

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ATEŞİ YÜKSEK OLAN HASTALARDA
KANDA BAKTERİ VARLIĞININ
ÜNİVERSAL PRİMERLER KULLANILARAK
HIZLI SAPTANMASI

Dr. Havva Özlem ALTAY

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA
2014

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ATEŞİ YÜKSEK OLAN HASTALARDA
KANDA BAKTERİ VARLIĞININ
ÜNİVERSAL PRİMERLER KULLANILARAK
HIZLI SAPTANMASI

Dr. Havva Özlem ALTAY

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Cumhur ÖZKUYUMCU

ANKARA
2014

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması ve ilerlemesinde destek ve katkılarından ötürü tez danışmanı hocam Prof. Dr. Cumhuri ÖZKUYUMCU'ya teşekkür ederim.

Tezin yapılması sürecinde büyük yardımı ve desteği olan Prof. Dr. Ahmet PINAR'a teşekkür ederim.

Prof. Dr. Sevtap ARIKAN AKDAĞLI ve Doç. Dr. Alpaslan ALP'e yardım ve yorumlarından dolayı teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimimde emeği geçen tüm saygıdeğer hocalarıma ve bölüm personeline teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığım tüm asistanlara candan arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Hayatımın her anında sevgilerini ve desteklerini hep hissettiren annem Sabriye ALTAY, babam Alim ALTAY ve canım kardeşim Betül ALTAY'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Daima yanımda olan, eşim Berkay AKIŞOĞLU'na desteği, anlayışı ve sevgisi için tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

Bakteriyemi ve sepsis hayatı tehdit eden koşullardır ve hızlı tanı gereklidir. Uygunsuz antibiyotik tedavisi, yüksek mortalite oranları ile ilişkili olmanın yanı sıra, antibiyotik direnci ve uzun süre hastanede yatışa bağlı ekonomik kayba neden olmaktadır. Kandaki mikroorganizmaların saptanmasında, günümüzde altın standart tanı yöntemi kan kültürüdür. Pozitif sinyal elde edilmesi için gereken süre yaklaşık 12-48 saattir. Bu süreye altkültür ve tanımlama için geçen zaman da eklendiğinde ortalama 48-72 saat sonra sonuç verilebilmekte bu nedenle hasta ampirik tedavi almak zorunda kalmaktadır. Kültür amacıyla gönderilen örneklerde pozitiflik oranı %10-15 civarındadır. Bu nedenle hastaların büyük bir kısmına ampirik tedavi uygulanması, gereksiz antibiyotik kullanımı ve buna bağlı direncin en önemli nedenlerinden birini oluşturmaktadır. 16S rRNA geninin korunmuş bölgelerini hedef alan universal primerler ile Real-time PCR birçok çalışmada kullanılan moleküler ve modern bir yaklaşımdır. Bu çalışmada ilk aşama olarak, kandan en sık izole edilen 13 bakterinin universal primerler ve Gram ayırıcı floresan probalar ile duyarlılık sınırları saptanmıştır. İkinci aşamada, yoğun bakımda yatmakta olan hastalardan kan kültürü ile eş zamanlı alınan kan örneğinde bakteri varlığı ve Gram özellikleri universal primerler ve Gram ayırıcı floresan probalar ile kullanılarak multipleks Real-time PCR ile saptanmıştır.(Duyarlılık %100, özgüllük % 97) Kan örneğinin laboratuvara ulaşmasından itibaren 2 saat içinde örnekte bakterinin varlığı/yokluğu ve varsa Gram özelliği ile ilgili sonuç elde edilmiştir. Kanda mikroorganizma varlığının erken ve doğru tespiti yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların optimal yönetimi için gereklidir. Çalışmada kullanılan yöntemle pozitiflik saptanan hastalarda ileri moleküler tanımlama yöntemlerinin kombine kullanımı, saatler içinde klinisyenin hedefe yönelik antimikrobiyal seçimini kolaylaştıracak ve gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesini sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Multipleks Real time PCR, yoğun bakım ünitesi, bakteriyemi, universal primer

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimtarafından desteklenmiştir. (Proje No: 013 D01 101 002)

ABSTRACT

Bacteremia and sepsis are lifethreatening conditions and early pathogen detection is crucial to decrease mortality and inappropriate antibiotic therapy. Latter not only promotes the emergence of drug-resistant bacteria but also leads to longer hospital length of stay with a high economic burden.

Currently, gold standard for detecting microorganisms in blood is blood culture. Getting a positive signal takes approximately 12 to 48 hours. If we add the duration of subculture and identification of bacteria, it would take approximately 48 -72 hours in total. Long hours of waiting for results necessitates starting an empirical therapy. Positivity rate of samples sending for culture is approximately 10-15%. Empirical therapy for the majority of cases is one of the most important causes of unnecessary antibiotic use and resulting antibiotic resistance. Real time PCR with universal primers targeting the protected regions of 16S rRNA is a molecular and modern approach used in several studies. As a first step in this study, sensitivity for 13 most commonly isolated bacteria is detected with universal primers and fluorescent probes. In second step, presence and Gram features of bacteria in blood samples taken simultaneously with blood culture from ICU patients were investigated with multiplex real time PCR using universal primers and fluorescent probes. (Sensitivity 100%, specificity 97%) 1-2 hours from reaching of blood sample to lab, test resulted about the presence/absence and Gram feature of bacteria. Early and accurate identification of microorganisms in blood is necessary for optimal management of patients in ICU. Combined use of advanced molecular diagnostic tests facilitates the choice of targeted antimicrobial agent, and avoids from unnecessary antibiotic use.

Keywords: multiplex Real Time PCR, intensive care unit, bacteremia, universal primer

Supported by Hacettepe University Scientific Research Unit (Project No: 013 D01 101 002)

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
TABLolar	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1 Tanımlar	3
2.2 Epidemiyoloji	5
2.3 En fazla görülen mikroorganizmalar	5
2.4 KAN KÜLTÜRLERİ	6
2.4.1 Kan kültürü prosedürleri.....	8
2.4.2 Kan kültürünün avantajları	8
2.4.3 Kan Kültürünü Olumsuz Etkileyen Faktörler	9
2.4.4 Kan Kültüründe kantitasyon	10
2. 5 KAN DOLAŞIMI ENFEKSİYONLARINDA UYGULANAN NÜKLEİK ASİT TEMELLİ TEŞHİS TEKNOLOJİLERİ.....	11
2.5.1 PCR ve Real-time PCR.....	12
2.5.2 Üniversal primerler	14
2.5.3 Kan Kültürleri ya da Klinik Örneklerden Nükleik Asitlerin Saflaştırılması	14
2.5.4 Pozitif kan kültürlerinden patojenlerin tanımlanması için nükleik asit tabanlı yöntemler	16
2.5.5 Örneklerden doğrudan patojenlerin tespit ve tanımlanması için nükleik asit tabanlı yöntemler.....	16
2.5.6 Bakteriyel yük tespiti	16
2.5.7 Nükleik asit tabanlı tekniklerin başlıca yetersizlikleri.....	17
GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1 Referans suşlar	20

3.2 Bakteri dilüsyonlarının hazırlanması.....	20
3.3 Hasta ve gönüllülerden alınan kan örnekleri	20
3.4 Gönüllülerden alınan kanlara bakteri dilüsyonlarının katılması	21
3.5 Yoğun bakımda yatan hastaların taraması.....	21
3.6 Örneklerden Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması	22
3.7 Bakteriyel universal primerler ve FRET prob dizaynları	23
3.8 Real-time PCR.....	23
BULGULAR.....	26
TARTIŞMA	40
SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

μl :mikrolitre

ml :mililitre

MHA :Mueller Hinton Agar

PCR :Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir tepkimesi)

ATCC : American Type Culture Collection

FDA : Food and Drug Administration

RNA : Ribonükleik asit

YBÜ : Yoğun Bakım Ünitesi

SF : Serum fizyolojik

CFU : Koloni oluşturan ünite

ŞEKİLLER

Şekil 4.1 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. pyogenes* ATCC 19615 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.2 Gönüllülerden alınan kana katılmış *E. faecium* ATCC 19434 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.3 Gönüllülerden alınan kana katılmış *E. faecalis* ATCC 19433 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.4 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. pneumoniae* ATCC 49619 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.5 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. aureus* ATCC 29213 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.6 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. epidermidis* ATCC 12228 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.7 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. agalactiae* ATCC 13813 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.8 Gönüllülerden alınan kana katılmış *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.9 Gönüllülerden alınan kana katılmış *E. coli* ATCC 25922 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.10 Gönüllülerden alınan kana katılmış *K. pneumoniae* ATCC 33495 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.11 Gönüllülerden alınan kana katılmış *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.12 Gönüllülerden alınan kana katılmış *A. baumannii* ATCC19606 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.13 Gönüllülerden alınan kana katılmış *P. mirabilis* ATCC 43071 suşunun 104, 103, 10², 10¹ ve 10⁰ dilüsyonlarının multipleks Real-time PCR ile saptanması

Şekil 4.14 1-18. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi

Şekil 4.15 19-42. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi

Şekil 4.16 43-65. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi

Şekil 4.17 66-88. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi.

Şekil 4.18 89-112. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi

Şekil 4.20 136-160. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi

Şekil 4.20 136-160. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi

Şekil 4.21 161-183. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi.

Şekil 4.22 184-202. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi.



TABLÖLAR

Tablo 2. 1 SENTRY (1997-2000) verilerine göre Kuzey Amerika ve Avrupa’da en sık görülen 10 bakteri

Tablo 4. 1 Gönüllülerden alınan kana katılmış ATCC suşlarının saptama duyarlılıkları

Tablo 4. 2 93 farklı hastanın en düşük ve en yüksek verilerini de içeren yaş ve ateş ortalamaları

Tablo 4. 3 Hastalardan alınan 202 kan kültürü örneğinde üreme sonuçları

Tablo 4. 4 Hastalardan alınan 202 kan kültürü örneğinde cins veya tür düzeyinde üreme sonuçları

Tablo 4. 5 Hastalardan alınan kan örneklerinde Real-time PCR sonuçları

Tablo 4. 6 Hastalardan alınan kan kültürü örneklerinde bakteri üreme sonuçları ve kan örneklerinde Real-time PCR sonuçları karşılaştırılmalı sonuçları

1. GİRİŞ

Bakteriyemi ve sepsis hayatı tehdit eden koşullardır. Uygunsuz antibiyotik tedavisi yüksek mortalite oranları ile ilişkili olduğundan hızlı tanı çok önemlidir. (1)

Kanda mikroorganizma varlığı, altın standart tanı yöntemi olan kan kültürü ile saptanır. Günümüzde, geleneksel kan kültürü yöntemleri yerini büyük ölçüde otomatize sistemlere bırakmış durumdadır. Kan kültürü şişeleri özel besiyeri içeren ortamlardır. Üreyen bakterinin varlığı, çoğalma sonucu açığa çıkan CO₂ miktarının sürekli ölçümü ile saptanır. Pozitif sinyal elde edildiğinde hemen Gram boyama yapılır ve ardından manuel veya otomatize sistemlerde üretilerek ve uygun biyokimyasal testler yapılarak bakteri tanımlanır. Pozitif sinyal elde edilmesi için gereken süre yaklaşık 12-48 saat olup ardından yapılan altkültür ve tanımlama için ortalama 48-72 saat gerekmektedir. (2) Kültür amacıyla gönderilen örneklerde pozitiflik % 10-15 civarında olduğu ve bu dönemde hastaların ampirik tedavi aldığı düşünülürse, hastaların büyük bir kısmına ampirik tedavi uygulanması, gereksiz antibiyotik kullanımı ve buna bağlı direncin en önemli nedenlerinden birini oluşturmaktadır. (3)

Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi nükleik asit amplifikasyon testleri uygulaması kolay, yüksek duyarlılıklı, hızlı ve enfeksiyon hastalıkları tanısında kullanımı giderek yaygınlaşan testlerdir. (4) Ünlversal primerler 16S rRNA geninin korunmuş bölgelerini hedef alır. (5) Uygun primer ve problemler kullanılarak yapılan Real-time PCR sayesinde kan örneğinin laboratuvara ulaşmasından itibaren 2 - 4 saat içinde örnekte bakterinin varlığı/yokluğu ve varsa Gram özelliği klinisyene bildirilebilir.

Bu çalışmada ilk aşama olarak, kandan en sık izole edilen 13 bakterinin, literatürde en fazla kullanılan ünlversal primerler ile saptama sınırları belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise yoğun bakımda yatmakta olan hastalardan kan kültürü ile eş zamanlı alınan kan örneğinde bakteri varlığı ve Gram özellikleri ünlversal primerler kullanılarak multipleks Real-time PCR ile saptanmıştır. Sadece pozitiflik saptanan hastaların güncel moleküler bakteri tanımlama yöntemleri ile

kontrol edilmesinin, hasta yönetiminin daha maliyet-etkin olmasını sağlayacağı düşüncesiyle çalışma planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanın mikroorganizmalarla invazyonu ile karakterize olan kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE), tüm dünyada ölümlerin önemli bir nedenidir. KDE’de çoğunlukla travma sonrası, damar içi cihazlardan veya birincil odakta oluşan enfeksiyonlardan kaynaklanan patojenler vücuda dağılmaktadır. (6)

İnsan vücudunun çeşitli bölgelerinde bulunan, insana zarar vermeyen, hatta bazı yararlar sağlayan mikroorganizma toplulukları normal flora olarak tanımlanır. Normal flora, patojen mikroorganizmalara karşı korunmada ve bağışıklık sisteminin uyarılmasında görev alır. Bununla birlikte, bağışıklık sisteminin baskılanması durumunda veya yukarıda sayılan nedenlerden ötürü normal flora üyeleri kan gibi steril vücut sıvılarında bulunduğu zaman patojen olabilir. Bu fırsatçı patojenlerin yanı sıra normal floraya ait olmayan kesin patojenler de enfeksiyon hastalığına neden olabilir.

Enfeksiyon hastalıklarıyla ilişkili klinik, genellikle ateş, iştah kaybı, yorgunluk ve kas ağrıları gibi genel belirtileri içerir. Belirtiler çoğunlukla hastalık veya mikroorganizma özgül değildir. Bu nedenle, çeşitli vücut örneklerinde etkenin tespiti ve tanımlanması için laboratuvar testleri kullanılır. (7)

Sistemik bakteriyel enfeksiyonların hızlı tespiti, hasta tedavisinin doğru yönetimi ve doğru antimikrobiyal uygulanabilmesi için kritik öneme sahiptir. (8) KDE özellikle nakil sonrasında, nütropenik hastalarda ve yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatan hastalarda yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. (9) Yetersiz ampirik antimikrobiyal tedavi uygulamasının yüksek mortalite oranlarının yanısıra daha uzun süre hastanede yatış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (10, 11)

Sağ kalım, tedavi başlama zamanından ve başlanan antimikrobiyal tedavinin uygunluğundan oldukça etkilenir. (12) Uygunsuz antibiyotik tedavisi direncin ortaya çıkışı ile ilişkili olduğundan, etken mikroorganizmanın direnç profilinin hızlı saptanması tüm toplumun koruyucu tıbbi ile ilişkilendirilebilir. (13)

KDE morbidite ve mortalitesinde en önemli neden, vakaların % 30-40'ında ağır sepsis ve septik şok tablolarının meydana geliyor olmasıdır. (14) Avrupa'da her yıl yaklaşık 135.000 hastanın sepsis ilişkili komplikasyonlarla öldüğü tahmin edilmektedir. (15) Sepsisin erken tanısı ve uygun antimikrobiyal tedavinin erken sağlanması ağır sepsis ve septik şok gelişiminin azaltılması için kritik faktörlerdir. (16) Uygunsuz veya yetersiz ampirik antimikrobiyal verilmesinin sepsisli hastalarda sonucun en önemli bağımsız belirleyicisi olduğu bildirildiğinden, kan dolaşımı enfeksiyonlarının hızlı teşhisi ve idaresi başarılı bir tedavi için çok önemlidir. (17) Öte yandan, mevcut yöntemlerle hastaların sadece % 50-70'inde etken mikroorganizma tanımlanabilmektedir. (18)

İlaça dirençli mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonların yükselen sıklığı nedeniyle antibiyotik seçimi komplike hale gelmiştir. Güncel yayınlar etken mikroorganizma türü ve ilaç duyarlılık profilinin hızla belirlenmesinin önemini vurgulamaktadır. (19) Mikroorganizmaların çoğu için antibiyotik direnç profillerinin periyodik incelemesi ile tahmin edilebilir yerel antibiyotik direnç kalıpları varken, anlamlı bir kısmında türe özgü antibiyotik endikasyonu vardır. (20) Sonuç olarak, tür tanımlaması neticesinde elde edilen veriler, antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlanmasını beklerken antibiyotik tedavisini yönlendirmek için kullanılabilir. Mikroorganizma türünü hızlı tanımlayan bir yöntem, ciddi hastalıkların erken teşhisinde faydalı olacak, bu şekilde zamanında ve kesin tedavi sağlamakla beraber geniş spektrumlu antibiyotik kullanımını önemli ölçüde azaltarak, hasta yönetiminin yanısıra enfeksiyon kontrolünde de faydalı olacaktır.

Tanı laboratuvarları patojenlerin tanımlanması için gereken süreyi azaltmak için yoğun çabalar harcamaktadır. Ne yazık ki, geleneksel mikrobiyolojik tanımlama ve ilaç duyarlılık tespiti yöntemleri, hızlı tedavi kararlarını yönlendirmek için genellikle çok zaman alıcıdır.

