllarda hızlı sonuç veren sistemler üzerinde çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda mikroorganizmanın kütle spektrometrisini ölçme prensibine dayanan MALDI TOF MS yönteminde ilerlemeler kaydedilmiştir. Ayrıca pozitif sinyal saptanan iden subkültür yapılmadan lizis filtrasyonu idemi sonrası MALDI TOF MS ile de tanımlama yapılabilir. Bu idem yaklaşık 15 dk sürer ve bu sürede mikroorganizma tanımlanabilir ancak duyarlılık hakkında fikir verilemez. Pozitif sinyal sonrası hızlı tanımlama için kullanılabilecek diğer bir yöntem moleküler tabanlı mikroarray yöntemidir. Bu yöntemle de yaklaşık iki buçuk saat gibi bir sürede tanımlama yapılır ayrıca bazı direnç profilleri hakkında bilgi

edinilebilir. Kan kültürüne gerek olmadan direkt taze kan örneğinden yapılan testler de mevcuttur: Bu yöntemler broad-range nükleik asit amplifikasyonu ve multiplex PCR testleridir, ancak hiçbirinin henüz FDA tarafından onayı yoktur.

Çalışmamızda, Fothergill ve arkadaşlarının (9) yaptıkları ve ardından Vitek MS (bioMérieux, Fransa) cihazında kullanılan lizis filtrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal alınan kan kültürü örneklerinde üreyen bakterinin identifikasyonu için kültür sonrası MALDI TOF MS tanımlama yöntemi, daha hızlı sonuç vermek için de lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS (LFM) tanımlama yöntemi ve mikroarray yöntemi olmak üzere üç yöntem kullanılmıştır ve bu yöntemler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca tanımlanan etkenlerin mikroarray yöntemi ile direnç profillerinin belirlenmesindeki etkinliği araştırılmıştır.