2.1 Tanımlar

Bakteriyemi olarak belirtilen kanda bakterilerin varlığı, 1897'de Libman tarafından, streptokok hastalığının seyrinde kanlı ishal olan iki çocukta tanımlanmıştır. (21) Dokuz yıl sonra, kan materyalinin nasıl işleneceğini de içeren 700 kan kültüründen oluşan bir dizi yayınlamıştır. (22)

Kanda diğer patojenlerin varlığı da benzer şekilde viremi, fungemi, parazitemi olarak adlandırılır. Septisemi, bakteriyemi ile hemen hemen aynı anlamda ve zaman zaman birbirinin yerine kullanılan bir terim olmakla beraber, verilerin yorumlanmasında karışıklığa neden olduğu için American College of Chest Physicians (ACCP) ve Society of Critical Care Medicine (SCCM) tarafından 1991 yılında yapılan ortak bir toplantıda kabul edilen tanımlar arasından çıkarılmıştır. (23) Bakteriyemilerde kanda bakterilerin varlığının gösterilmesi gerekli olsa da üçte birinde organizma kaynağı belirlenemeyebilir. Bakteriyemileri üçe ayırmak mümkündür:

- 1) Geçici Bakteriyemi: Sıklıkla normal floranın bir parçası olan organizmaların membranlara minimal travma neticesinde kana karışması ile oluşur (diş fırçalama, medikal işlemler vb.)
- 2) Aralıklı Bakteriyemi: Ampiyem, peritonit veya septik artrit gibi vücut boşluklarının enfeksiyonları veya ekstrasvasküler abselerden bakterilerin vücuda periyodik olarak yayılması ile oluşur.
- 3) Sürekli Bakteriyemi: Genellikle enfekte endotel (bakteriyel endokardit, anevrizma vb.) veya enfekte donanım (arteriovenöz fistüller vb.) gibi intravasküler enfeksiyon varlığında oluşur. (24)

Bakteriyemi kanda bakteri varlığıdır ancak enfeksiyon bölgesi veya kaynağına dair önemli bir klinik bir açıklama içermemektedir. (25) ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) rehberleri bakteriyemi yerine ‘kan dolaşımı enfeksiyonu’ terimini tercih eder, çünkü kan dolaşımı enfeksiyonu terimi klinik ve mikrobiyolojik kriterlere dayalı bir tanı gerekliliğini ortaya koymaktadır. (26)

Geleneksel olarak, kan dolaşımı enfeksiyonları iki kategoriye ayrılabilir:

- 1) Primer kan dolaşımı enfeksiyonları: Tanımlanabilir bir enfeksiyon odağı olmayan hastalarda kaynağı bilinmeyen kan dolaşımı enfeksiyonları ve intravasküler kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarını tanımlar.
- 2) Sekonder kan dolaşımı enfeksiyonları: Başka bir bölgede enfeksiyonla ilişkili mikroorganizmanın neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarını tanımlar. (27)

Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) adı verilen sistemik enflamatuvar bağışıklık tepkisi, kan dolaşımında patojen bakteri varlığında ortaya çıkarak vücutta ciddi hasara neden olabilir. Nedeni ne olursa olsun, doğal immün yanıtın sistemik aktivasyonundan kaynaklanan kompleks bulgular için kullanılmaktadır. (28) Aşağıdaki klinik semptomlardan en az iki tanesi mevcut olduğunda SIRS olduğu kabul edilir:

- Vücut ısısının 38°C'den yüksek veya 36°C'den düşük olması (ateş veya hipotermi)
- Kalp atım hızının 90 atım/dakika'nın üzerinde olması (taşikardi)
- Solunum sayısının 20 solunum/dakika'nın üzerinde olması (taşipne) veya PaCO₂'nin 32 mmHg'nın altında (PaCO₂<4.3 kPa) olması
- Lökosit sayısının 12.000/mm³'ün üstünde (lökositoz) veya 4.000/mm³'ün altında (lökopeni) veya periferik dolaşımda immatür nötrofillerin oranının %10'dan çok (sola kayma) olması. (28)

Kan dolaşımı enfeksiyonlarının en tehlikeli klinik tablosu sepsis ve septik şoktur. Kanıtlanmış enfeksiyon ile birlikte SIRS tanısı sepsis olarak adlandırılır. Ağır sepsis, sepsise organ disfonksiyonu, hipoperfüzyon veya hipotansiyon eşlik etmesi olarak tanımlanır. Septik şok ise, yeterli sıvı tedavisine rağmen hipotansiyon görülen ciddi sepsistir ve ölümden önce son aşamadır.

2.2 Epidemiyoloji

Kan dolaşımı enfeksiyonlarının gerçek insidansı bilinmemekle birlikte Amerika Birleşik Devletleri'nde, her yıl yaklaşık 750,000 hastada, %20-70 arasında değişen bir mortalite oranı ile birlikte KDE geliştiği tahmin edilmektedir. (29, 30) ABD'de tüm ölümlerin 10. sıradaki nedenidir, (tüm nüfusun her 100 000 bireyinde 50.37 ölüm). (31) Bazı çalışmalar, KDE insidansının yoğun bakım ünitesinde %1 (32) ve kemik iliği transplantasyon alıcılarında % 36 civarında olduğunu bildirmiştir. (33) Kaba ölüm hızının YBÜ hastalarında % 80 civarında olduğu rapor edilmiş ve bu popülasyonda kan dolaşımı enfeksiyonları ile doğrudan ilişkilendirilen ölüm oranı %16-40 olarak tahmin edilmiştir. (34)

2.3 En Sık Görülen Mikroorganizmalar

Hem klinik belirtilerin tanınması hem de etkenin tespiti KDE'nin akut döneminde son derece önemlidir. Bu sayede zamanında ve yeterli tedavi ile hastalarda ağır sepsis veya septik şok gelişimini önleme fırsatı olacaktır. (35) ABD hastanelerinde yapılan bir ülke sürveyans çalışmasında (Sürveyans ve Epidemiyolojik Öneme Sahip Patojenlerin Kontrolü, SCOPE) hastane KDE'den sorumlu patojenler arasında, Gram-pozitif bakteriler % 65 ve Gram-negatif bakteriler % 25 sıklıkta bulunmuştur. (36) Koagülaz-negatif Stafilocoklar (KNS), *S. aureus* ve Enterokoklar en sık izole edilen diğer etkenlerdir. (37)

SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programı (1997-2000) verilerine göre ABD'de 2000 yılında bildirilen sepsis vakalarındaki tüm izolatların %89-92'sinin sebebi 10 bakteriyel türdür. Mikroorganizmaların sıralamaları Kuzey Amerika ve Avrupa genelinde benzer bulunmuştur. (38) Tablo 1.1'de SENTRY (1997-2000) verilerine göre Kuzey Amerika ve Avrupa'da en sık görülen 10 mikroorganizma gösterilmiştir.

Tablo 1. 1 SENTRY (1997-2000) verilerine göre Kuzey Amerika ve Avrupa'da en sık görülen 10 mikroorganizma

	KUZEY AMERİKA	(%)	AVRUPA	(%)
1	<i>S. aureus</i>	26,0	<i>E. coli</i>	22,4
2	<i>E. coli</i>	17,7	<i>S. aureus</i>	19,5
3	Koagülaz Negatif Stafilocoklar	11,5	Koagülaz Negatif Stafilocoklar	14,6
4	<i>Enterococcus</i> spp.	10,2	<i>Klebsiella</i> spp.	7,3
5	<i>Klebsiella</i> spp.	7,6	<i>Enterococcus</i> spp.	7,2
6	B veya viridans grubu streptokoklar	5,1	<i>P. aeruginosa</i>	6,1
7	<i>S. pneumoniae</i>	4,4	<i>Enterobacter</i> spp.	4,2
8	<i>P. aeruginosa</i>	4,3	B veya viridans grubu streptokoklar	3,5
9	<i>Enterobacter</i> spp.	3,7	<i>S. pneumoniae</i>	2,9
10	<i>Serratia</i> spp.	1,6	<i>Acinetobacter</i> spp.	2,5
	Toplam	92,1	Toplam	90,2

2.4 Kan Kùltürleri

Kan dolaşımı enfeksiyonu tanısında mevcut altın standart olan kan kùltürü testi kandaki canlı mikroorganizmaların tespitine dayanmaktadır. Kan kùltürlerinin işlenmesi ve değeriendirilmesi klinik mikrobiyoloji laboratuvarında merkezi bir role sahiptir. (39) Kan kùltürlerinden organizmaların izolasyonu, genellikle acil antibiyotik tedavisi gerektiren ciddi bir enfeksiyon göstergesidir. Geçmişten günümüze kan kùltürü işlemleri için en uygun şartları oluşturmak ve yöntemin duyarlılığını etkileyen faktörleri tanımlamak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. (40) Güncel rehberler bakteriyemi veya fungemi şüphesi olan hastaların kan kùltürleri için genel ilkeleri ve prosedürleri sağlamaktadır. (41)

Geleneksel teknikler, kanın zenginleştirilmiş sıvı besiyeri (triptik soy broth ve peptonlar) ve reçine içeren özel şişelerde inkübasyonundan sonra patojenin izole edilmesi, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasına dayanmaktadır.

2.4.1 Kan kùltürü prosedürleri

Aerobik kan kùltürü şişesi içeriğinde, zenginleştirilmiş triptik soy broth ve çeşitli antibiyotikleri (örn, β -laktam antibiyotikler, gentamisin, ve vankomisin) ortamdaki uzaklaştıran reçineler bulunmaktadır. Kan kùltürü cihazında inkübe edilen mikroorganizmalar kùltür ortamındaki besinleri kullandıkça ortamdaki karbondioksit miktarı artmaktadır. Bu artış sensördeki floresan tarafından emilen ışık miktarının azalmasına neden olmakta ve cihaz görsel ve sesli olarak pozitif sinyal vermektedir. (42)

Otomatik kan kùltür sistemlerinde pozitif bir sonuç sinyali, kan kùltürü şişesinde mikrobiyal üreme olduğunu gösterir. Sonrasında mikroorganizmanın Gram özelliği ve morfolojisi Gram boyama yapılarak tespit edilebilir ancak organizmaların kesin tanımlanması için çeşitli agar plaklarına alt kùltürleri yapılarak saf koloni elde edilmeli ve bundan sonra metabolik özelliklerini tanımlayan biyokimyasal testler ya da Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometre (MALDI-TOF) analizleri yapılmalıdır. Son aşamada, elde edilen saf koloni antibiyotik duyarlılık değeriendirilmesi için kullanılabilir.

Yukarıda bahsedilen geleneksel mikrobiyolojik tekniklerle, mikroorganizmanın tespit edilmesi için genellikle 6-18 saat, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık paterninin belirlenmesi için ek olarak 24-48 saat gereklidir. Bu süre bazı mikroorganizmalar için daha uzundur. Hekim tarafından inkübasyon süresinin uzun olduğu bilinen mikroorganizma varlığı şüphesi olan olgularda bu süre 14-21 güne dek uzatılabilir. (43)

2.4.2 Kan kültürünün avantajları

Etken patojenin doğru tanımlanması ve mikroorganizmaların antimikrobiyal profilinin belirlenmesi KDE'nin yönetiminde gereklidir çünkü her iki parametre antibiyotik tedavisine rehberlik için büyük önem taşımaktadır. Organizmaların antimikrobiyal duyarlılıkları farklıdır ve başarılı tedavi doğru ilaçların uygun zamanda verilmesine bağlıdır. Burada bahsedilen iki özellik, mevcut altın standardın değeri olarak görülebilir çünkü şimdiye kadar geliştirilmiş başka hiçbir teknik bu teşhis parametrelerinin her ikisini birden sunamaz. (44)

Kan kültürü sonuçları, ampirik tedavi stratejisini oluşturmak için bir temel görev üstlenmesi açısından önemli bir epidemiyolojik araçtır. O güne kadar ve o zamandaki kan dolaşımı enfeksiyonlarında tanımlanmış en yaygın patojenlerle ilgili bilgiler yoğun bakım, onkoloji ve hematoloji gibi enfeksiyonun sık görüldüğü bölümlerde bilinmeyen ateşli bir hastanın ampirik tedavisinde klinisyene yol gösterecektir.

2.4.3 Kan kültürünü olumsuz etkileyen faktörler

Prognostik açıdan bakıldığında pozitif kan kültürü sonuçları enfeksiyona karşı konağın savunma mekanizmalarının yetmezliğinin önemli bir kanıtı ya da birincil enfeksiyon bölgesinin tedavisindeki yetersizliğin göstergesidir. (45) Sepsis tanı ve tedavisinde kan kültürlerinin önemi göz önüne alındığında, bu teknolojinin klinik ve teknik gereksinimleri ve sınırlamalarını anlamak için konuya önem verilmelidir.

Üremenin otomatik saptanması ya da kültür ortamının zenginleştirilmesi gibi çeşitli teknik unsurların sürekli iyileştirilmesi sayesinde kan kültürü işleminin tanısal performansında önemli gelişmeler sağlanmıştır. Buna rağmen klinik mikrobiyoloji

laboratuvarında geleneksel kültür tabanlı yöntemlerin tıbbi değerini sınırlayan çeşitli faktörler vardır:

Örnek hacmi (46), örnek alımından inkübasyona kadar olan zaman (47), üremenin zaman alıcı olması, yavaş veya zor üreyen mikroorganizmaların varlığı ve örnek alınmadan önce antimikrobiyal tedavinin başlamış olması (48) yalancı-negatif sonuçlara yol açarak kültürlerin hassasiyetini azaltabilirken (49), kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitifliklerin oluşması nedeniyle de kültürlerinin özgüllüğü sekteye uğramaktadır. (50)

KDE teşhisinin iyileştirilmesi için çok sayıda girişim yapılmıştır ve geliştirilmeye ve değerlendirilmeye devam etmektedir. (51) Buna rağmen, şimdiye kadar kan kültürü temelli yaklaşımı tamamen değiştirme yeteneğine sahip alternatif bir tanı aracı yoktur.

2.4.3.1 Kan hacmi

KDE tanısı için kan kültürünün saptama yeteneği, kullanılan kan hacmi ve toplanan numunelerin sayısı ile ilgilidir. Farklı çalışmalar kan kültürü şişelerine erişkinlerden en az 20-30 ml kan inokülasyonunu destekler, çünkü KDE’de mikroorganizma yükü çok düşük olabilir. (52) Erişkin hastalar için ayrı venlerden en az 2 set şişeye alınmış 24-30 ml kan kullanılır.

Küçük çocuklarda kan dolaşımı enfeksiyonlarının erişkinlere göre çok daha büyük bir mikroorganizma yüküne sahip olduğu tahmin edilmektedir. (53) Daha önce bebeklerde ve çocuklarda kan kültürleri için uzman önerileri yenidoğanlarda 1-2 ml, bebekler için 2-3 ml, büyük çocuklar için 3-5 ml ve ergenler için 10-20 ml toplanması şeklindeydi. (54) Bununla birlikte, yeni öneriler, pediatrik kan kültürlerinin hacminde, çocuğun vücut ağırlığı ve tahmini toplam kan hacminin esas olması gerektiğini göstermektedir ve yenidoğanlar, bebekler ve küçük çocuklar için toplam kan hacminin % 1'den fazlasının alınmaması önerilir. (55)

Bir kan kültürü setindeki pozitif sonuç KDE tahmin etmek için yeterli değildir. Bir kan kültürü yapıldığı takdirde verim % 65, birbirini takip eden iki kan kültürünün verim % 80,4 ve üçüncü gerçekleştirilirse %95,7 verime ulaşılır. (56)

2.4.3.2. Kesin tanımlama için gereken süre

Bir enfeksiyonun etiyolojisinin doğrulanması, patojenin tanımlanması ve antimikrobiyal direnç profilinin belirlenmesi için en az 24-72 saat gerekli olduğu için mevcut kültür temelli yöntemler kliniklerin isteklerini yerine getirememektedir. (57) Sepsis vakalarının çoğunda kan kültürü negatiftir, bu nedenle uygulanan antimikrobiyal tedavi ampiriktir. (58) Kan kültürleri ile sonuçların elde edilebilmesinde gecikme olması nedeniyle ampirik antibiyotik tedavisindeki değişiklikler kültür sonuçlarından ziyade hastanın klinik yanıtına göre yapılmaktadır. (59)

2.4.3.3 Güç üreyen patojenler

Yavaş veya güç üreyen organizmalar için kan kültürlerinin duyarlılığı genellikle oldukça kötüdür. Whipple hastalığı (*Tropheryma whipplei*), kedi tırmığı hastalığı (*Bartonella* spp.), Q-ateşi (*Coxiella burnetii*) ve riketsiyoz (*Rickettsia* spp.) gibi sistemik hastalıklara neden olan patojenler bu duruma örnektir. (60) Bu mikroorganizmaların çoğu kan kültürü negatif enfektif endokarditin olası etkenleridir. (61) Bu yavaş veya güç üreyen patojenlerin varlığı tanımlama sürecinde ciddi bir gecikmeye neden olarak uzun süreli ve yetersiz ampirik antimikrobiyal tedaviye yol açabilir. Buna ek olarak, bazı invazif enfeksiyonların kültürle tanısı düşük duyarlılığa sahiptir ve çoğu zaman sonuçlar uzun bir süre boyunca elde edilemez. Bu enfeksiyonlar nötropenik hastalarda sıklıkla meydana geldiği için, tedavi edilmemiş enfeksiyonlarda mortalite yüksektir.

2.4.3.4 Antimikrobiyal tedavi sonrası alınan kan örneği

Yalancı-negatif kan kültürleri ile sonuçlanan bir diğer potansiyel karıştırıcı faktör, kan numunelerinin antimikrobiyal tedavinin başlamasından sonra alınması nedeniyle hassasiyetin büyük miktarda azalmasıdır. (62, 63) Profilaktik antibiyotik alan ve ateş gelişen hastalarda KDE riski yüksektir, ancak kan kültürlerinin birçok durumda negatif kalması nedeniyle tanı zordur. (64) Kan kültürlerinde antibiyotiklerin inhibitör etkisinin üstesinden gelmek için, reçine ihtiva eden besiyeri içeren özel bir kültür ortamı geliştirilmiştir. Bu reçineler pozitif yüklü ilaçlara bağlanan katyon değişimli reçineler ve antimikrobiyal ajanların hidrofobik bölgelerine bağlanan polimer emici reçineler olmak üzere iki tiptir. Yeni nesil

sistemler her iki reçineyi bir arada kullanarak kültürde bakteriyel üremeye antibiyotiklerin önleyici etkisini azaltıp duyarlılıkta artış sağlamayı amaçlamaktadır.

2.4.4 Kan kültüründe kantitasyon

Mikrobiyolojide kantitatif ölçümler mümkün olduğunca yaygın kullanılmaktadır. Çeşitli örnek türlerinin katı besiyeri üzerinde kantitasyonu kullanılarak yıllardır yapılan araştırmalar, bu ölçümlerin değerli klinik bilgiler sağladığını göstermiştir. (65) Ancak, kandaki bakteri miktarını geleneksel kültür yöntemleri ile elde etmek zordur ve klinik laboratuvarlarda nadiren uygulanmaktadır. Sıvı kültür şişelerinin pozitif olması için gerekli olan zaman bakteri yükü açısından bir tahmin sağlar, ancak zayıf bir kantitatif ölçüdür ve mevcut olan mikroorganizmanın türü, örnek alımından cihaza yüklenme zamanı gibi faktörlerden etkilenir.

2.5 Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarında Uygulanan Nükleik Asit Temelli Teşhis Yöntemleri

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında bulunan mikroorganizmaların saptanması ve tanımlanması için moleküler tekniklere olan ilgi günümüzde oldukça fazladır. Geleneksel kültür temelli yaklaşımların örnek analizi sırasındaki gecikme, mikroorganizmaların tanımlanmasında çalışana özgü uzmanlık faktörleri, personelin ağır iş yükü ve yavaş veya zor üreyen mikroorganizmalarla ilgili kısıtlamaları nedeniyle, moleküler teknikler kan kültürüne göre daha kullanışlı görünmektedir.

Kan dolaşımı enfeksiyonları, mortalitesi yüksek bir klinik durum olan septik şok ile ilişkili olduğundan hız büyük önem taşımaktadır. Ayrıca kanda mikroorganizma varlığının tanısında nükleik asit temelli teknolojilerin kullanılması, hızlandırılmış zaman-sonuç eğrisine olanak sağlayarak klinisyenin erken dönemde uygun antibiyotik tedavisi başlamasına yardımcı olur ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin gereksiz yere kullanımını engeller. (66)

Son zamanlarda, otomatik DNA ekstraksiyon ve Real-time PCR teknikleri yoğun bakım ünitesinde yatan septik hastalarda kandan PCR testinin kullanımını kolaylaştırmıştır. (67) Klinik örneklerin PCR ile analizinde ana hedefler hastalık sürveyansını, uygun antibiyotik tedavisine erken rehberliği ve hasta yönetimini

geliştirmektedir. Nükleik asitlerin tespitine dayalı patojen saptanması ve tanımlanması için daha yeni teknoloji kullanan moleküler analizlerin, birkaç saatte sonuç vermesi, az örnek hacmi gerektirmesi, yüksek verim sağlaması, ve mikrobiyolojik yükün hesaplanması gibi çeşitli olumlu yanları bulunmaktadır. (68) Real-time PCR yönteminin kan, plazma, beyin-omurilik sıvısı ve diğer klinik örneklerdeki bakteriyel DNA'yı tespit ederek sepsis, menenjit ve septik artrit gibi ciddi enfeksiyon şüphesi olan hastalardan alınan kültür negatif örneklerde etkeni tanımladığı bilinmekle beraber PCR testinin rutinde uygulanabilirliği ve klinik değeri ile ilgili henüz az sayıda bilgi mevcuttur (69-72)

PCR'ın ana avantajları duyarlılık, patojenlerin kültüre olabilmelerinden bağımsızlık ve tanısal sonuçları elde etmedeki hızıdır. Ayrıca duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri karşılaştırılabilir. (73) Bugüne kadar büyük gelişmeler sağlanmış olsa da patojen tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılık paternini eşzamanlı belirleyen ideal bir teknik hala yoktur. (74)

2.5.1 PCR ve Real-time PCR

PCR, 1987 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olup, moleküler parmak izi olarak görev yapan DNA'nın içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan in-vitro tepkimelere verilen ortak bir isimdir. (75,76) DNA nükleotid, tampon ve primerlerin varlığında, ısıya dayanıklı polimeraz tarafından kopyalanır. Primerler, hedef dizinin uçlarında bulunan tamamlayıcı kısa DNA oligomerleridir. DNA ikili sarmalının yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasından sonra sıcaklık düşürülür ve bu sayede oligonükleotid primerler DNA'nın tamamlayıcı bölgelerine hibridize olur. PCR solüsyonundaki DNA polimeraz enzimi yüksek sıcaklıklarda çalışabilen bir enzimdir ve ikili sarmalın açılması için kullanılan yüksek sıcaklığa dayanabilir. Primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık polimerizasyonun gerçekleşmesi için uygun bir dereceye getirildiğinde DNA polimeraz enzimi DNA kopyalarını üreterek DNA ipliklerini uzatır. Sarmallar tekrar denatüre edilir, yeni primerler bağlanır ve DNA sentezi tekrar gerçekleşir. DNA'nın her bir kopyası, orijinal DNA dizisinin üslü amplifikasyonu ile sonuçlanan bir kalıp olarak hizmet vermektedir. Bu işlem genelde 20 ila 50 döngü tekrarlanır.

Amplifiye edilmiş DNA ürününün DNA boyaları veya floresan proba saptanmasıyla kombine edilmiş PCR olan Real-time PCR'nin geliştirilmesi, moleküler teşhis alanında önemli fırsatlar sunmaktadır. (77) Real-time PCR'de, nükleik asit amplifikasyonu ve saptaması sırasında kontaminasyon riskini en aza indirmek için, tüm reaksiyonlar aynı kapalı kap içinde gerçekleştirilir. Buna ek olarak, geleneksel PCR yöntemi ile karşılaştırıldığında performansın kolaylığı, hızı, yüksek hassasiyet ve özgüllük seviyeleri Real-time PCR'yi enfeksiyon hastalıklarının geleneksel kültür temelli tanısına alternatif olabilen cazip bir yaklaşım haline getirmiştir.

Çift sarmallı DNA ürününün görüntülenmesi için en geleneksel yöntem SYBR Green boyası ile nükleik asitin tespit edilmesidir SYBR Green yöntemi özgül değildir ancak farklı amplifikasyon ürünlerinin erime sıcaklığının belirlenmesi için bir erime eğrisi analizi sağlayabilir.

Günümüzde, floresan problemlerin kullanımı, hedef DNA'nın duyarlı ve özgül saptanmasına izin vermiştir. İlk floresan problemler TaqMan problemleridir. Bu problemler 5' ekzonükleaz problemleri olarak da adlandırılan 5' raportör floresan boya ve 3' engelleyici boya ihtiva eden kısa oligonükleotidlerdir. Prob ve hedef molekül arasındaki hibridizasyon sürdüğü sürece raportör floresan boyanın sinyal oluşturması, 3' uçtaki engelleyici boya tarafından engellenmektedir. Raportör floresan boyanın ışık sinyali üretebilmesi için *Taq* DNA polimeraz ile engelleyici boyanın ayrılmış olması gerekir. Primer sentezi sırasında probun bağlandığı noktaya gelindiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Probun hedef DNA'nın komplementer zincirine bağlanıyor olması teknolojinin özgüllüğünü sağlar. Amplifikasyon ürününün birikmesi gerçek zamanlı olarak izlenir ve her döngü sırasında mevcut DNA miktarıyla ilgili sinyalde bir değişiklik oluşturur. (78)

Floresan problemler kullanılarak nükleik asit saptamasında kullanılan diğer prob türlerinden biri olan floresan rezonans enerji transferi (FRET) yeteneğine sahip hibridizasyon problemlerinde, özgül problemlerden biri 3' ucundan floresan boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya ile işaretlidir. Bu tür problemlere dual

hibridizasyon problemleri adı verilir ve uzunlukları 30 nükleotide kadar olabilir. Lineer hibridizasyon problemleri kullanılarak Real-time PCR ile amplifikasyonun saptanması, direkt hibridizasyon esasına dayanır. Bağlanma sonrasında ikinci probun 5' ucundan sentez olmaması için bu uca bir fosfat bağlanmıştır. Problemler hedef bölge üzerinde birbirine yakın yere (1-5 nükleotid uzaklıkta) bağlanır ve işaretli uçlar yanyana gelmiş olur. İki boyanın yanyana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresan oluşumuna neden olur. Oluşan floresan miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine (PCR ile oluşan ürün miktarına) bağlı olarak artar. Her PCR döngüsünün düşük sıcaklık basamaklarında prob hedef DNA'ya bağlanarak ışımaya sağlar, yüksek sıcaklık basamaklarında hedeften ayrılır. Her döngüde, problemlerin bağlanabileceği hedef DNA miktarı arttığı için, sinyal miktarı da artar. (79,80)

2.5.2 Ünlversal primerler

Ünlversal primerler, bakteri ve arkelerin farklı türleri arasında 16S rRNA genindeki yüksek ölçüde korunmuş bölgeleri hedef aldığı için filogenetik çalışmalarda ve klinik örneklerden bakterilerin saptanmasında kullanılır. (81) Carl Woese 16S rRNA kullanımına öncülük etmiştir. (82)

İdeal olarak, KDE için geliştirilecek hızlı bir yöntemin mevcut tanı standardı olan kan kültürüne fonksiyonel olarak eşdeğer olması ve klinikte önemli tüm patojenleri tespit edebilmesi istenir. Bu amaçla, moleküler deneylerde bakteriler için 16S rRNA geni veya 16S-23S rRNA *interspacer* bölge geni ya da mantarlar için 18S ve 28S rRNA geni gibi ünlversal hedefler tanımlama için yaygın olarak kullanılmaktadır. (83,84)

16S rRNA geninin sekansı yaklaşık 1550 baz çifti uzunluğundadır ve bu DNA segmentleri, hemen hemen tüm bilinen bakteri türlerini tanımlamak için kullanılabilen yüksek değişkenlikteki dizileri içerir. (85) Bu bölgeler bakteri tanımlanması için yarar sağlayabilecek türe özgü imza dizileridir. Bunun bir sonucu olarak, 16S rRNA gen sekanslaması, bakteri tanımlamasında fenotipik yöntemlere hızlı ve ucuz bir alternatif olarak tıbbi mikrobiyolojide yaygın hale gelmiştir. Bu başlangıçta bakterileri tespit etmek için kullanılmış, ancak, daha sonra 16S rRNA sekanslaması ile mikroorganizmaların tamamen yeni bir tür ve hatta cins olarak

yeniden sınıflandırılması yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. (86, 87) Ayrıca, kültürü yapılamamış veya zor olan türleri tanımlamak için kullanabilme özelliği de bulunmaktadır. 16S rRNA geni mikroorganizma tanımlanması ve sınıflandırması için standart olarak kullanılmıştır. Bunun nedeni, mikroorganizmaların tamamında bulunması ve korunmuş değişiklikler göstermesidir. Çoğu bakteri ve arke için 16S rRNA geni dizilerinin sekansları NCBI gibi ortak veri tabanlarında mevcuttur. (89-91)

2.5.3 Kan kültürleri veya klinik örneklerden nükleik asitlerin saflaştırılması

Güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için, uygulanan hedef DNA, yüksek saflıkta ve yeterli miktarda olmalıdır. (92) Hedef mikroorganizmanın nükleik asitlerinin örnek materyalinden saflaştırılması tüm tanımlama sürecinde en kritik adımlardan biridir ve üç aşamalı prosedür (mikroorganizmanın parçalanması, seçici bağlanma ve DNA'nın elüsyonu) gerektirir. (93)

Yüksek miktarda insan DNA'sına göre patojen DNA konsantrasyonunun düşük olması, hasta örnekleri veya kültür ortamı içinde PCR-inhibe edici bileşikler bulunması ve reaktiflerde kontaminan olarak bakteriyel veya fungal DNA varlığı bakteri ve mantar hastalıklarının moleküler tanısı sırasında karşılaşılan önemli zorluklardır. (94-96)

Klasik saflaştırma yöntemi olan fenol / kloroform ekstraksiyonu sonrası etanolle presipitasyon toksiktir ve çok sayıda örnek işlenmesi için pratik değildir. Son yıllarda, birçok ticari kit ve otomatik DNA izolasyon araçları geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir. Bunlar başlıca spin-kolon tabanlı ekstraksiyonu kullanmaktadır. Kolon pürifikasyon kullanılarak DNA ekstraksiyonu (i) kaotropik tuzlar ile proteinlerin denatürasyonu sonucu nükleik asitlerin serbest bırakılması, (ii) bir silika jel membran üzerine adsorpsiyon yoluyla nükleik asitlerin ayrılması, (iii) denatüre proteinlerin ve diğer bileşiklerin bertaraf edilmesi için, yüksek tuz konsantrasyonlu tampon ile yıkama ve (iv) düşük tuz konsantrasyonlu tampon ile bağlı DNA'nın elüsyonu basamaklarından oluşur. Yapılan çalışmalarda, tüm mikroorganizmaların tespit edilmesi ve her hasta numunesine uygulama için optimal olan tek bir DNA izolasyonu yönteminin olmadığını gösterilmiştir. (97)

Kan kültürleri gibi kültürü yapılmış hasta numuneleri yüksek bir bakteri veya mantar yükü içerir, ancak antikoagülan ve antikomplementer ajan sodyum

polyanethol sülfonat (SPS) gibi inhibitör maddeler PCR uygulamalarını etkileyebilir. (98) Pozitif kan kültürlerinde yüksek miktarda mikroorganizma elde edilmesinin yanı sıra, MRSA ve *S. pneumonia* gibi yaşamı tehdit eden patojenlerin daha hızlı tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık paternleri sağlanabilir. (99, 100)

Enfeksiyöz etkenin hızlı bir şekilde saptanmasını kolaylaştırmak için, öncesinde inkübasyon adımı olmadan hasta örneklerinin doğrudan işlenmesi tercih edilir. Tam kan, plazma ya da serum gibi örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu, düşük bakteriyel DNA miktarına karşı yüksek insan DNA miktarı nedeniyle zor olabilir. Buna ek olarak, tam kanda da çok sayıda PCR inhibe edici madde bulunmaktadır. (101)

2.5.4 Pozitif kan kültürlerinden patojenlerin tanımlanması için nükleik asit tabanlı yöntemler

Kan kültürü ortamında üreme aşamasından sonra patojenlerin moleküler tanımlanması hibridizasyon-temelli veya amplifikasyon temelli teknikler ile en kolay şekilde elde edilebilir. Kan kültüründe ilk üreme gerekli olmasına rağmen, bu yöntemlerin çoğu esas olarak patojenlerin tanımlanması ya da belirli dirençli genlerinin tespiti için gerekli zamanı kısaltır. Moleküler tanımlama, kan kültüründe en sık bulunan bakteriyel enfeksiyonların daha hızlı tanısını sağlasa da, kısaltılmış işlem süresinin klinik etkisi halen belirgin değildir.

Günümüzde geleneksel kan kültüründe üreme saptandıktan sonra multipleks PCR veya geniş kapsamlı amplifikasyon sonrası sekans analizi genel bir uygulama değildir çünkü patojenleri moleküler tekniklerle belirlemek geleneksel tanımlama tekniklerine kıyasla pahalı ve zahmetli olduğu için çok daha iyi bir klinik yarar ya da maliyet etkinliği vermez. Ancak, uygulanabilirlikleri büyük olasılıkla yakın gelecekte artıracaktır.

2.5.5 Örneklerden doğrudan patojenlerin tespit ve tanımlanması için nükleik asit tabanlı yöntemler

Tam kan örnekleri üzerinde doğrudan uygulanabilir moleküler teknikler kanda mevcut olan organizmanın ve ilaç direnci ile ilişkili genlerin hızlı tespit edilmesi için en iyi seçenektir. İyi tasarlanmış ve klinik olarak doğrulanmış bir

yöntem klasik kültür-temelli yöntemlere göre daha kısa bir işlem süresine olanak sağlayacaktır. Kan kültürüne uygulanan moleküler tekniklerde olduğu gibi, patojene özgü, geniş kapsamlı ve multipleks yöntemler de dahil olmak üzere çok sayıda saptama stratejisi tarif edilmiştir.

2.5.5.1 Patojene özgü PCR / cinse özgü PCR

Bu yöntemler, nadiren faydalı olmasına rağmen, nazlı bir patojen veya yavaş üreyen mikroorganizma varlığından şüphelenildiği zaman düşünülebilir. Tam kandan *S. pneumoniae* DNA'sının saptanması buna bir örnektir çünkü bu bakterinin kültüre dayalı teşhisi zor olabilir. Çeşitli çalışmalar, bu enfeksiyonu düşündüren bir hikayesi, radyolojik pnömoni bulguları bulunan, antibiyotik tedavisi alan ancak negatif kan kültürleri olan hastalarda PCR ile *S. pneumoniae*'nin daha iyi saptandığını göstermiştir. (102, 103) İnvazif mantar enfeksiyonları gibi hayatı tehdit eden bir enfeksiyondan şüphe edildiğinde de hızlı tanı gereklidir ve patojene özgü PCR'ın yararlı olabileceğini öne süren güncel yayınlar mevcuttur. (104)

2.5.5.2 Geniş kapsamlı PCR yöntemleri

Geniş kapsamlı PCR yöntemleri, kanda bakteri veya mantarların universal tespiti için geliştirilmiştir. Bunlar, bakterilerin 16S ya da 23S rRNA geni ve mantarların 18S rRNA geninin amplifikasyonuna dayanmaktadır. Çeşitli bakteri türlerinde üreme hızına bağlı olarak bu genlerin farklı kopya sayıları bulunur. Teorik olarak, kanda herhangi bir bakteri ya da mantar DNA'sı varlığında 16S, 23S ya da 18S rRNA geninin korunmuş bölgelerine dayanan PCR bunların tespitine imkan yaratır. DNA'nın amplifikasyonundan sonra, amplikonlar kapiller sekans analizi, pirosekanslama veya özel problemlerle hibridizasyon gibi farklı yöntemlerle tespit edilebilir. (105)

2.5.5.3 Multipleks PCR yöntemi

Multipleks PCR, amplifiye edilecek olan sınır bölgesini bağlamak için tasarlanmış bir primer karışımı kullanılarak, aynı anda, aynı örnekteki birden fazla DNA hedefinin amplifiye edilmesini amaçlar. Bu teknik, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında KDE tanısı için rutin kullanımda en çok umut vericidir. (106) Bu yöntemde hedeflenen ribozomal DNA'nın kodlanmayan bölgeleri, yüksek oranda korunmuş genler arasında lokalizedir, mikroorganizmaların cins ve türleri arasında

yüksek seviyede heterojenlik gösterir ve primerlerden oluşan sınırlı bir havuzu kullanarak yüksek düzeyde tanımlama sağlar. (107)

2.5.6 Bakteriyel yük tespiti

Klinik bakteriyolojide, Real-time PCR deneyleri çoğunlukla kalitatif saptamada ve mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılır. Bununla birlikte, doğrudan örneklerden patojenlerin kantifikasyonu hastalığın ciddiyeti, tedaviye yanıtı ve sonucu gibi klinik parametrelerle korelasyona olanak verebilir. Bakteriyel veya fungal DNA yükü ile hastalık şiddeti arasındaki korelasyonu kanıtlamak için yapılmış az sayıda çalışma vardır.

Tanısında etken bakteri yükü ile birlikte klinik semptomların değerlendirildiği bazı hastalıklarda (idrar yolu enfeksiyonları) patojenlerin kantifikasyonu esastır. Ayrıca, bu sayede kontaminan bakteriler ile gerçek patojenlerin ayrımı mümkün olabilir.

Patojenlerin miktar tayini, kan ve BOS gibi hasta numunelerinde araştırılmıştır. (108) Bu yayınlarda tarif edilen en önemli sorunlardan biri canlı ve ölü hücreler arasında ayırım eksikliğidir. (109) Ayrıca, bakteriyel DNA'nın kökeni belirsizdir ve antibiyotik alan hastalarda yorumlanması sorunlara neden olabilir. Antibiyotiklerin uygulanmasından sonra, yaşayan bakteri miktarı azalır ancak bakteriyel DNA varlığı devam etmektedir. Bu nedenle, bakteriyel DNA yükünün tespitinin klinik değeri henüz tam olarak aydınlatılmış değildir.