Değerlendirmeye alınan 40 kan kültürü örneğinin kültür sonuçları sayı ve yüzdeleri ile birlikte şu şekildedir; KNS (15, %37.5), *S.aureus* (10, %25), *E.faecium* (7, %17.5), *E.faecalis* (5, %12.5), *E.casseliflavus* (1, %2.5), *S.mitis* (1, %2.5), *S.sanguinis* (1, %2.5) (Tablo 6). KNS'lerin türleri ayrı ayrı hesaplanmayıp tümü KNS olarak ele alınmıştır. LFM ve mikroarray yöntemleri ile de tanımlanan en sık üç etken aynıdır (Tablo 7 ve Tablo 8). Örnek büyüklüğünün az olması ve sadece yoğun bakım hastalarının çalışmaya dahil edilmesi nedeniyle verilen oranlar sıralaması genel popülasyondaki sıklığı yansıtmayabilir. Bakteriyemi etkeni olarak izole edilen etkenler ülkelere ve kliniklere göre farklılık göstermekle birlikte ülkemizde yapılan çalışmalarda en sık Gram-pozitif etkenler koagülaz negatif stafilocoklar (KNS), *Staphylococcus aureus* ve enterokok türleridir. En sık Gram negatif etkenler *Acinetobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp* olarak bildirilmiştir. En sık izole edilen anaerob bakteriler de *Bacteroides fragilis* ve *Fusobacterium* türleridir (18-20). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde en sık izole edilen mantarlar *C.albicans*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'tir (21). Genel olarak ülkemizdeki en sık gram pozitif etkenlere bakıldığında çalışmamızda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Çalı mamızda kültür sonrası MALDI TOF MS identifikasyonu ile LFM identifikasyonu kar ıla tırıldı ında %75 (30/40) benzerlik saptanmı tır. Kültür sonrası MALDI TOF MS tanımlama altın standart olarak kabul edildi inde, duyarlılık %75 olarak hesaplanmı tır. Kültür sonrası MALDI TOF MS ile LFM yöntemleri ile en sık saptanan üç etken olan KNS, *S.aureus*, *E.faecium* türleri ele alınarak iki yöntem arasındaki uyum Cohen'nin kappa katsayısı ile sırasıyla 0.833, 0.931, 0.752 olarak hesaplanmı (tablo 11) ve sonuçlar KNS, *S.aureus* için; neredeyse mükemmel uyum, *E.faecium* için ise önemli derecede uyum olarak yorumlanmı tır. Kültür sonrası MALDI TOF MS ile LFM yöntemleri arasında yapılan etken bazında tek tek kar ıla tırmada LFM'nin KNS' lerin %80'ini, *S.aureus*'ların %90'ını, *E.faecium*'ların %71.4'ünü, *E.faecalis*'lerin %60'ını do ru tanımladı ı görülmü tür. LFM *E.casseliflavus*'u do ru tanımlamı , ancak *S.mitis*'i tanımlayamamı ve *S.sanguinis*'u ise *L.grayi* olarak tanımlamı tır (tablo 10). Sekiz kan kültürü i esinden (8/40, %20) LFM tanı yöntemiyle herhangi bir sonuç elde edilemezken, iki kan kültürü i esinden (2/40, %5) yapılan çalı mada kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle elde edilenden farklı bakteri tanımlanması yapılmı tır. LFM yöntemi kullanılarak tanımlama yapılamayan sekiz örne in kültür sonrası MALDI TOF MS sonuçları u ekildedir; üç örnekte KNS, iki örnekte *E.faecium*, bir örnekte *S.aureus*, bir örnekte *S.mitis*, bir örnekte de *E.faecalis* identifiye edilmi tir. Farklı cins tayini yapılan iki örnekten (35 ve 38 numaralı örnekler) birincisinde (35 numaralı örnek) kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *E.faecalis* olarak tanımlanan bakteri LFM yöntemiyle *C.striatum* olarak tanımlanmı tır. Bu hastanın tüm kan kültürü örnekleri de erlendirildi inde bir sonraki kan kültüründe ikili etken (*E.faecalis* ve KNS) üredi i görülmü tür. Ayrıca 35 numaralı örnekten yapılan mikroarray testinde de KNS (*S.epidermidis*) identifiye edilmi tir. Farklı cins tayini yapılan ikinci örnekte (38 numaralı örnek) ise kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *S.sanguinis* olarak tanımlanan bakteri LFM yöntemiyle *L.grayi* olarak tanımlanmı tır.

Literatür incelendi inde LFM metodu uygulanan ara tırmalara rastlanılmaktadır. Fothergill ve arkadaşlarının (9) 131 izolat üzerinde yaptı ı çalı mada, tür düzeyinde tanımlama uyumu, subkültür sonrası yapılan Vitek MS (bioMérieux, Fransa) uygulaması ile %99 olarak saptanmı tır. Örneklerden birinde

(%2.3) yanlış etken tanımlanmıştır. Lizis filtrasyon için aynı prosedürün kullanıldığı Machen ve arkadaşlarının (51) yaptığı çalışmada 100 örnek incelenmiş, örneklerin %94'ünde tür seviyesinde ve %2'sinde cins seviyesinde doğru tanımlama yapılmıştır. Örneklerin %3'ünde herhangi bir etken izole edilememi ve %1'inde yanlış tanımlama yapılmıştır. Yine aynı çalışmada lizis filtrasyon işlemi sonrasında elde edilen pellet 0,5 McFarland bulanıklığına eşit sulandırılarak Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize antibiyotik duyarlılık cihazında çalışılmış ve kültür kolonisinden yapılan Vitek 2 ile %93.5 uyumlu sonuç elde edilmiştir. Böylece konvansiyonel yöntemlerle 72 saat süren identifikasyon ve duyarlılık sonucu elde etme süresi 7-11 saate kadar düşürülmüştür. Farina ve arkadaşlarının (52) yaptığı aynı lizis filtrasyon prosedürünün kullanıldığı başka bir çalışmada gram pozitif bakteriler ve gram negatif bakteriler arasında belirgin fark olmakla birlikte genel uyum %78.1 olarak bulunmuştur. LFM yöntemiyle gram negatif bakterilerdeki uyum %92.6, gram pozitif bakterilerdeki uyum %69.8 olarak belirtilmiştir. Gram pozitif bakterilerdeki tanımlama sorunu en sık *S.pneumoniae*'da görülmüş, kökenlerin %64.3'ü doğru tanımlanamamıştır. La Scola ve arkadaşlarının (53) yaptığı başka bir lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS çalışmasında 599 kan kültürü testi incelenmiştir. Gram negatif bakterilerdeki uyum %87, gram pozitif bakterilerdeki uyum %67 olarak belirtilmiştir. Etken bazında doğru tanımlama oranları; *S.aureus* için %58, *S.epidermidis* için %80, *E.faecalis* için %60, *E.faecium* için %75'dir.

Çalışmamızda kullanılan filtre tutucunun el yapımı olması, teknik olarak kullanım zorluğu yaratması ve çalışılan bakteri sayısının sınırlı ve görece az olması, yalnızca gram pozitiflerin çalışmaya dahi edilmesi uyumun diğer çalışmalara göre daha az bulunmasını açıklayabilir. Ancak yalnızca gram pozitif bakterilerdeki uyuma bakıldığında çalışmamızda bulunan uyum oldukça yüksektir. Daha fazla örnek çalışılması, filtre tutucunun standart olması, vakumun otomatik ayarlanması ve deneyim kazanılması ile bu yöntemde başarı oranının artırılması öngörülmektedir.

Talimatlar do rultusunda hazırlanan lizis filtrasyon solüsyonlarının reagenleri, 0,45 mikrometrelik polyetersulfon filtre ve polyester uçlu eküvyonların toplam maliyeti yakla ık olarak 1.000 ± 10 TL'dir (satın alma dönemindeki döviz kuru ile). Hazırlanan reagenler ile yakla ık 500 örnek, bir kutu filtre ile de 100 örnek çalı ılabilir. Çalı ılan her kan kültürü i esi ba ına daha do ru sonuç verebilmek için MALDI TOF MS tanımlama slaytından iki kuyucuk kullanılmı tır. Kullanılan iki kuyucu a ek olarak ~6 TL filtre, ~3 TL reagen ve sarf malzemesi ve de MALDI TOF MS matriks hesaplandı ında bir test yakla ık 29 TL'ye mal edilmi tir. Bunun yanısıra, kan kültürü i esi pozitif sinyal verdikten sonra testin uygulanıp sonuç alınması yakla ık 15-20 dakika sürmektedir. Lizis filtrasyon yönteminin kullanım kolaylı ı, ucuzlu u ve hızlı sonuç verme gibi avantajlarının yanında, inhibitör (kömür) içeren kan kültürü i elerinden çalı ılamama, kullanıcı becerisinin sonucu etkilemesi, çoklu etkenlerden yapılan çalı malarda sadece tek etkeni tanımlayabilmesi ya da yanlış tanımlama yapması gibi dezavantajları mevcuttur.