2.5.7 Nükleik asit tabanlı yöntemlerin başlıca yetersizlikleri

Steril bir örnekleme yöntemi ve optimize edilmiş bir numune hazırlama protokolü nükleik asit tabanlı yöntemlerde DNA hedeflerini elde etmek için çok önemlidir. (110) Yüksek duyarlılıkları nedeniyle, genel olarak PCR teknikleri ve 16S rRNA tabanlı tespit sistemleri, özellikle yanlış pozitif sinyallere yol açan DNA kontaminasyon sorunlarına yatkındır. (111) Havada bulunan ve taşınma nedeniyle olan kontaminasyonların yanı sıra, DNA'nın arka planında bulunan polimerizasyon enzimi, nükleotidler, primerler, tampon ve su dahil reaktiflerle PCR ciddi şekilde bozulabilir. (112) Bir numunede patojen hücre sayısı düşükse ve analitik sistemin saptama sınırındaysa bu özellikle önemli hale gelir. (113) Kompleks biyolojik

numunelerin çoğu hem patojenlerin özgül ve hassas belirlenmesi için önemlidir, hem de moleküler yöntemleri inhibe eden maddeler içerir. (114, 115)

PCR reaktiflerindeki DNA kontaminasyonunun uzaklaştırılması, fiziksel, kimyasal ve enzimatik yaklaşımlarla mümkün olsa da inhibitörlerin tamamen uzaklaştırılması zor ve zaman alıcıdır. DNase'ların ve restriksiyon enzimlerinin kullanımı klinik örneklerin universal 16S rRNA monitörizasyonunda yanlış-pozitif oranların ortadan kaldırılması için gelecek vaat eden bir araç olarak önerilmiştir. (116) Ancak universal 16S rRNA yönteminde ultraviyole radyasyon, UV radyasyon ile birlikte 8-Methoxypsoralen uygulaması, DNase ve restriksiyon enzimleri gibi DNA dekontaminasyon yöntemleri arasında oldukça değişken DNA eliminasyon etkinliği ve saptama duyarlılığında kayıp saptanmıştır. (117)

Ticari olarak elde edilen PCR reaktifleri, kontaminasyonlarının düşüklüğü nedeniyle tercih edilir olmaktadır. Uygun bir preanalitik set ve tanı kontrolleri setinin önemi, bakteri tespit sisteminin yanlış-pozitif ve yanlış-negatif sonuçlar ile ilgili etkinliği ve doğruluğunun izlenmesinde daha fazla hissedilecektir. (118)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Referans Suşlar

Çalışmada kan dolaşımı enfeksiyonlarında en sık rastlanan 13 referans suş kullanılmıştır: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33495 ve *Proteus mirabilis* ATCC 43071

3.2 Bakteri Dilüsyonlarının Hazırlanması

Referans suşların her biri %5 koyun kanlı agara (Salubris A.Ş., İstanbul) ekilerek 35°C’de, % 5-10 CO₂’li etüvde, 24 saat inkübe edilmiştir. Steril SF içine eklenen taze bakteri kolonileri 10⁸ CFU/mL yoğunluğa gelecek şekilde (0,5 McFarland) ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan steril SF kullanılarak 10¹ CFU/mL’ye ulaşana kadar 10 katlık seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

3.3 Hasta ve Gönüllülerden Alınan Kan Örnekleri

Çalışmaya Şubat - Mayıs 2014 tarihleri arasında, erişkin sağlıklı gönüllüler ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Yoğun Bakım Üniteleri’nde yatmakta olan erişkin hastalar dahil edilmiştir.

Araştırmaya dahil edilmiş hastaların ve gönüllülerin özellikleri:

1. Yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan, bir ölçümde 38,3°C ve üzeri veya bir saat boyunca yapılan ölçümlerde 38,0°C ve üzeri ateşi olan erişkinler (202 kişi)
2. Son 30 günde antibiyotik kullanımı olmayan, akut hastalık geçirmemiş, 38,0°C altı ateşi olan, bilinen kronik hastalığı olmayan gönüllü erişkinler (15 kişi)

3.4 Gönüllülerden Alınan Kanlara Bakteri Dilüsyonlarının Katılması

Çalışmamız boyunca gönüllülerden mor kapaklı, EDTA içeren tüplere 5 ml kan alınmıştır. İlk aşama olarak, gönüllülerden alınan kan örnekleri havuzlanıp 1,5 ml'lik ependorflara 900 µl ayrılmıştır. Her bir 900 µl kanın üzerine 13 bakterinin ATCC suşlarından hazırlanan ilgili dilüsyonlardan ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ ve pozitif kontrol olarak 10^8) 100 µl eklenerek $10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4$ ve pozitif kontrol olarak 10^7 dilüsyonlarına ulaşılmıştır. Ayrıca dilüsyonların her birinden % 5 koyun kanlı agar 100 µl ekim yapılmış, 35°C'de %5-10 CO₂'li etüvde 24 saat inkübe edilerek mililitrede koloni oluşturan ünite (CFU/ml) sayısı hesaplanmıştır. Bu bakteri dilüsyonu eklenmiş kan örnekleri universal primer ve prob setleri ile Real-time PCR yapılarak saptama sınırları belirlenmiştir.

3.5 Yoğun bakımda yatan hastaların taranması

Yoğun bakımda yatmakta olan hastalardan, hekim tarafından kan kültürüyle eş zamanlı alınan ve mor kapaklı, EDTA içeren tüpe konulan 2 ml kan incelenmiştir ayrıca girişimsel bir işlem yapılmamıştır. İç Hastalıkları YBÜ, Anestezi ve Reanimasyon YBÜ, Nöroloji YBÜ ve Genel Cerrahi YBÜ'nde yatmakta olan hastalardan klinik mikrobiyoloji ve moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen kan örnekleri gün içinde alındığı takdirde hemen, mesai saatleri dışında alındığında +4°C'de saklandıktan sonra DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmıştır. Elde edilen saf DNA molekülleri PCR işlemine alınana dek -20°C'de saklanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastalardan alınan kan kültürü örnekleri ise Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji Laboratuvarı Kan Kültürü Çalışma Talimatlarına göre Klinik Bakterioloji ekibi tarafından değerlendirilmiş, çalışma sırasında araştırma ekibi tarafından herhangi bir müdahalede bulunulmamıştır. Sonuçlar otomatize bilgi sisteminden alınarak moleküler yöntem sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji Laboratuvarı Kan Kültürü Çalışma Talimatlarına göre gelen kan kültürü şişeleri BACT/ALERT 3D cihazına firmanın önerdiği şekilde yüklenir. Cihaz pozitif veya negatif sinyal verene kadar inkübe edilir. Pozitif sinyal veren şişelerden hemen Gram boyama yapılarak, sonucu klinisyene kritik değer olarak bildirilir. Bu sırada aynı şişeden % 5 koyun

kanlı agar, EMB ve çikolata agara ekimler yapılarak 35°C’de %5-10 CO₂’li etüvde inkübe edilir. Üreyen koloniler, VITEK MS cihazında firma protokollerine göre ve diğ er manuel biyokimyasal testlerle (katalaz, koag l az, CAMP vb.) değerlendirilir.

2.6 Örneklerden Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması

Moleküler alışmalar için hasta örnekleri ve gönüllülerden alınmış kanlara katılan bakterilerin DNA’ları, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak manuel olarak ekstrakte edilmiş ve saflaştırılmıştır. Kullanılan bu kitle, spin-kolon yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu şekilde nükleik asitler santrifüjle bir membran filtreye tutturularak saflaştırılmıştır. Bakteriyel DNA’ların izolasyonu için kullanılan solüsyonlar ve maddeler:

İsopropanol	100 µl
Proteinaz K	40 µl
Lizozim	5 µl
“Binding buffer” (Baęlama tamponu)	200 µl
“Inhibitor Removal buffer” (İnhibitör uzaklaştırıcı tampon)	500 µl
“Wash buffer” (Yıkama tamponu)	500 µl
“Elution buffer” (Elüsyon tamponu)	200 µl

İzolasyon Basamakları:

1. DNA izolasyonu yapılmış bakteri süspansiyonu veya EDTA’lı tüpe alınmış hasta örneğinden 200 µl 15 ml’lik nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. 5 µl lizozim solüsyonu (20 mg/ml lizozim;20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; %1.2 triton) eklenerek 37°C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
3. 200 µl “Binding buffer” ve 40 µl proteinaz K eklenerek vortekslendi ve 70°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
4. Karışıma 100 µl isopropanol eklenerek 15 sn vortekslendi.

5. Karışımın tamamı filtre tüpüne (HighPure spin kolon) aktarıldı ve 1 dk boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edildi.
6. Filtre tüpüne 500 µl “Inhibitor removal buffer” eklendi. 1 dk boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edildi.
7. Filtre tüpüne 500 µl “Wash buffer” eklendi. 1 dk boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edildi. Bu yıkama basamağı iki kez tekrar edildi.
8. Filtrede kalan alkolü uzaklaştırmak için, filtre üzerine hiçbir madde eklenmeden boş filtre son hızda 10 saniye santrifüj edildi.
9. Filtre tüpüne 200 µl “Elution buffer” eklendi. Oda ısısında 1 dk tutulduktan sonra 1 dk boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edilerek DNA saf olarak elde edildi. Bu şekilde elde edilen saf DNA molekülleri PCR işlemine alınana dek -20°C’de saklandı.

3.7 Bakteriyel Üniversal Primerler ve FRET Prob Dizaynları

Bakteriyel DNA’nın multipleks amplifikasyonu için kullanılan primer çifti, RW01 ve DG74, farklı bakteri grupları arasında yüksek oranda korunmuş olan 16s rRNA sekansını amplifiye eder. Kullanılan hibridizasyon problemleri, Gram-negatifler için LCRed 640 ve Gram-pozitifler için LCRed705 boylarıyla işaretlenmiş olup 640 ve 705 kanallarında verdiği sinyallerle saptanan bakterinin Gram özelliğini ayırtıcı niteliktedir.

Primer/Prob	Sekans
RW01 (Forward Primer)	5’-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT3
DG74 (Reverse Primer)	5’-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3
Gram-Anchor Prob	5’-CGG AGG AAG GTG GGG ATG ACG TCA A-FL
Gram-Pozitif Prob	5’-LCRed705-TCA TCA TGC CCC TTA CG-P
Gram-Negatif Prob	5’-LCRed640-TCA TCA TGG CCC TTA CG-P

3.8 Real-time PCR

Gönüllülerden alınmış kana eklenmiş 13 standart bakterinin 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ve 10^7 dilüsyonlarının DNA'larını saptamak ve 202 hasta örneğinde DNA varlığını araştırmak amacıyla "LightCycler 2.0" cihazı (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır.

PCR için hazırlanan karışımın içeriği şu şekildedir:

Su	9,8 µl
Forward Primer RW01(10 pmol)	0,5 µl
Reverse Primer DG74(10 pmol)	0,25 µl
Gram Pozitif prob	0,15 µl
Gram Negatif prob	0,15 µl
Gram Anchor prob	0,15 µl
FastStart DNA Master ^{PLUS} HybProbe-Mix (Roche Diagnostics, Almanya)	4 µl

"LightCycler" cihazı için hazırlanmış özel kapiller tüplere, soğuk blok üzerinde bu karışımdan 15 µl dağıtılmıştır. Her bir tüpe 5 µl ekstraksiyonu yapılmış DNA eklenmiş ve cihazla birlikte temin edilen özel santrifüj cihazında (Roche Diagnostics, Almanya) 3000 rpm'de 15 sn santrifüj yapılmıştır. Kapiller tüpler "LightCycler 2.0" cihazına yerleştirilmiştir.

Her Real-time PCR testinde sağlıklı gönüllülerden alınmış ancak bakteri eklenmemiş bir negatif kontrol kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak "American Type Culture Collection" (ATCC) 29213 numaralı *S. aureus*, 25922 numaralı *E. coli* veya 33495 numaralı *K. pneumoniae* ATCC 10^7 dilüsyonlarından elde edilmiş DNA kullanılmıştır.

“LightCycler 2.0” ile uygulanan PCR protokolü şu şekilde ayarlanmıştır:

Ön denatürasyon:	95 ⁰ C’de 10 dk
Amplifikasyon (37 döngü):	95 ⁰ C’de 10 sn (Denatürasyon)
	55 ⁰ C’de 10 sn (Bağlanma)
	72 ⁰ C’de 20 sn (Polimerizasyon)
Erime eğrisi:	95 ⁰ C’de 10 sn
	50 ⁰ C’de 10 sn
	95 ⁰ C’de 10 sn
Soğutma:	95 ⁰ C’de 10 sn

4. BULGULAR

Çalışmaya katılan gönüllülerden alınan kana katılmış ATCC suşlarının $10^0, 10^1, 10^2, 10^3$ ve 10^4 dilüsyonları için %5 koyun kanlı agarda 24. saatte üreyen koloni sayılarına göre saptama duyarlılıkları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Gönüllülerden alınan kana katılmış ATCC suşlarının saptama duyarlılıkları

	CFU/ml
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	40
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	130
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	260
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	160
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	60
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	50
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	120
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	610
<i>E. coli</i> ATCC 25922	220
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 33495	320
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	190
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	90
<i>P. mirabilis</i> ATCC 43071	150

Çalışmaya Şubat-Mayıs 2014 arası Dahiliye YBÜ, Genel Cerrahi YBÜ, Anesteziyoloji ve Reanimasyon YBÜ ve Nöroloji YBÜ’de yatmakta olan hastalar dahil edilmiştir. Farklı bölümlerde yatan olgular tek grup altında değerlendirilmiş olup, yöntem bazında değerlendirilme yapıldığı için aynı hastadan alınan birden fazla kan örneği çalışmada kabul edilmiştir. Toplamda 93 farklı hastadan 202 tam kan örneği ve kan kültürü değerlendirilmiştir.

45 erkek ve 48 kadından oluşan 93 farklı hastanın yaş ortalaması 62,1 ve ateş ortalaması 38,4°C bulunmuştur. En düşük ve en yüksek verilerini de içeren yaş ve ateş ortalamaları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 93 farklı hastanın en düşük ve en yüksek verilerini de içeren yaş ve ateş ortalamaları

	Sayı (n)	En düşük	En yüksek	Ortalama
Ateş (°C)	202	38,0	39,5	38,4
Yaş (Yıl)	93	21	93	62,1

Çalışmada değerlendirilen 202 kan kültürün 167 tanesinde 5 günlük inkübasyon sonucu bakteri veya mantar üremesi görülmemiştir. 12 örnekte Gram negatif bakteri, 18 örnekte Gram pozitif bakteri ve 5 örnekte mantar üremesi olmuştur. Kan kültürü yönteminin bakteri üremesi açısından pozitiflik yüzdesi % 14,8 hesaplanmıştır. Bakteri üreyen örnekler için üreme süreleri değerlendirildiğinde en kısa 10 saat 21 dakika, en uzun 32 saat 10 dakika (ortalama 19 saat 48 dakika) olduğu görülmüştür. Tablo 4.3'te hastalardan alınan kan kültürü örneklerinde üreme sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.3 Hastalardan alınan 202 kan kültürü örneğinde üreme sonuçları

	Sayı (n)	Yüzde(%)
Negatif	167	82,7
Gram (-) bakteri	12	5,9
Gram (+) bakteri	18	8,9
Mantar	5	2,5
Toplam	202	100,0

Polimikrobiyal üreme 3 örnekte görülmüştür. 2 örnekte *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*, 1 örnekte *S. epidermidis* ve *E. faecium* üremiştir. Polimikrobiyal üreme yüzdesi % 1,5 bulunmuştur. Tablo 4.4'te hastalardan alınan kan kültürü örneklerinde cins veya tür düzeyinde üreme sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.4 Hastalardan alınan 202 kan kültürü örneğinde cins veya tür düzeyinde üreme sonuçları

Cins/tür	Sayı (n)	Yüzde (%)
<i>A. baumannii</i>	3	1,5
<i>A. baumannii</i> + <i>K. pneumoniae</i>	2	1,0
<i>C. albicans</i>	3	1,5
<i>C. guilliermondii</i>	1	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5
<i>E. aerogenes</i>	1	0,5
<i>E. cloacae</i>	1	0,5
<i>E. faecalis</i>	1	0,5
<i>E. faecium</i>	3	1,5
<i>E. faecium</i> + <i>S. epidermidis</i>	1	0,5
<i>E. cloacae</i>	1	0,5
<i>E. coli</i>	1	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	1	0,5
Koagülaz Negatif Stafilokok	9	4,5
<i>P. mirabilis</i>	1	0,5
<i>S. aureus</i>	1	0,5
<i>S. epidermidis</i>	3	1,5
<i>S. maltophilia</i>	1	0,5
Negatif	167	82,7
Toplam	202	100

Çalışmada değerlendirilen 202 kan örneğinin 167 tanesinde multipleks Real-time PCR sonucu negatif bulunmuştur. 14 örnekte (% 6,9) Gram negatif bakteri, 21 örnekte (%10,4) Gram pozitif bakteri DNA'sı varlığına dair bulgu alınmıştır. Çalışmada kullanılan Real-time PCR yönteminin pozitiflik yüzdesi %17,3 hesaplanmıştır. Tablo 4.5'te hastalardan alınan kan örneklerinde Real-time PCR sonuçları görülmektedir.

Tablo 4.5 Hastalardan alınan kan örneklerinde Real-time PCR sonuçları

	Sayı (n)	Yüzde(%)
Negatif	167	82,7
Gram (-) prob	14	6,9
Gram (+) prob	21	10,4
Toplam	202	100,0

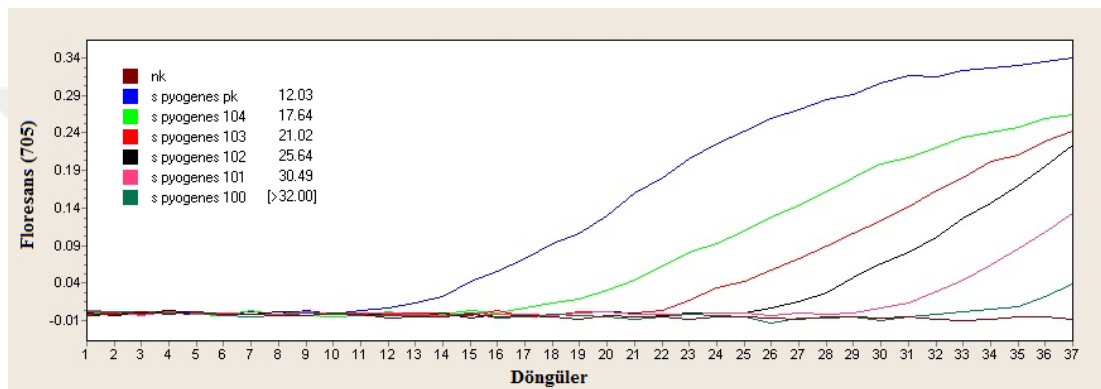
Çalışmada standart yöntem olarak kan kültürü kullanılmış olup Real-time PCR sonuçları karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Bakteri üremesi açısından duyarlılık % 100, özgüllük % 97, pozitif prediktif değer % 85 ve negatif prediktif değer % 100 olarak hesaplanmıştır. Hastalardan alınan kan kültürü örneklerinde bakteri üreme sonuçları ve kan örneklerinde Real-time PCR sonuçları karşılaştırılmalı olarak Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6 Hastalardan alınan kan kültürü örneklerinde bakteri üreme sonuçları ve kan örneklerinde Real-time PCR sonuçları karşılaştırılmalı sonuçları

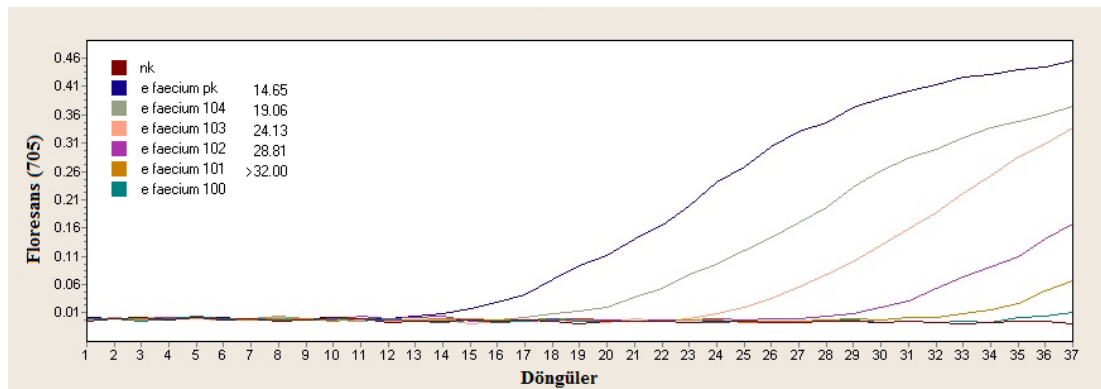
		Kan kültürü, n (%)		
		Negatif	Gram (-)	Gram (+)
Real-time PCR, n (%)	Negatif	172 (97,0)	0	0
	Gram (-)	2 (1,2)	12	0
	Gram (+)	3 (1,8)	0	18

Gönüllülerden alınan kanlara katılmış ATCC suşlarının 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile 705 veya 640 kanallarında saptama sonuçları elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak ilgili bakterinin 10^7 dilüsyonu, negatif kontrol olarak bakteri katılmamış gönüllü kanı kullanılmıştır. Şekil 4.1-13'te grafikler ve Ct değerleri gösterilmektedir.