Son zamanlarda mikrobiyoloji laboratuvarında pek çok etkeni tanımlamak için nükleik asit testleri kullanılmaktadır. Bu testler ço unlukla kültürde üretilmeyen veya güç üreyen virüslerin tanısında kullanılsa da, daha hızlı sonuç verebilmek ve tedaviye erken yön verebilmek adına bakteriyoloji laboratuvarında da nükleik asit testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalı mada kullanılan di er bir yöntem de nükleik asit test prensibine dayanan hızlı bir tanı yöntemi olan mikroarray yöntemidir. Çalı mamızda kullanılan Verigene System™ BC-GP mikroarray sistemi (Nanosphere, ABD), pozitif sinyal veren kan kültürü i esinden alınan sıvı örne in direkt olarak yüklenip, otomatize ekilde ekstraksiyon ve amplifikasyon basamaklarının gerçekleştirildi i tamamen kapalı bir sistemdir. Bu yöntemle elde edilen ürünler özel bir cama aktarılıp olu an sinyaller altın ve gümü nanopartiküller aracılı ıyla güçlendirilmektedir. Veritabanına ait hedef bakteri ve genleri saptanması durumunda "Detected", olmaması durumunda "Not Detected", geçersiz sonuçlar da cihaz yazılım sistemi tarafından "No Call" olarak olarak verilmektedir. Bu i lem ile kan kültürü i esi pozitif sinyal verdikten sonra sıvı örnek direkt pipetlenerek cihaza yüklenir ve yakla ık iki buçuk saat sonra sonuç alınır.

Çalı mamızda kültür sonrası MALDI TOF MS identifikasyonu ile Verigene System™ BC-GP (Nanosphere, ABD) mikroarray sonuçları birbiriyle %90 (36/40) oranında benzerlik göstermi tir. Kültür sonrası MALDI TOF MS identifikasyonu altın standart olarak kabul edildi inde, duyarlılık %90 olarak hesaplanmı tir. Kültür sonrası MALDI TOF MS ve mikroarray yöntemleri ile en sık saptanan üç etken olan KNS, *S.aureus*, *E.faecium* türleri ele alınarak iki yöntem arasındaki uyum Cohen'nin kappa katsayısı ile sırasıyla 0,947 0,857 0,881 olarak hesaplanmı (tablo 12) ve sonuçlar arasında neredeyse mükemmel uyum olarak yorumlanmı tir. Kültür sonrası MALDI TOF MS ile Mikroarray yöntemleri arasında yapılan etken bazında tek tek karşılaştırılarda Mikroarray KNS'lerin %100'ünü, *S.aureus*'ların %80'ini, *E.faecium*'ların %100'ünü, *E.faecalis*'lerin %80'ini doğru tanımlamı tir. Kültür sonrası MALDI TOF MS ile *S.mitis* ve *S.sanguinis* olarak isimlendirilen iki örnek mikroarray veritabanında bu türler bulunmadığı için *Streptococcus spp.* olarak tanımlanmı tir. Kültür sonrası MALDI TOF MS ile *E.casseliflavus* olarak isimlendirilen bir örnek mikroarray veritabanında bu tür bulunmadığı için etken saptanamadı (Not detected) olarak sonuçlanmı tir (tablo 14).

Çalı maya alınan 40 örneğin ikisinde (%5) mikroarray yönteminde test geçersiz anlamına da gelen “No Call” hatası alınmı ve bu örnekler “tanımlama yapılamadı” olarak kabul edilmi tir (12 ve 36 numaralı örnekler). Mikroarray yöntemiyle tanımlanamayan 12 ve 36 numaralı örneklerin her ikisinden de kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *S.aureus* identifiye edilmi tir. 25 numaralı örnekte mikroarray yöntemiyle herhangi bir etken saptanamamı tir. Mikroarray yöntemiyle etken saptanamayan 25 numaralı örnek kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemiyle *E.casseliflavus* olarak identifiye edilmi tir. 35 numaralı örnekte de kültür sonrası MALDI TOF MS ile *E.faecalis* olarak tanımlanan etken mikroarray yöntemiyle KNS (*S.epidermidis*) olarak identifiye edilmi tir. 35 numaralı örnek de erlendirildi inde uyumsuz sonucun nedeni hastanın bir sonraki kan kültüründe ikili etkenin (*E.faecalis* ve KNS) izole edilmi olmasıyla açıklanabilir.

Mikroarray yöntemiyle 10 bakteride 10 adet direnç geni saptanmıştır (Tablo 15). Mikroarray ile çalışılan 37 kan kültürünün (iki No Call hatası, bir etken saptanamadı) 10'unda (%27) antibiyotik direnç geni belirlenmiştir. Saptanan direnç genlerinin dokuzu (%90- 10/9) mecA ve biri de (%10- 10/1) vanA'dır. Mikroarray ile direnç geni saptanmayan 27 örneğin 13'ünde (%48.1) Vitek 2 ile antibiyotiklere direnç saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 40 örneğin 24'ünde (%60) kültür sonrası Vitek 2 otomatize antibiyotik duyarlılık testi ile direnç profilleri belirlenmiştir. Bunların da çalışılan %62.5'i (15/24) mecA+ penisilinaz, %33.3'ü (8/24) penisilinaz ve %4.1'i (1/24) vanA eklenmiştir. mecA sonuçları ele alındığında, mikroarray ile saptanan 9 mecA geninin Vitek 2 sonuçları ile uyumu %88.8 (8/9) olarak bulunmuştur. mecA sonucu uyumsuz olarak saptanan 35 numaralı örnekte kültür sonrası MALDI-TOF MS ile *E.faecalis* tanımlanmıştır ve herhangi bir direnç bilgisi verilmemiştir, ancak yine aynı örnekte mikroarray testi ile KNS (*S.epidermidis*) izole edilmiştir ve mecA geni direnç bilgisi verilmiştir. Mikroarray ile mecA geni saptanmış 9 bakteriye karşı gelen Vitek2 ile yapılan otomatize duyarlılık testinde tüm örneklerde penisilin direnci ön bilgisi verilmiştir. Mikroarray ile vanA geni saptanan *E.faecium* tanımlanmış örnekte (20 numaralı örnek) otomatize duyarlılık testinde de vankomisin direnç bilgisi verilmiştir.

Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık testiyle 15 örnekte mecA+ penisilinaz saptanmıştır. Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık sonuçları ile mikroarray karşılaştırıldığında ikisinin birlikte uyumlu direnç sonucu verdiği örnek %53.3 (8/15) eklenmiştir. Mikroarray ile mecA saptanamayan yedi örneğe bakıldığında bu örneklerin mikroarray tarafından *Staphylococcus spp* olarak tanımlandığı ve bir tanesinin *S.epidermidis* (8 numaralı örnek) altı tanesinin (13,19,24,26,28,30 numaralı örnekler) veri tabanında bulunmayan KNS türleri *S.hominis* (n=2), *S.haemolyticus* (n=4) olduğu görülmüştür (tablo 16). Kültür sonrası Vitek 2 otomatize duyarlılık testiyle sekiz örnek için penisilin direnç bilgisi verilmiştir ancak bunların hiçbirini için mikroarray testinde ek direnç bilgisi verilmemiştir.

Mikroarray test yöntemi uygulanarak yapılan diğer çalışmaları literatürde yer almaktadır. Cellini ve arkadaşlarının (54) yaptığı çalışmada tek etken olduğu bilinen 92 gram pozitif üreme olan kan kültürü inisiye incelenmiştir. Örneklerin %88'i mikroarray ile doğru olarak tanımlanmıştır. Etken bazında tanımlamalar incelendiğinde tüm *S. aureus* ve enterokok izolatlarının mikroarray ile doğru olarak tanımlandığı, KNS'lerin %4'ünün (2/45) ise yanlış tanımlandığı görülmüştür. Siu ve arkadaşlarının (55) yaptığı çok merkezli bir araştırmada 114'ü gram pozitif ve 250'si gram negatif olmak üzere 364 kan kültürü inisiye incelenmiştir, gram pozitif örneklerde %89.6, gram negatif örneklerde %90.5 oranında uyumlu sonuç elde edilmiştir, enterokoklar (%60), hariç olduğu cins veya tür için duyarlılık en az %80, tüm etkenler için özgüllük %98.9-%100 aralığında bulunmuştur ve MRSA ve VRE tanımlanmasında duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır. Dodémont ve arkadaşlarının (56) yaptığı diğer bir araştırmada konvansiyonel yöntemlerle gram pozitif olduğu belirlenmiş 118 kan kültürü inisiye çalışılmıştır; örneklerin tanımlanmasındaki uyum %87.6, mecA geni saptamadaki uyum %97.7 olarak bulunmuştur. Yine bu çalışmada %5.1 oranında "No Call" sonucu alınmıştır ve altı örnek de etken saptanamadığı olarak sonuçlanmıştır. Etken saptanamayan bu örnekler Verigene BC-GP test veri tabanında bulunmayan bakteri türleri *E. casseliflavus* (n=2), *E. avium*, *Rothia mucilaginosa*, *R. dentocariosa* ve *Bacillus cereus*'dur.