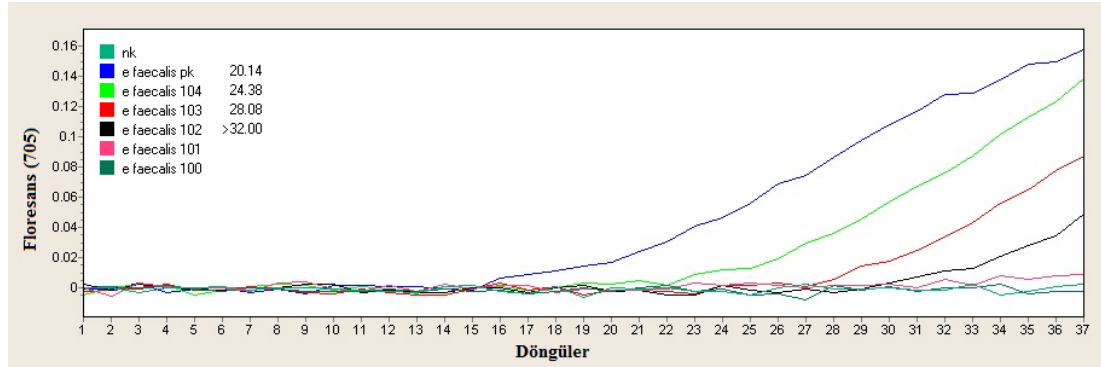
Şekil 4. 1 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. pyogenes* ATCC 19615 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama sonuçlarını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



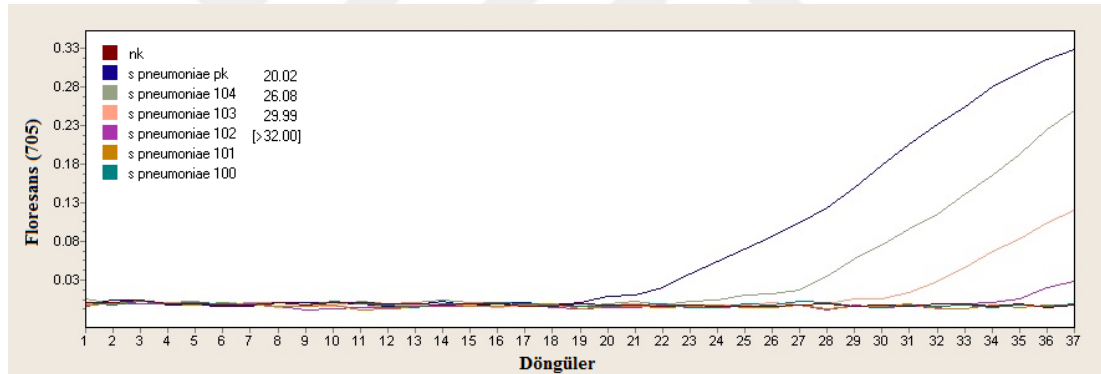
Şekil 4. 2 Gönüllülerden alınan kana katılmış *E. faecium* ATCC 19434 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



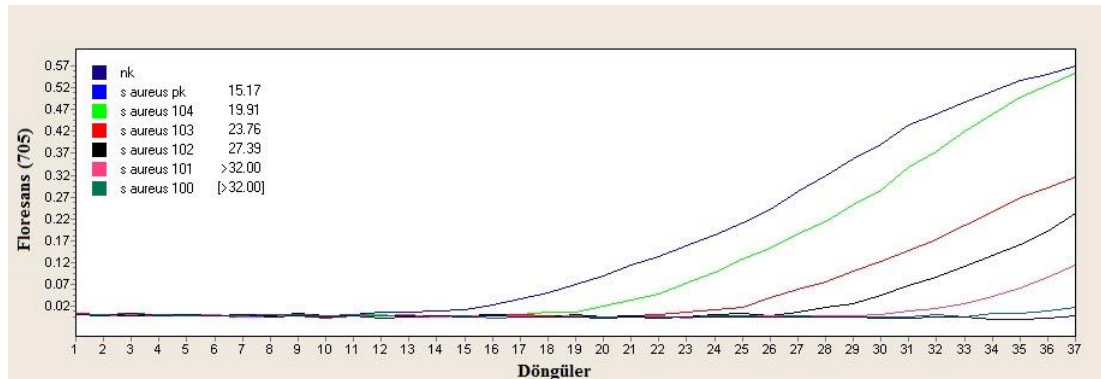
Şekil 4. 3 Gönüllülerden alınan kana katılmış *E. faecalis* ATCC 19433 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir.(pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



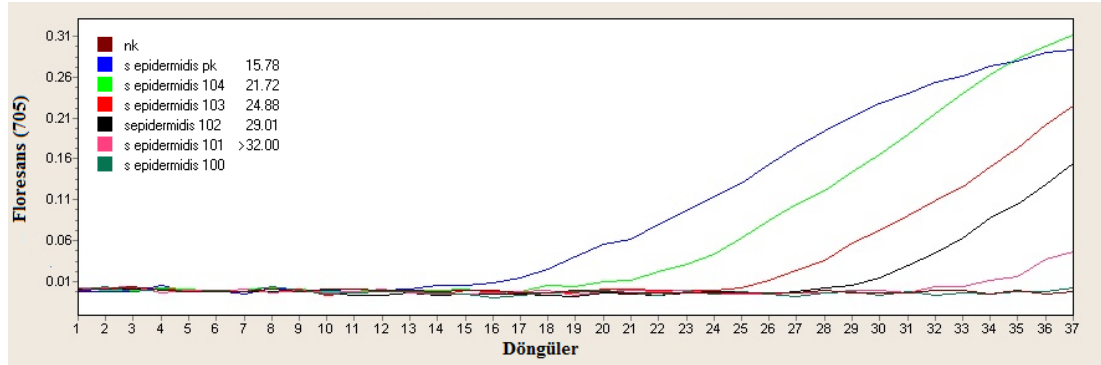
Şekil 4. 4 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. pneumoniae* ATCC 49619 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



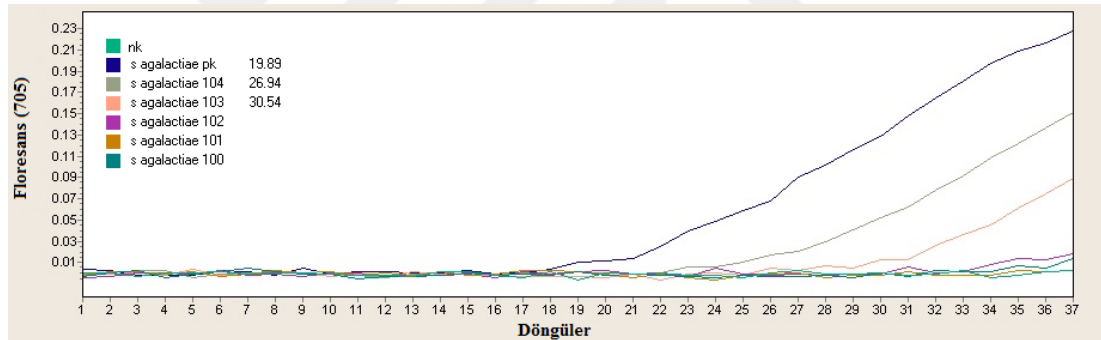
Şekil 4. 5 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. aureus* ATCC 29213 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



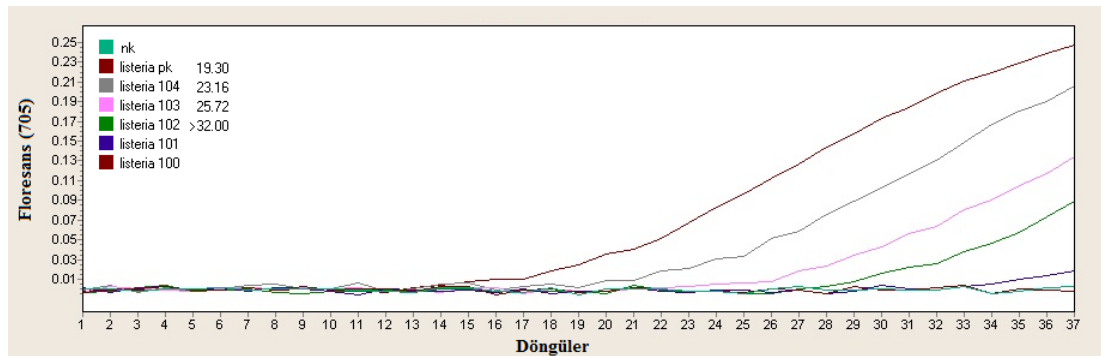
Şekil 4. 6 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S. epidermidis* ATCC 12228 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



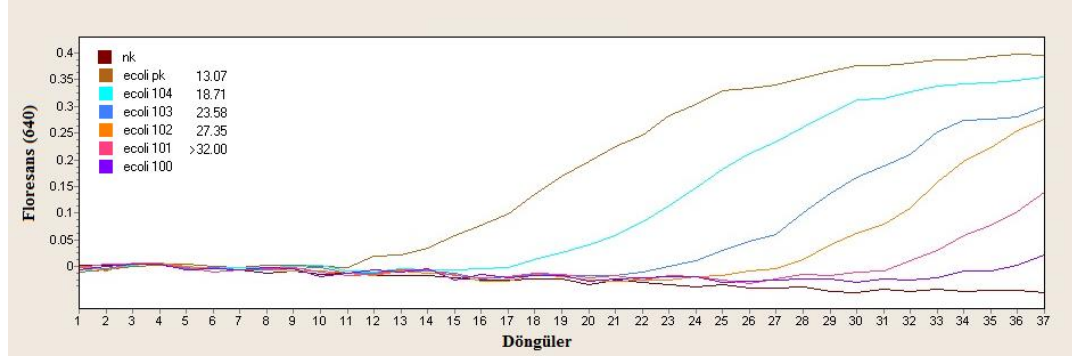
Şekil 4. 7 Gönüllülerden alınan kana katılmış *S.agalactiae* ATCC 13813 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



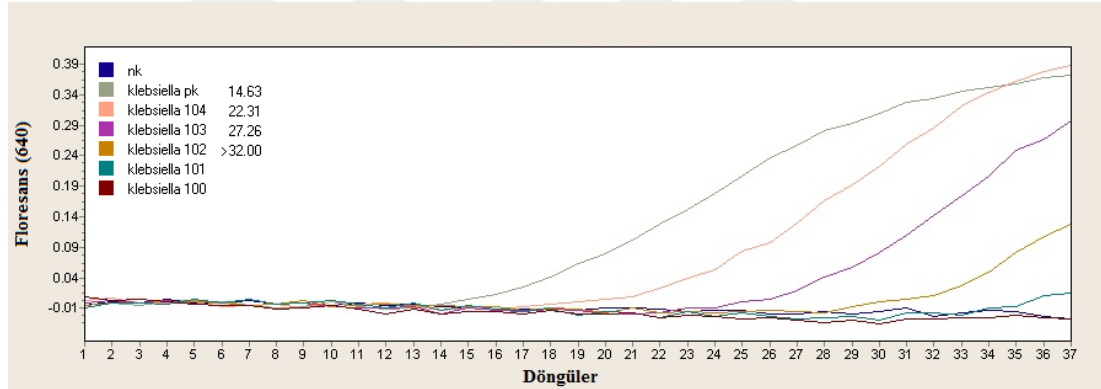
Şekil 4. 8 Gönüllülerden alınan kana katılmış *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



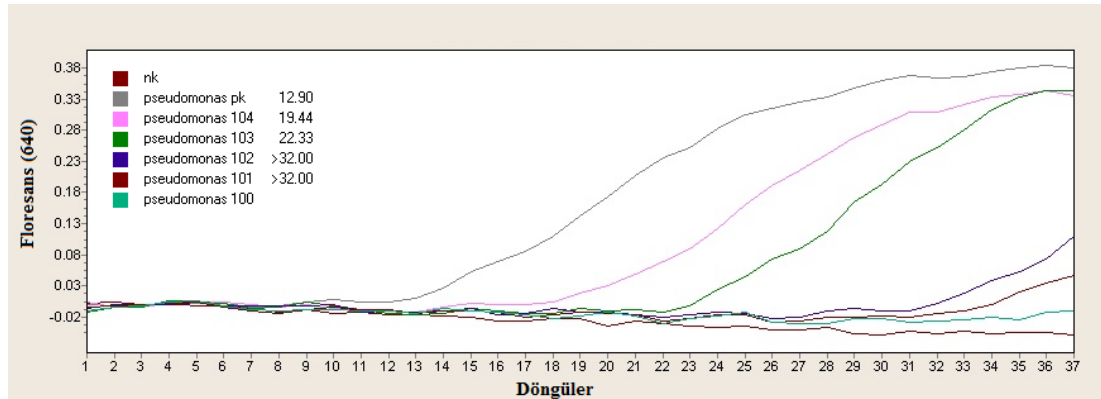
Şekil 4. 9 Gönüllülerden alınan kana katılmış *E. coli* ATCC 25922 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



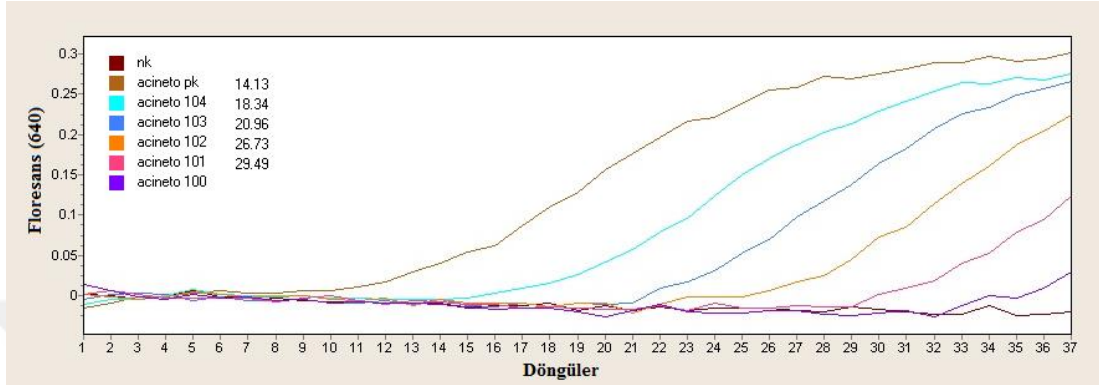
Şekil 4.10 Gönüllülerden alınan kana katılmış *K. pneumoniae* ATCC 33495 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



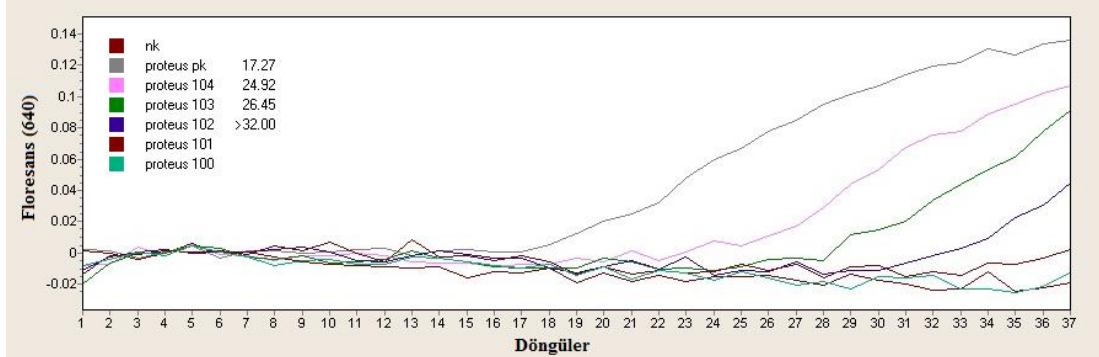
Şekil 4.11 Gönüllülerden alınan kana katılmış *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



Şekil 4.12 Gönüllülerden alınan kana katılmış *A. baumannii* ATCC 19606 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)

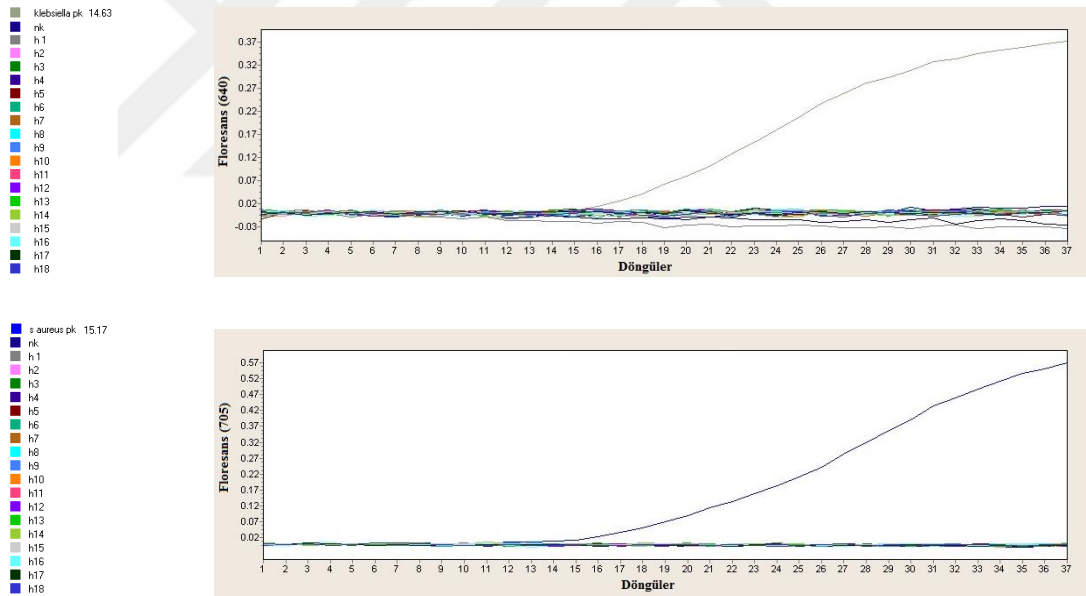


Şekil 4.13 Gönüllülerden alınan kana katılmış *P.mirabilis* ATCC 43071 suşunun 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 ve 10^0 dilüsyonları için multipleks Real-time PCR ile saptama duyarlılığını göstermektedir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)