Verigene System BC-GP® (Nanosphere, ABD) yaklaşık iki buçuk saat içerisinde sonuç verebilme, herhangi bir inisiyelem uygulamaksızın pozitif sinyal veren kan kültürü inisinden direkt olarak kolayca uygulanabilme, tedavide kritik direnç genlerini saptayarak klinisyene tedaviyi yönlendirebilecek bilgi verebilme, antibiyotik inhibitörlü inisilerle çalışabilme ve yüksek duyarlılık gibi avantajlara sahiptir. Mikroarray sisteminin dezavantajları; hasta bakımına maliyetinin yüksek olması (bir test ~350 TL), laboratuvarında ek alan ihtiyacı duyulması, mevcut veritabanının kısıtlı olmasıdır. Çalışmamızda altın standart olan kültürle mikroarray test yönteminin uyumu oldukça yüksek bulunmuştur (%90) ve elde edilen verilerden yola çıkarak, Verigene System BC-GP mikroarray sisteminin bakteriyemili hastalar için iki buçuk saat gibi kısa bir süre içerisinde yüksek doğrulukta bakteri identifikasyonu, metisilin ve vankomisin direnci hakkında ön bilgi sahibi olunmasını sağlamış yorumu yapılabilir.

Sonuç olarak, çalı mamızda etkinli i ara tırılan lizis filtrasyon ve mikroarray yöntemlerinin bakteriyemide hızlı sonuca ula abilme açısından yararlı oldu u dü ünülmü tür. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS tanımlamanın 15-20 dakika içerisinde çok daha geni veritabanında identifikasyon yapabilmesi, mikroarray testi ile benzer duyarlılık ve özgüllü e sahip olması, moleküler tabanlı testlere oranla çok daha dü ük maliyetli olması ve ek alana ihtiyaç duyulmaması gibi avantajları mevcuttur. Yöntemin henüz standart prosedürünün olmayı ı, uygulama zorlu u, inhibitörlü i eden sonuç verilememesi, kullanıcı deneyiminin sonuçları etkilemesi ve direnç bilgisi verememesi dezavantajları arasındadır. Mikroarray sisteminin pozitif sinyal saptanmı ihibitör içeren veya içermeyen kan kültürü i esinden iki buçuk saat içerisinde identifikasyon ve direnç geni bilgisi verebilmesi, kullanıcı hatalarını en aza indirmesi, çoklu etkeni tanıyabilmesi gibi avantajlarının yanında, saptayabildi i etken sayısının ve direnç geninin kısıtlı olması ve maliyet yüksekli i gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Çalı mamızın sonucunda, lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS tanımlama yönteminin maliyet etkinlik, hız, veritabanı geni li i, gram boyamaya gereksiniminin olmaması nedeniyle rutinde kütle spektrofotometrisi kullanabilen laboratuvarlar için rutin kullanıma girebilecek bir yöntem oldu unu dü ünülmü tür. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS tanımlama yöntemiyle, filtrasyon i lemi sonrasında filtreden yapılan süspansiyondan çalı ılacak otomatize duyarlılık test yöntemi kombine edilirse konvansiyonel yöntemlerle tanımlama ve duyarlılık için gerekli olan 48-72 saatlik süre yerine yaklaşık 9-10 saatte sonuç verebilmek mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1) Kaukonen K.M, Bailey M, Pilcher D, Cooper D.J, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2015; 372 (17): 1629-1638
- 2) Martinez Raquel M, Wolk Donna M. Bloodstream Infections. *Microbiology spectrum*. 2016; 4 (4)
- 3) Engel Christoph, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine*. 2007; 33 (4): 606-618
- 4) Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. 2011; *NCHS Data Brief* No. 62
- 5) Perman SM, Goyal M, Gaieski DF. Initial emergency department diagnosis and management of adult patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012 Jun 27; 20: 41
- 6) Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, Rivers K. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *CMAJ*. 2005; 173: 1054–65
- 7) Davies MG, Hagen PO. Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Br J Surg*. 1997; 84: 920–35
- 8) Wojewoda CM, Sercia L, Navas M ve ark. Evaluation of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants. *J Clin Microbiol*. 2013 Jul; 51 (7): 2072-6
- 9) Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol*. 2013 Mar; 51 (3): 805-9