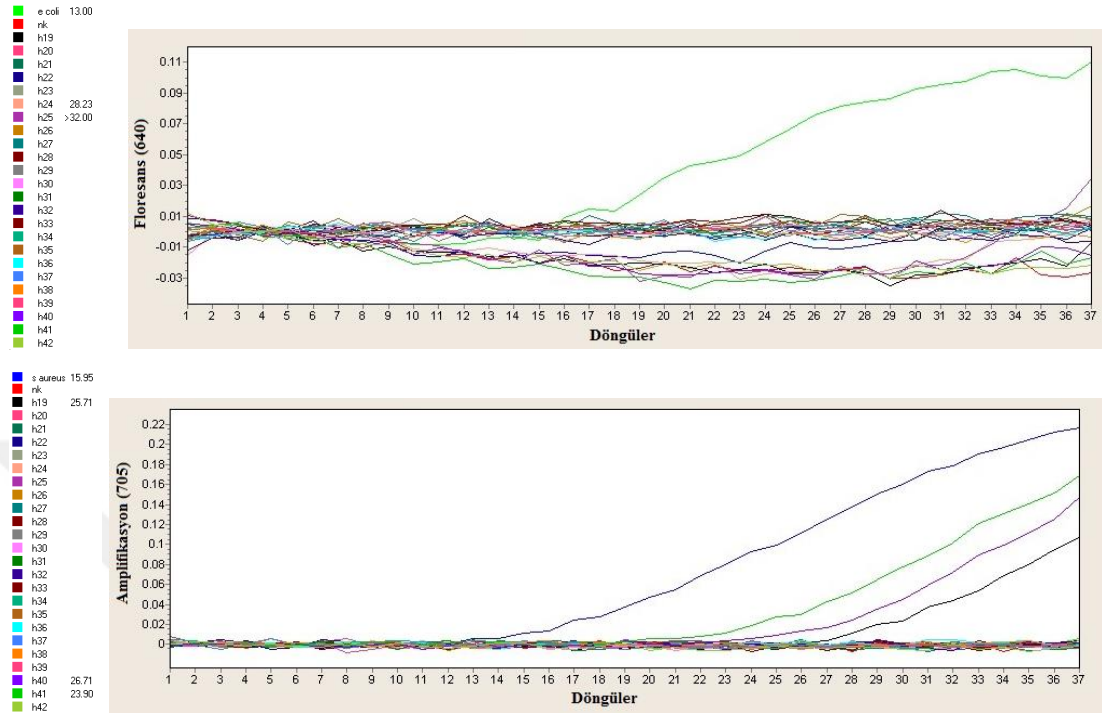


Multipleks Real-time PCR ile değerlendirildiğinde kanal 640 ile elde edilen floresans Gram negatif bakteri DNA'sı varlığını, kanal 705 ile elde edilen floresans Gram pozitif bakteri DNA'sı varlığını göstermektedir. 202 hastanın tam kan örnekleri her iki kanalda değerlendirilmiş olup 19, 40, 41, 48, 64, 70, 78, 83, 102, 103, 123, 132, 135, 136, 141, 148, 168, 175, 177, 182 ve 190. hastalarda Gram pozitif, 24, 25, 46, 61, 66, 75, 86, 91, 99, 108, 118, 137, 152 ve 161. hastalarda Gram negatif DNA varlığına dair pozitif sinyal elde edilmiştir. Şekil 4.14-22'de multipleks Real-time PCR sonuç grafikleri gösterilmektedir. Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 , *K. pneumoniae* ATCC 33495 ve *S. aureus* ATCC 29213 10^7 dilüsyonlarından elde edilmiş DNA, negatif kontrol olarak bakteri katılmamış gönüllü kanı kullanılmıştır.

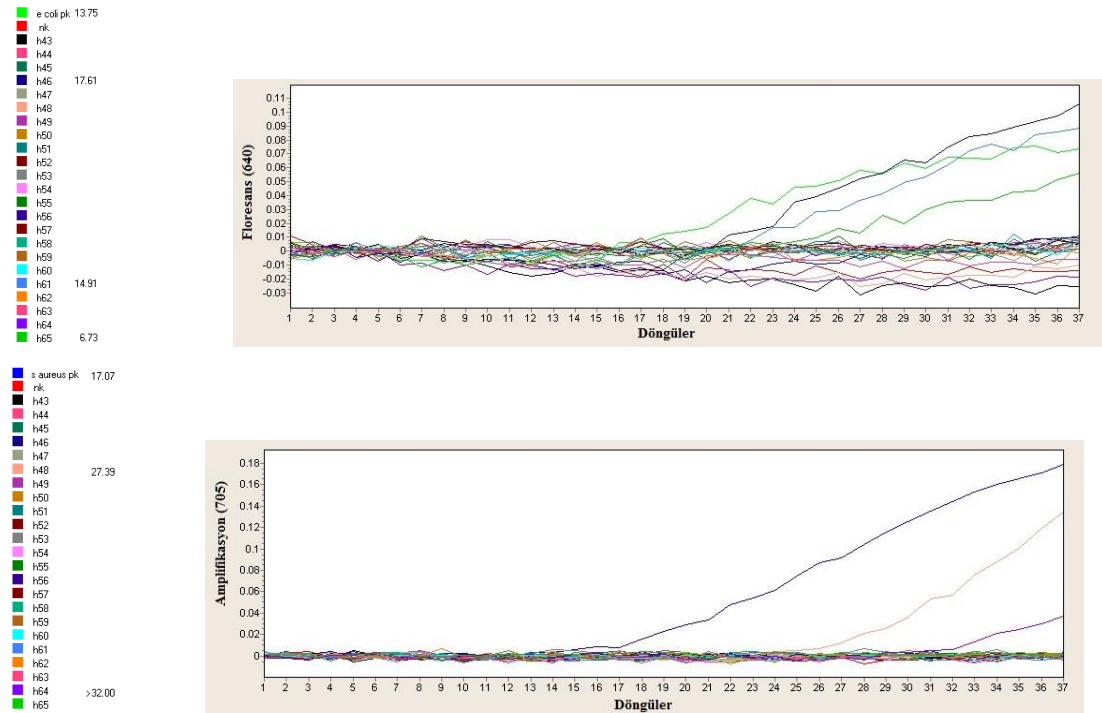
Şekil 4.14 1-18. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



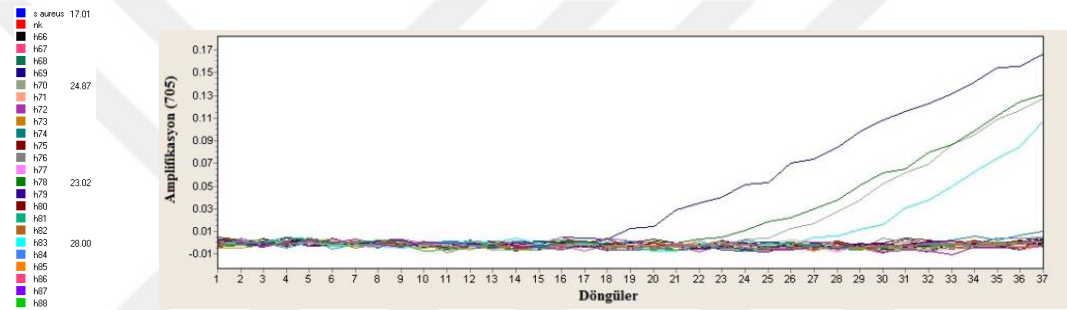
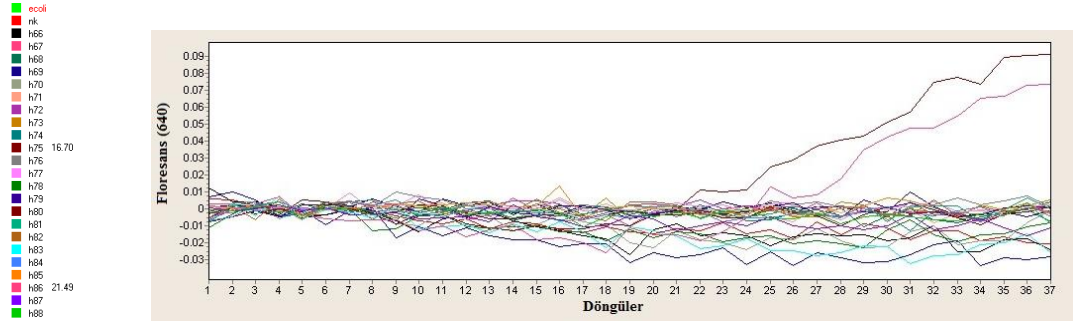
Şekil 4.15 19-42. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneklerin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



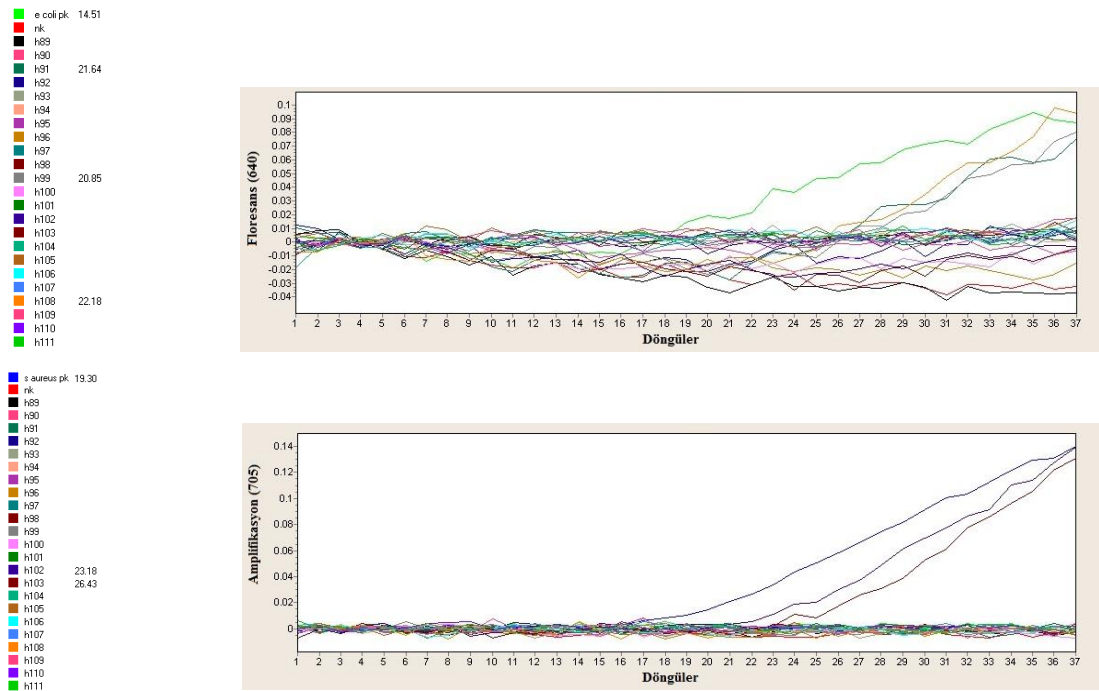
Şekil 4.16 43-65. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



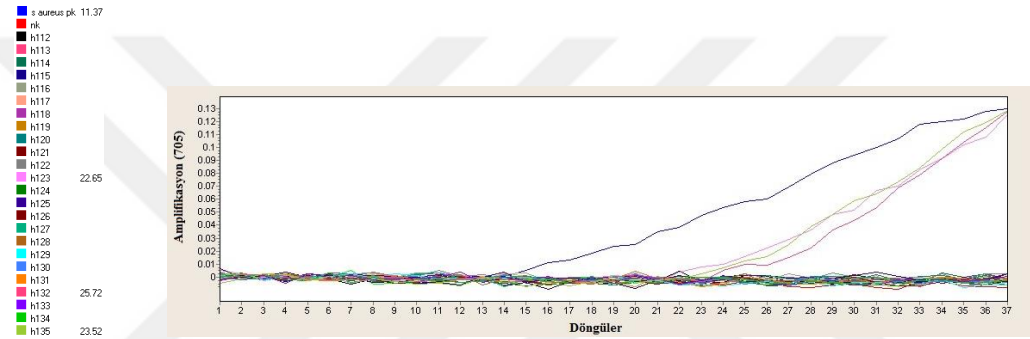
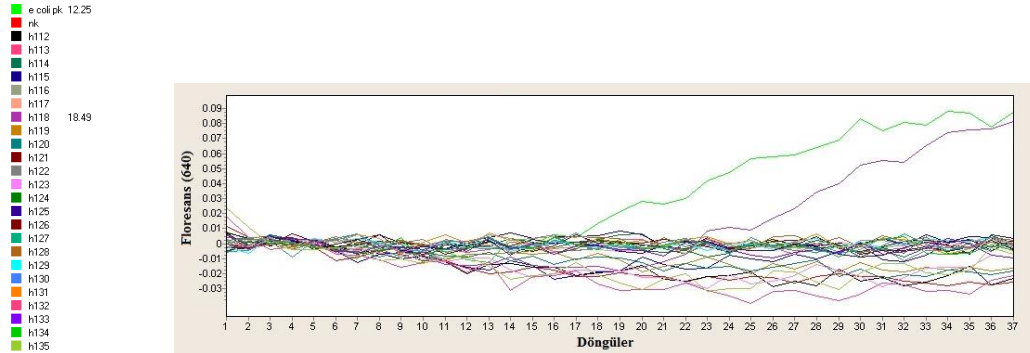
Şekil 4.17 66-88. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, Negatif kontrol bu örnekte çalışmamıştır)



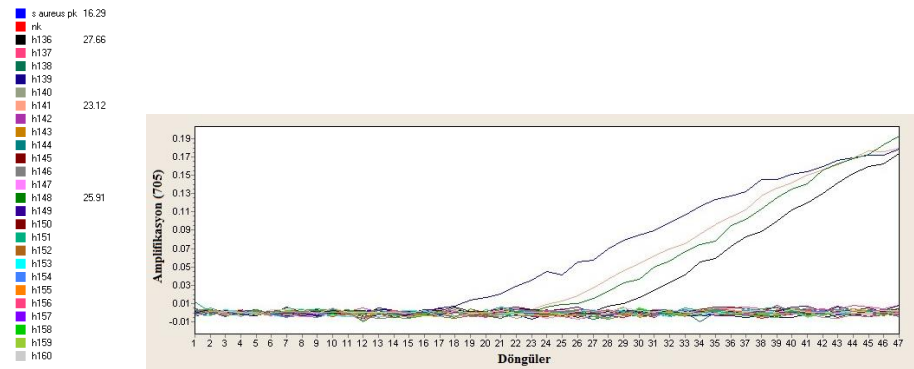
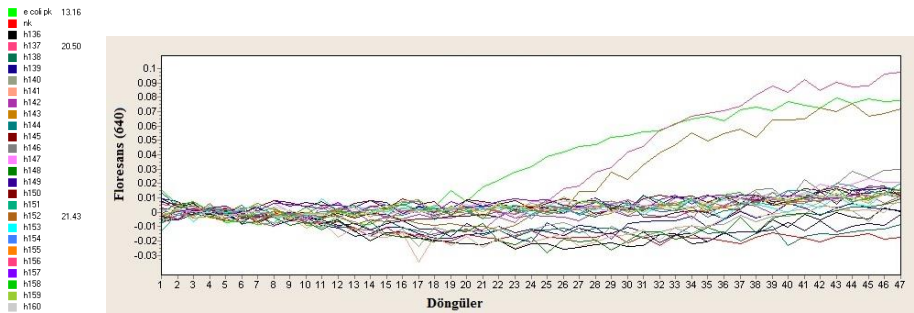
Şekil 4.18 89-111. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



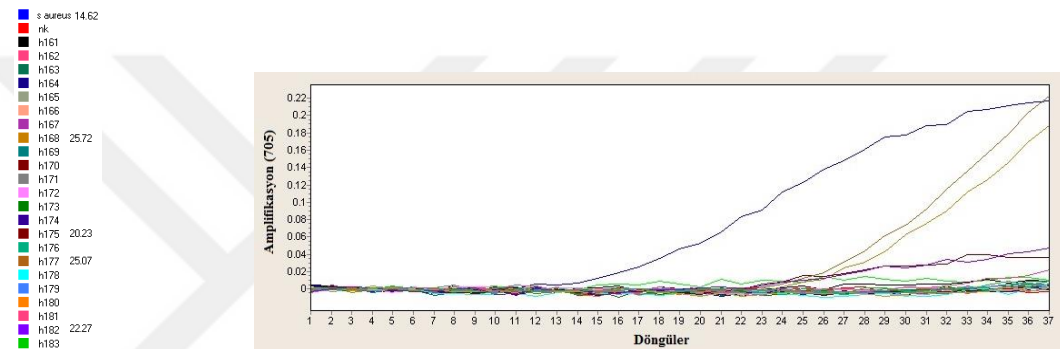
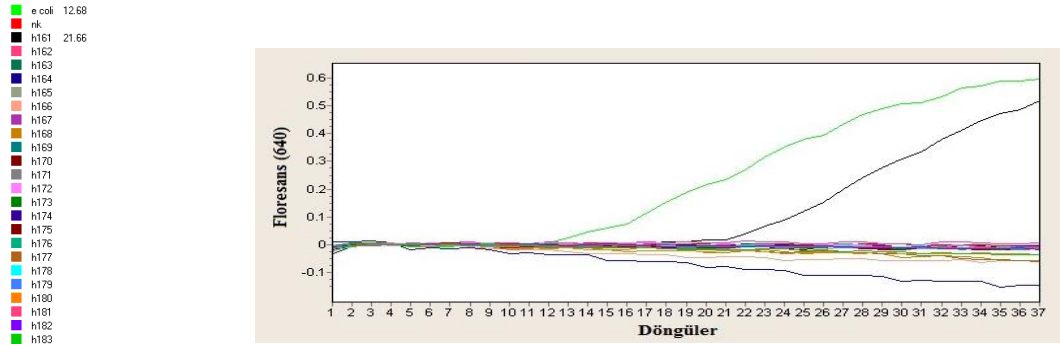
Şekil 4.19 112-135. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