- 10) Reinhart K, Bloos F, Brunkhorst. Pathophysiology of sepsis and MOF Chapter 146 p.1249 in Textbook of Critical Care 5th Ed. 2005
- 11) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger P, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. Chest 1992; 101: 1644–55
- 12) Dellinger R Phillip, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med. 2013 Feb; 41 (2): 580–637
- 13) Do anay M, Alp Me e E. Sepsis. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabı 3.baskı. stanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; Willke Topçu A, Söyletir G, Do anay M (editörler). 2008; 877–97
- 14) Karaali R, Tabak F. Sesis Patogenezi. Klinik Geli im Dergisi; 71-75
- 15) Bone RC. The patogenesis of sepsis. Ann Intern Med 1991; 115:457
- 16) Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; 420: 885- 91
- 17) Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct; 25 (4): 609-34
- 18) Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. Br Med J 2003; 326: 262–6
- 19) Tüfek A, Tekin R, Dal T ve ark. Reanimasyon ünitesinde on yıllık sürede geli en hastane enfeksiyonlarının de erlendirilmesi ve literatürün gözden geçirilmesi. Dicle Tıp Derg 2012; 39 (4): 492-498
- 20) Uzun O, Akalin HE, Hayran M, Unal S. Factors influencing prognosis in bacteremia due to gram negative organisms: evaluation of 448 episodes in a Turkish university hospital. Clin Infect Dis 1992; 15 (5): 866–73

- 21) Paiva José-Arthur, et al. Characteristics and risk factors for 28-day mortality of hospital acquired fungemias in ICUs: data from the EUROBACT study. Crit Care 2016 Mar 9; 20 (1): 53
- 22) Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. N Engl J Med 1999; 340: 207-14
- 23) Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann Intern Med 1990;113:227-42
- 24) Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. Virulence. 2014 Jan 1; 5 (1): 4-11
- 25) Çetin ÇB, Turgut H, Kaleli , Yalçın AN, Orhan N. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yo un Bakım Ünitesinde Nozokomiyal nfeksiyonlar. Hastane nfeksiyonları Dergisi 2002; 6: 98–101
- 26) Yosunkaya A, Tuncer S, Reisli R, Uzun S, Ökesli S. Reanimasyon Ünitimizde 1999-2000 Yılları Arasında Gözlenen Hastane nfeksiyonları. Hastane nfeksiyonları Dergisi 2002; 6: 92–7
- 27) Levy Mitchell M, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 31: 1250-6
- 28) Ranieri VM, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. JAMA 2012; 307: 2526-33
- 29) De Jonghe Bernard, et al. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. JAMA 2002; 288: 2859-67
- 30) Kan Kültürleri Uygulama Kılavuzu. Klimud/Ankara. Ed: Ba ustao lu A. 2013: 11-20
- 31) Sümerkan B. Nozokomiyal sepsis: etyoloji ve mikrobiyolojik tanısı. Hastane nfeksiyonları Dergisi 1998; 2: 182–7