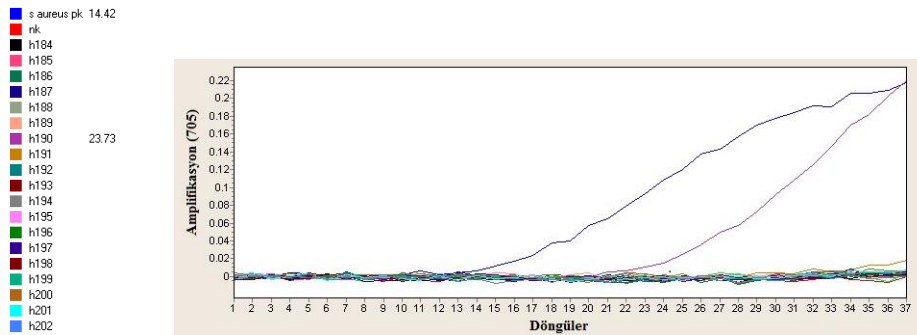
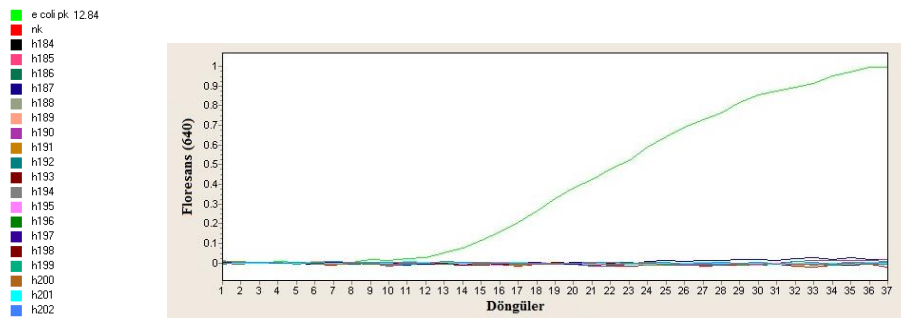
Şekil 4.20 136-160. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



Şekil 4.21 161-183. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



Şekil 4.22 184-202. hastalardan alınan kanların değerlendirilmesi. Ct değerleri örneğin yanında belirtilmiştir. (pk: Pozitif kontrol, nk: Negatif kontrol)



5. TARTIŞMA

Kan dolaşımı enfeksiyonları yüksek morbidite ve mortaliteyle ilişkilidir. Bakteriyemi tespitinde altın standart kan kültürüdür. Ancak, işlem süresi genellikle 3-15 gündür (ortalama: 4 gün) ve sadece %10-20'sinde pozitifliğe rastlanır. (119) Etken patojenlerin erken saptanması ve uygun antimikrobiyal uygulanması sağ kalım için önemli olduğundan, otomatize kan kültürü sisteminde sinyal pozitifleşmeden önce kanda mikroorganizma varlığının saptanması için çeşitli moleküler stratejiler uygulanmış ve hızlı, duyarlı ve özgül tekniklerin gelişmesi için yeni yöntemler önerilmiştir. (120, 121)

PCR bu amaçla kullanılabilecek en önemli moleküler araçlardan biri olup, klinik mikrobiyolojide kullanımı yeni bir çağ açmıştır. PCR' a dayalı teknikler arasında, Real-time PCR virolojide çok sık kullanılmaktadır ve son zamanlarda bakteriyolojide de giderek artan oranda kullanılmaya başlamıştır. (122)

Bakterilerin saptanması amacıyla 16S rRNA'nın amplifikasyonunu temel alan birçok protokol, farklı enfeksiyöz alanlardan alınan örneklerle uygulanmıştır. (123) Bu yöntemlerle doğrudan kan örneklerinden patojen tespitinde hızlı ve duyarlı bir saptama sağlanabildiği gösterilmiştir. (124) Tüm bu çalışmalar kan dolaşımı enfeksiyonu şüphesi olan hastalarda kanda bakteri varlığının PCR' a dayalı olarak tespitinin önemli bir klinik araç olabileceğini göstermiştir. (125)

Bu çalışmada yoğun bakımda tedavi gören erişkin hastalarda, yüksek ateş döneminde alınan kan örneklerinde bakteriyemi varlığı Real-time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Greisen ve arkadaşları tarafından tanımlanmış universal primerler, RW01 ve DG74, farklı bakteri grupları arasında yüksek oranda korunmuş olan 16s rRNA sekansını çoğaltmak için kullanılmıştır. (126) PCR ürünleri Wellighausen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan FRET prob dizileri kullanılarak multipleks Real-time PCR ile saptanmıştır. Kullanılan hibridizasyon problemleri, Gram-negatifler için LCRed 640 ve Gram-pozitifler için LCRed705 boylarıyla işaretlenmiş olup 640 ve 705 kanallarında verdiği sinyallerle saptanan bakterinin Gram özelliğini ayırıcı niteliktedir. (127) Çalışmada kullanılan universal primerler ve floresan hibridizasyon problemleri ile düşük miktarlarda DNA'nın hızlı tespiti ve doğru Gram sınıflaması sağlanmış olup, tüm bakteri türleri için tek bir protokolün

kullanılması kan örneklerini test etmek için hem zaman hem de maliyet avantajı sağlamıştır.

Real-time PCR, biyolojik sıvılardan bakteriyel DNA'nın tespit edilmesinde umut veren bir araçtır. Çalışmada, kan kültüründe üreme olan hastaların tamamında (duyarlılık % 100), kanda bakteri varlığının direkt tespiti için multipleks Real-time PCR yönteminin kullanılabileceğini gösterdik. Literatürde moleküler yöntemlerin duyarlılıklarının %41-100 arasında değiştiği bildirilmekle beraber, bu geniş duyarlılık aralığının nedeni kullanılan moleküler yöntemlerin birbirinden oldukça farklı olmasıdır. (128) Moleküler yöntemlerde gelişmeler çok hızlıdır ve çalışmamızda en güncel yöntemlerden biri olan FRET probları ile Real-time PCR yapılmıştır. Obara ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada 12 kan kültürü pozitif örneğin 11'inde (%92) multipleks Real-time PCR pozitif sonuç vermiştir. (129) Chen ve ark ise çocuklarda yaptıkları bir çalışmada 15 kültür pozitif hastanın tamamında (% 100) universal primerlerle Real-time PCR'da pozitiflik saptamıştır. Bulgularımız benzer yöntemler kullanan moleküler çalışmalarla uyumludur. (130)

Klinik şartlarda enfeksiyon tanısı için moleküler teknoloji kullanmanın temel amacı patojenlerin erken tespitidir. Çalışmanın en önemli avantajı, bu PCR tekniğiyle DNA hazırlanması (35 dk), Real-time PCR reaktiflerinin hazırlığı (15 dk), PCR ve verilerin analizini (50 dk) kapsayan toplam işlem süresinin, 2 ml tam kan örneğinin laboratuvara gelmesinden başlayarak 2 saatten az sürmesidir. Floresan hibridizasyon probları kullanarak uygulanan Real-time PCR, düşük miktardaki bakteriyel DNA'nın erken tespitini sağlayabilir ve bu sayede analitik duyarlılığı artırmak amacıyla testten önce kan kültürlerinin zaman harcayan inkübasyonuna ihtiyaç duyulmaz. Bu yaklaşım sepsis şüpheli hastalardan alınan kandaki mikroorganizmaların tespitini birkaç saat içinde sağlayan multipleks Real-time PCR sonuçlarına dayanarak ilk tedaviyi verecek klinisyenin hedefe yönelik uygun antimikrobiyal tedavi seçimini kolaylaştırarak klinik cevabı pozitif yönde etkileyebilir.

Bu çalışmada otomatize kan kültürü sistemiyle sinyalin pozitifleşmesine kadar ortalama inkübasyon süresi 19.48 saatti, Wellinghausen ve arkadaşları

tarafından yapılan çalışmada ise bu süre 19,2 saat idi. (131) PCR için ise örnek alımından itibaren DNA izolasyonu ve Real-time PCR testlerini yapmak için gerekli zaman göz önüne alındığında, otomatize kan kültür sisteminde sinyalin pozitifleşmesi ve PCR analizi sonucu arasında hala ortalama yaklaşık 17 saat zaman farkı vardır. Kumar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sepsisli hastaların prognozlarının antibiyotik tedavisinin erken verilmesiyle ciddi anlamda daha iyi hale geldiği, uygun olmayan antimikrobiyal tedavi hastane mortalitesinin bağımsız bir belirleyicisi olduğu ve septik şok varlığında etkili antibiyotiklerin verilmesinde her bir saatlik gecikme mortalite oranlarında ölçülebilir artışlara neden olduğu belirtilmektedir. (132)

Çalışmamızda değerlendirilen kan kültürü negatif hastaların sonuçları ise en erken beş günlük inkübasyon sonrasında klinisyene bildirildi. PCR ve geleneksel kan kültürü metotlarının sonuca kadarki zaman açısından direkt karşılaştırması ve tedavi için zaman kazanmanın detaylı analizi bu çalışmanın kapsamında değildir ancak çalışmamızda kullandığımız multipleks Real-time PCR ile klinisyene kanda bakteri olup olmadığı sonucu aynı gün içerisinde verilebilmektedir. Bu nedenle, negatif PCR sonuçlarının 24 saat içinde bildirilmesi ayırıcı tanıda klinisyeni sepsis dışı nedenlerin araştırılmasına yönlendirerek hasta yönetiminde daha etkili karar verilmesini sağlayabilir.

PCR tarafından saptanan patojenlerin tür tayininin yapılması çalışmamızın kapsamında değildir. Bunun amaçlandığı durumlarda amplikonların sekanslanması, hibridizasyon veya yeni ticari moleküler tanımlama yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Amplikon sekanslanması ile birlikte düşünüldüğünde amplikonların saflaştırması, hızlı sistemlerde sekanslama ve veri analizi için harcanan ek süre 3-4 saattir. Üremesi zor bakterilerin neden olduğu enfeksiyonu olan hastalarda veya kan örneklerinin sadece antimikrobiyal tedavi başladıktan sonra alınabildiği vakalarda ertesi gün elde edilen PCR sonuçlarının bile çok değerli olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. (133)

Çalışmamızda kullanılan yöntemle, saptanan bakteri sadece Gram özelliğine kadar tanımlanıyor olsa da kan kültürünün pozitifleştiği zaman diliminde de sadece Gram boyama karakteristiklerinin saptanması yapılabilmekte ve etken patojenin

tanımlanması için ek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kullandığımız moleküler saptama yönteminin hızla gelişmekte olan diğer moleküler tanımlama yöntemleri ile birleştirilmesi aynı gün içinde klinisyene tür tanımlaması hatta antibiyotik direnci hakkında bilgi verilmesini sağlayarak maliyet etkin bir şekilde hasta tedavisinin yönlendirilmesine katkıda bulunacaktır.

Bu çalışmada, Real-time PCR ile bakteriyemi saptama oranı klasik kan kültürüne göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla % 17,3 ve % 14,8) Sadece moleküler yöntem ile tespit edilen bakteriyeminin klinik uygunluğunun ne olduğu, PCR'la saptanan kandaki DNA'nın gerçek enfeksiyonu yansıtip yansıtmadığı, subklinik bakteriyel enfeksiyonu olan hastaları saptamanın klinik önemi olup olmadığı, kan kültürü ve DNA'ya dayalı testler arasında bir karşılaştırma yapmak için en iyi dizaynın ne olduğu soruları bağlamında bu sonuçların irdelenmesi gereklidir.

Çalışmamızda sadece ateşi yüksek olan erişkin hastalar değerlendirilmiş olup, beş hastada PCR pozitifken (üç hastada Gram pozitif sinyal, iki hastada Gram negatif sinyal) aynı anda yapılan kan kültüründe üreme yoktu. Sadece PCR tarafından bakteriyemi vakalarının tespit edildiği önceki yayınlarda kültürde üreme olmamasının olası nedenleri tartışılmış, kan örneklerinin antimikrobiyal tedavi başladıktan sonra alınması, üreme ortamının türü, örnek hacmi ve tekrarlayan kan kültürlerinin sayısının bakteriyeminin tespitinde kan kültürlerinin duyarlılığını etkilediği bildirilmiştir. (134) Kantitatif kan kültürü çalışmalarının sonuçlarına göre, erişkinlerde klinik olarak anlamlı çoğu bakteriyemi episodları esnasında dolaşımda düşük sayılarda bakteri bulunmaktadır. Werner ve arkadaşları stafilokoksik ve streptokoksik endokarditi olan erişkin hastalardan alınan kan kültürlerinin %54'ünde, her bir ml kanda 1 - 30 CFU bulunduğunu göstermiştir. (135)

Çalışmamızda 108 numaralı hastada Gram negatif prob ile DNA varlığı saptanması klinik olarak anlamlı görünmektedir çünkü bu hastada 24 saat sonra yapılmış olan kan kültüründe *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* üremesi olmuştur. Bu sonuç çok çarpıcı bir biçimde Real-time PCR analizi ile kan kültüründen önce kanda bakteri varlığının saptanabileceğini desteklemektedir.

Yirmi beş numaralı hasta ise aspirasyon pnömonisi ile takip edilmekte ve değerlendirildiğimiz örnek alındığında altı gündür meropenem ve kolistin tedavisi almaktaydı. Hastanın kan kültürü örneği alınmadan 17 gün önce, beş gün önce ve bir gün sonra alınan derin trakeal aspirasyon örneklerinde *A. baumannii* üremesi olduğu görülmüştür. Kan kültürü negatif- PCR pozitif bulunan bu hasta için bulgularımız kana enfeksiyon bölgesinden bakteri geçişi olduğunu akla getirmektedir. Moleküler raporları değerlendirirken akılda kalması gereken bir nokta, fagositik hücrelerin içinde bulunan ya da antimikrobiyaller tarafından inhibe edilen mikroorganizmaların dolaşımdaki DNA'larının tespitinin, enfeksiyondan sorumlu canlı mikroorganizma varlığı anlamına gelmediğidir. Curson ve arkadaşları belirttiği gibi multipleks universal Real-time PCR teorik olarak yaşamayan mikroorganizmaların serbest DNA'sı da dahil, kan örneklerindeki bakteriyolojik DNA'yı tespit edebildiğinden PCR'a dayalı metodlar kan kültüründen daha duyarlıdır. Pozitif PCR sonucu geçici bakteriyeminin ya da antimikrobiyal tedavinin tamamlanmasından bir kaç gün sonra dolaşımda hala tespit edilebilen DNA varlığının göstergesi olabilir. (136)

Bu çalışmada değerlendirilen FRET prob dizaynı Real-time PCR güvenilir olarak Gram pozitif ve negatif bakterileri ayırtmaktadır. Önceki çalışmalarla uyumlu bir şekilde, çalışmamız PCR sonuçlarıyla kan kültürünün sonuçlarının uyumlu olduğunu doğruladı. (137, 138). Bizim çalışmamızda literatürdeki bir çok çalışmanın aksine PCR negatif kültür pozitif örnek bulunmamasına rağmen bu çalışmalarda belirtilen nedenlere değinmek gereklidir. (in vivo düşük veya yüksek bakteriyemi, PCR engelleyici kan elemanları)

Örnek alınması esnasında in vivo düşük bakteriyeminin etkisini değerlendiren Kreger ve arkadaşları (139), Gram negatif bakteriyemili 77 hastanın %73'ünün kan kültürlerinin 10 CFU/ml'nin altında içerdiğini tanımladı. Başka bir çalışmada ise tespit edilme sınırları Gram negatif bakteriler için 110-460 CFU/ml Gram pozitif bakteriler için 20-40 CFU/ml bulunmuştur. Yaklaşık 10 ml'lik tam kanın inokülasyonundan sonra uygulanan klasik kan kültürünün 1 CFU/ kültür şişesi teorik duyarlılığı ile karşılaştırıldığında, bakteri yükü az olan bakteriyemili hastalar için moleküler yöntemlerin tanısal değeri kısıtlanmaktadır. Lehmann klinik örneklerde ve düşük miktarda bakteriyel DNA'da önemli bakteri yüklerini ayırt etmede sınır

değerlerini saptamanın önemini raporlamıştır.(140) Öte yandan yüksek bakteriyel DNA konsantrasyonunun da moleküler saptamayı inhibe edebildiğine dair yayınlar bulunmaktadır.(141)

İnsan kan örneğinin moleküler analizinde diğer sorun insan arka plan DNA'larının primerlerle ve problarla çapraz reaksiyona girmesi ve PCR reaksiyonlarını inhibe etmesi olarak gösterilmiştir. (142) Bir çalışmada beyaz hücre sayısı 30.000/milimetreküp'ün üzerinde iken PCR'ın inhibisyonu olduğu ve bu durumun muhtemelen düşük düzeydeki bakteri DNA'sı ile yüksek düzeydeki insan DNA'sı arasındaki yarışmadan kaynaklandığı bildirilmiştir. (143)

Bu çalışmada sepsisli hastalarda en sık rastlanan 13 bakterinin seri dilüsyonları hazırlanarak sağlıklı gönüllülerden alınmış kan örneklerine eklenmiş ve saptama sınırları Gram pozitifler için 40-610 CFU/ml ve Gram negatifler için 90-320 CFU/ml olarak tespit edilmiştir. Nadkarni ve arkadaşları *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* DNA'larını kullanarak yaptığı ölçümlerde bu türlerin kromozomlarındaki 16S rRNA operonlarının kopya sayılarının farklı olmasından ötürü saptama sınırlarının farklı olduğunu belirtti. (144) Horz ve arkadaşları benzer şekilde Gram pozitiflerin Gram negatiflerden daha duyarlı bir şekilde tespit edildiğini gözledi. (145) Bulgularımız literatürdeki çalışmalarla uyumlu olsa da, gözlenen tespit sınırlarındaki farkın nedeni ne olursa olsun, kullanılan sistemdeki saptama sınırları bakteriyemi tanısını koymada yeterli olup olmadığı açık değildir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmaların çoğu prospektif ve gözlemsel bir dizayna sahip olup literatürde moleküler testlerle elde edilen sonuçlarının klinik tedaviyi yönlendirmesi bakımından yapılmış çalışmaların sayısı çok azdır.