- 32)** Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013 Jul; 26 (3): 547–603
- 33)** Samuel LP, Tibbetts RJ, Agotesku A, Fey M, Hensley R, Meier FA. Evaluation of a microarray-based assay for rapid identification of Gram-positive organisms and resistance markers in positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2013 Apr; 51 (4): 1188-92
- 34)** Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: new aspects and recent developments. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2014; 4(1): 1-25
- 35)** Peters RP, Van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004; 4: 751–760
- 36)** Witte, Wolfgang. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999; 44(1): 1-9
- 37)** Berger-Bächi, Brigitte. Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002; 292(1): 27-35
- 38)** Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA; *Medical Microbiology*. 5th ed, Philadelphia: Mosby ;2007
- 39)** Brooks GF, Carroll KC, Buttel JS, Morse SA: *Tıbbi Mikrobiyoloji kitabı* 26. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri; 2014
- 40)** Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001; 45(5): 1323-1336
- 41)** Colette G, Ghuysen JM. Multimodular penicillinbinding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62: 1079-1093

- 42) Reichmann P, Knig A, Linares J, Alcide F, Tenover FC, McDougal L, Swidsinski S, Hakenbeck R. A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *Journal Infect. Dis.* 1997; 176: 1001-1012
- 43) Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, Gardes C, Keck W, de Saizieu A. Mosaic genes and mosaic chromosomes: Intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2001; 69: 2477-2486
- 44) Rybkine T, Mainardi JL, Sougakoff W, Collatz E, Gutmann L. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J. Infect. Dis.* 1998; 178: 159-163
- 45) Casadewall B, Reynolds PE, Courvalin P. Regulation of expression of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 3436-3446
- 46) Showsh SA, De Boever EH, Clewell DB. Vancomycin resistance plasmid in *Enterococcus faecalis* that encodes sensitivity to a sex pheromone also produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 2177-2178
- 47) Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Res. Updates.* 1998; 1(2): 135-150
- 48) Sullivan KV, Turner NN, Roundtree SS, Young S, Brock-Haag CA, Lacey D, Doern CD. Rapid detection of gram-positive organisms using the Verigene gram-positive blood culture nucleic acid test and the BacT/ALERT pediatric FAN system in a multi-centered pediatric evaluation. *Journal of clinical microbiology.* 2013; JCM-01224
- 49) Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas* 1960; 20 (1): 37-46
- 50) Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977 Mar; 33 (1): 159-74

- 51)** Machen A, Drake T, Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PLoS One* 2014 Feb 14; 9 (2): e87870
- 52)** Farina Claudio, et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures using the lysis-filtration technique and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): a multicentre study. *New Microbiol.* 2015; 38(2): 245-250
- 53)** Scola BL, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PloS one.* 2009; 4(11): e8041
- 54)** Cellini A, Pedna MF, Del Bianco F, Sambri V. Evaluation of the Verigene® Blood Culture Nucleic Acid test for rapid identification of gram positive pathogens from positive blood cultures. *Microbiologia Medica.* 2015; 30(1)
- 55)** Siu, Gilman KH, et al. Performance Evaluation of the Verigene Gram-Positive and Gram-Negative Blood Culture Test for Direct Identification of Bacteria and Their Resistance Determinants from Positive Blood Cultures in Hong Kong. *PloS one.* 2015; 10(10): e0139728
- 56)** Dodemont M, De Mendonça R, Nonhoff C, Roisin S, Denis O. Evaluation of Verigene Gram-positive blood culture assay performance for bacteremic patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2015; 34(3): 473-477.