Kan kültürü yeni moleküler tekniklerin istatistiksel değerlendirmesi için altın standart olarak kullanılmaktadır ancak kan kültürünün kontaminasyonuna bağlı pozitif veya güç üreyen/üremeyen mikroorganizmalara bağlı negatif sonuçlar, PCR sonuçlarının doğru değerlendirmesinde bir kısıtlama ortaya koymaktadır. (146) Karahan ve arkadaşları otomatik sistemlerle tespit edilen yanlış pozitif kan kültürü şişelerindeki mikrobiyal DNA'nın değerlendirilmesini önermiştir.(147) Peters ve Nakamura ise Real-time PCR değerlendirmesinin sadece kan kültürü ile değil aynı zamanda hastaların diğer mikrobiyolojik kültürleriyle ve klinik verileriyle de uyumlu olmasını tavsiye etmiştir. (148)

Kan kültürü için kullanılan kan hacminin patojenlerin üreme oranını etkilediği iyi bilinmektedir ve kan kültürü için tercih edilen kan hacmi en az 10 ml'dir. (149) Kültür için gönderilmiş olan kanların hacmi çalışmamızda değerlendirilmemiş olsa da uzun süre hastanede yatan hastalarda yüksek hacimde kan almanın zorluğu klinisyenler açısından bir gerçektir. Kan kültürü için gerekli olan kan hacmiyle karşılaştırıldığında multipleks Real-time PCR tek sayıda ve az miktarda kan örneği kullanarak mikroorganizmaları tespit edebilmesi yöntemin önemli avantajlarından biridir.

Çalışmamızda, hastaların kanında Real-time PCR tarafından mikrobiyal DNA'nın tespiti klinik verilere, mikrobiyolojik ve radyolojik araştırmalara göre hastaların çoğunluğunda kanıtlanmış ya da muhtemel enfeksiyonlarla ilişkilidi. Çalışmamızda PCR pozitif, kültür negatif beş örneğin üçünde saptanan DNA'nın anlamlılığı kesin sağlanamamıştır. Her ne kadar farklı PCR-güvenlik kabinlerinde ve farklı odalarda çalışma adımları yapılsa da, örneklerin kontaminasyonu tamamen dışlanamaz. PCR reaksiyonunun duyarlılığının bir örnekte düşük sayılarda mikroorganizmayı tespit edebilecek kadar yüksek olması gereklidir. Kan alımı sırasında örneğin çevresel veya normal flora mikroorganizmalarıyla kontaminasyonu ya da PCR malzemelerinin kontamine olması özgül olmayan sinyallere neden olarak bakteri tespitinin özgüllüğünü azaltmakta ve yanlış-pozitif sonuçlar bulunmasına neden olmaktadır. (150) Bu çalışmada özgül olmayan sinyallerden kaçınmak ve analitik duyarlılığı artırmak için yüksek kaliteli, DNA kontaminasyonu olmayan, bilimsel literatürde son zamanlarda tartışılmış olan önerilere uygun ekstraksiyon kitleri ve PCR malzemeleri kullanılmıştır.

Kontaminasyon olasılığı otomatik Real-time PCR gibi teknik gelişmelerden sonra anlamlı bir şekilde azaltılmış olsa da çalışmaların toplu bir şekilde tek seferde yapılması, laboratuvar ortamında kontaminasyondan kaçınmak için gerekli tüm önlemlere uyulması, çalışma esnasında kıyafet değiştirilmesi, laboratuvar yüzeyleri ve uygulayanların sıklıkla dekontamine edilmesi önerilmektedir. (151) Çalışmamızda bu önlemlerin tamamına dikkat edilmiş olmakla beraber, yüksek

derecedeki önlemlere rağmen yöntemin laboratuvarda uygulaması zahmetli olmamıştır.

Güncel moleküler metotların önemli bir yetersizliği antibiyotiklere olan duyarlılığın henüz test edilememesidir. Metisiline direnci gösteren *mecA*, 3. kuşak sefalosporinlere direnci gösteren *bla*, florokinolonlara direnci gösteren mutasyona uğramış *gyr A/B* gibi pek çok antibiyotiğe direnci gösteren genleri tespit eden yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen; antibiyotikleri yıkan enzimlerin üretilmesi, bakterideki antibiyotiklerin bağlandığı aktif bölgelerin ve ilaç atım pompalarının değiştirilmesi gibi pek çok ilaç direnç mekanizması henüz moleküler olarak tespit edilmekten uzaktır. (152) Bu nedenle geleneksel kan kültürü yöntemi patojenlerin antimikrobiyallere duyarlılığını saptamak açısından hala gereklidir.

Real-time PCR yaklaşımıyla etken bakterinin saptanmasının, kan kültürüne kıyasla daha fazla iş gücü istediği ve daha pahalı olduğu unutulmamalıdır. Bir hasta örneğinden DNA ekstraksiyonu ve PCR için örnek başına sarf ve reaktif masrafları oldukça yüksektir. Ancak, yavaş veya zor üreyen patojenlerle enfeksiyondan şüphelenilen hastalarda ve patojenin hızlı saptanmasını amaçlayan ciddi klinik durumları olan hastalarda moleküler yöntemler önemli bir destek tanı aracı olabilmektedir. Çalışmamızda finansal analiz yapılmamış olsa da uygun olmayan antimikrobiyal tedaviden kaçınılıyor olması ve morbiditenin azalıyor olması ile reel bir faydadan bahsedilebilir. Ayrıca, moleküler yöntemlerin kullanımı yaygınlaştıkça yüksek maliyetlerin anlamlı bir şekilde düşmesinin kaçınılmaz olduğu gerçektir.

6. SONUÇLAR

1. Bakteriyel 16S rDNA'nın korunmuş bir bölgesi universal primerlerle çoğaltılmış olup Gram ayırıcı FRET prob dizileri kullanılarak multipleks Real-time PCR ile saptanmıştır.
2. Kan kültüründe üreme olan hastaların tamamında (duyarlılık % 100) kanda bakteri varlığı saptanmıştır. Toplam işlem süresi, 2 ml tam kan örneğinin laboratuvara gelmesinden başlayarak iki saatten az sürmüştür. Bu süre sonunda bakteri DNA'sı bulunan örnekte Gram özelliği belirlenmiştir.
3. Real-time PCR ile bakteriyemi saptama oranı klasik kan kültürüne göre daha yüksek bulunmuştur. Sadece moleküler yöntem ile tespit edilen bakteriyeminin klinik uygunluğunun değerlendirilebilmesi için daha büyük, çok merkezli, randomize kontrollü bir çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
4. Günümüzde kanda mikroorganizma varlığını saptayan ve tanımlayan birçok ticari sistem geliştirilmiştir. Bu sistemlerin en büyük avantajı hızlı olmalarıdır ancak maliyetleri oldukça yüksektir. Kan dolaşımı enfeksiyonlarında klinik tipik olmadığından, şüpheli her hasta için bu moleküler tekniklerin kullanılması maliyet-etkinlik açısından kabul edilebilir değildir. Ucuz ve etkili bir moleküler tarama yöntemi ile kombine edildiği takdirde yeni geliştirilen ticari sistemler özel bir hasta grubuna uygulanabilecek olup büyük bir maliyetin önüne geçilebilecektir. Çalışmamızın bulguları bu amaca hizmet eder nitelikte görünmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Kollef, M. H., G. Sherman, S. Ward, and V. J. Fraser. 1999. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 115:462–474.
2. Washington JA II, Ilstrup DM: Blood cultures: issues and controversies. *Rev Infect Dis* 1986, 8:792–802.
3. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 584-602.
4. Wallet, F., S. Nseir, L. Baumann, S. Herwegh, B. Sendid, M. Boulo, M. Roussel-Delvallez, A. V. Durocher, and R. J. Courcol. 18 August 2009. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin. Microbiol. Infect.*
5. Wellingshausen N, Wirths B, Franz AR, Karolyi L, Marre R, Reischl U. Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;48:229–416.
6. Boucher HW. Challenges in anti-infective development in the era of bad bugs, no drugs: a regulatory perspective using the example of blood stream infection as an indication. *Clin Infect Dis* 2010;50(Suppl. 1): S4–9.
7. Lehmann LE, Hunfeld KP, Steinbrucker M et al (2010) Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med* 36(1):49–56.
8. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH (2000) The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 118:146–155.
9. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective

- comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 584-602.
10. Leibovici L, Shraga I, Drucker M et al. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 1998; 244: 379-86.
 11. Loeb, M., D. W. Bentley, S. Bradley, K. Crossley, R. Garibaldi, N. Gantz, A. McGeer, J. Mylotte, L. E. Nicolle, B. Nurse, S. Paton, A. E. Simor, P. Smith, and L. Strausbaugh. 2001. Development of minimum criteria for the initiation of antibiotics in residents of long-term-care facilities: results of a consensus conference. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 22:120–124.
 12. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med* 2003;31: 2742-51.
 13. Harbarth S, Garbino J, Pugin J et al. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* 2003; 115: 529-35.
 14. Bochud PY, Glauser MP, Calandra T. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27(Suppl. 1):S33–48.
 15. Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *Bmj* 2007; 335: 879-83.
 16. Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 2000;31(Suppl 4):S131–8.
 17. Pittet D, Tarara D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 1994;271:1598–601.
 18. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costignan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) A prospective study. *JAMA* 1995;273:117-23.
 19. Zinner, S. H. 2007. Antibiotic use: present and future. *New Microbiol.* 30:321–325.

20. Fridkin, S. K., J. R. Edwards, F. C. Tenover, R. P. Gaynes, and J. E. McGowan, Jr. 2001. Antimicrobial resistance prevalence rates in hospital antibiograms reflect prevalence rates among pathogens associated with hospital-acquired infections. *Clin. Infect. Dis.* 33:324–330.
21. Libman E. Weitere Mitteilungen über die Streptokokken-Enteritis bei Säuglingen. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 1897;22:376–82
22. Libman E. On some experiences with blood cultures in the study of bacterial infections. *Johns Hopkins Hosp Bull* 1906;17: 215–8.
23. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ; ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest*. 2009 Nov;136(5 Suppl):e28.
24. Paolucci M1, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Dec;36 Suppl 2:S6-16.
25. Boucher HW. Challenges in anti-infective development in the era of bad bugs, no drugs: a regulatory perspective using the example of blood stream infection as an indication. *Clin Infect Dis* 2010;50(Suppl. 1): S4–9.
26. Guidance for industry: catheter-related bloodstream infections—developing antimicrobial drugs for treatment. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 1999.
27. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 444-65.
28. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-6.

29. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-10.
30. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001; 29: S109-16.
31. Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL: Deaths: final data for 2005. *Natl Vital Stat Rep* 2008, 56(10):1–120.
32. Warren DK, Zack JE, Elward AM, Cox MJ, Fraser VJ. Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study. *Clin Infect Dis* 2001;33:1329–35.
33. Collin BA, Leather HL, Wingard JR, Ramphal R. Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin Infect Dis* 2001;33:947–53.
34. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980;68:332–43.
35. Nobre V, Sarasin FP, Pugin J. Prompt antibiotic administration and goal-directed hemodynamic support in patients with severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2007; 13: 586-91.
36. Wisplinghoff HOURS, Bischoff T, Tallent SM et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17.
37. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK et al. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 239-44.
38. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN: Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the sentry antimicrobial surveillance program (1997-2002) *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004, 50:59–69.

39. Weinstein MP, Murphy JR, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* 1983;5: 54–70.
40. Peters, R. P., M. A. van Agtmael, S. A. Danner, P. H. Savelkoul, and C. M. Vandenbroucke-Grauls. 2004. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect. Dis.* 4:751–760
41. Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. CLSI Document M47-A (ISBN 1-56238-641-7): Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898, USA, 2007.
42. Cockerill FR, 3rd, Wilson JW, Vetter EA et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1724-30.
43. Beekmann, S. E., D. J. Diekema, K. C. Chapin, and G. V. Doern. 2003. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J. Clin. Microbiol.* 41:3119–3125.
44. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2000;38:781–8.
45. Riedel S, Carroll KC. Blood cultures: key elements for best practices and future directions. *J Infect Chemother* 2010;16:301–16.
46. Tenney JH, Reller LB, Mirrett S et al. Controlled evaluation of the volume of blood cultured in detection of bacteremia and fungemia. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 558-61.
47. Vigano EF, Vasconi E, Agrappi C et al. Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 235-40.
48. Glerant JC, Hellmuth D, Schmit JL et al. Utility of blood cultures in community-acquired pneumonia requiring hospitalization: influence of antibiotic treatment before admission. *Respir Med* 1999; 93: 208-12.

49. Sautter RL, Bills AR, Lang DL et al. Effects of delayed-entry conditions on the recovery and detection of microorganisms from BacT/ALERT and BACTEC blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1245-9.
50. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 788-802.
51. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N et al. The era of molecular and other non-culture based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 235-51.
52. Dorn GL, Burson GG, Haynes JR. Blood culture technique based on centrifugation: clinical evaluation. *J Clin Microbiol* 1976;3:258–63.
53. Kennaugh JK, Gregory WW, Powell KR, Hendley JO. The effect of dilution during culture on detection of low concentrations of bacteria in blood. *Pediatr Infect Dis* 1984;3:317–18.
54. Lauer BA. Pediatric blood cultures. *Clin Lab Med* 1994;14: 17–30.
55. Kellogg JA, Manzella JP, Bankert DA. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2181–5.
56. Hall MM, Ilstrup DM, Washington JA, 2nd. Effect of volume of blood cultured on detection of bacteremia. *J Clin Microbiol* 1976; 3: 643-5.
57. Grace CJ, Lieberman J, Pierce K et al. Usefulness of blood culture for hospitalized patients who are receiving antibiotic therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1651-5.
58. Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome) *JAMA*. 1992;268: 3452–5. 10012.
59. Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Dickinson G, Ackroyd-Stolarz S. The contribution of blood cultures to the clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia: a prospective observational study. *Chest* 2003;123:1142–50.
60. Fenollar F,. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30 Suppl 1: S7-15.

61. Prendergast BD. The changing face of infective endocarditis. *Heart* 2006; 92: 879-85.
62. Bryan CS, Reynolds KL, Brenner ER. Analysis of 1186 episodes of Gramnegative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev Infect Dis* 1983;5:629–38.
63. Kollef MH, Fraser VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med* 2001;134:298–314.
64. Serody JS, Berrey MM, Albritton K et al. Utility of obtaining blood cultures in febrile neutropenic patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 533-8.
65. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:269–79.
66. Peterson LR, Dalhoff A. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be specific, directed therapy through improved diagnostic testing? *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:902–5.
67. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008;36:1487-92.
68. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475-86; quiz 87-8.
69. Kane TD, Alexander JW, Johannigman JA (1998) The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. *Ann Surg* 227:1–9.
70. Cursons RT, Jeyerajah E, Sleigh JW (1999) The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit Care Med* 27:937–940.
71. Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC (2000) Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 38:2076–2080.

72. Mariani BD, Martin DS, Levine MJ, Booth REJ, Tuan RS (1996) The coventry award. Polymerase chain reaction detection of bacterial infection in total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 331:11–22.
73. Poppert S, Essig A, Stoeck B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S, Reischl U, Wellinghausen N (2005) Rapid diagnosis of meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 43:3390–3397.
74. Ruppenthal RD, de Souza Pereira F, Cantarelli VV, Schrank IS (2005) Application of broad-range bacterial PCR amplification and direct sequencing on the diagnosis of neonatal sepsis. *Braz J Microbiol* 36: 29–35.
75. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
76. Fredricks DN. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475-86; quiz 87-8.
77. Bankowski M. J. ASM. Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Clin Microbiol Newsl* 2004; 26: 9-15.
78. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212.
79. Uhl JR, Cockerill III F. R. The fluorescence resonance energy transfer system. *Molecular Microbiology*, 2004; 295-306.
80. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 165-256.
81. Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M (1997) Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 35:2733–2739.
82. Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. *J Infect Dis* 1993;168:1–8.
83. Engleberg NC, Eisenstein BI. Detection of microbial nucleic acids for diagnostic purposes. *Annu Rev Med* 1992;43:147–55.

84. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001;6:313–21.
85. Kiratisin P, Li L, Murray PR et al. Identification of bacteria recovered from clinical specimens by 16S rRNA gene sequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 628-31.
86. Jordan JA, Durso MB (2000) Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 38:2574–2578.
87. Gray MW, Sankoff D, Cedergren RJ. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 5837-52.
88. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 840-62.
89. Klouche, M., and U. Schroder. 2008. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46:888–908.
90. Shang, S., G. Chen, Y. Wu, L. Du, and Z. Zhao. 2005. Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA gene. *Pediatr. Res.* 58:143–148.
91. Bosshard, P. P., R. Zbinden, S. Abels, B. Boddingtonhaus, M. Altwegg, and E. C. Bottger. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gramnegative bacteria in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44:1359–1366.
92. Mothershed, E.A., Whitney, A.M., 2006. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin. Chim. Acta* 363, 206–220.
93. Barken KB, Haagensen JA, Tolker T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clin Chim Acta* 2007; 384: 1-11.

94. Handschur M, Karlic HOURS, Hertel C et al. Preanalytic removal of human DNA eliminates false signals in general 16S rRNA PCR monitoring of bacterial pathogens in blood. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 32: 207-19.
95. Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P et al. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 133-46.
96. Muhl HOURS, Kochem AJ, Disque C et al. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rRNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66: 41-9.
97. Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4217.
98. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2810-6.
99. Tan TY, Corden S, Barnes R et al. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4529-31.
100. Selva L, Esteva C, Gene A et al. Direct detection of *Streptococcus pneumoniae* in positive blood cultures by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66: 204-6.
101. Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 345-50.
102. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:596–601.
103. Wheeler J, Murphy OM, Freeman R, Kearns AM, Steward M, Lee MJ. PCR can add to detection of pneumococcal disease in pneumonic patients receiving antibiotics at admission. *J Clin Microbiol* 2000;38:3907.

104. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, et al. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:3293–8.
105. Smith TF, Uhl JR, Espy MJ et al. Development, implementation, and trend analysis of real-time PCR tests for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Newsl* 2004; 26: 145-54.
106. Westh H, Lisby G, Breysse F, Bøddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:544-51.
107. Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC (2000) Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 38:2076–2080.
108. Rothman R, Ramachandran P, Yang S et al. Use of quantitative broad-based polymerase chain reaction for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Acad Emerg Med* 2010; 17: 741-7.
109. Navarro E, Segura JC, Castano MJ et al. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1266-73.
110. Heininger A, Binder M, Ellinger A, Botzenhart K, Unertl K, Döring G (2003) DNase pretreatment of master mix reagents improves the validity of universal 16S rRNA gene PCR results. *J Clin Microbiol* 41:1763–1765.
111. Evans GE, Murdoch DR, Anderson TP et al. Contamination of Qiagen DNA extraction kits with *Legionella* DNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3452-3.
112. Goto M, Ando S, Hachisuka Y, Yoneyama T (2005) Contamination of diverse *nifH* and *nifH*-like DNA into commercial PCR primers. *FEMS Microbiol Lett* 246:33–38.

113. Yamamoto Y (2002) PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diag Lab Immunol* 9:508–514.
114. Al-Soud, W.A., Ouis, I.S., Li, D.Q., Ljungh, S., Wadstrom, T., 2005. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44, 177–182.
115. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485-93.
116. Wolffs, P., Grage, H., Hagberg, O., Radstrom, P., 2004. Impact of DNA polymerases and their buffer systems on quantitative real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 408–411.
117. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ (2000) Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 38:1747–1752.
118. Millar BC, Xu J, Moore JE (2007) Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol* 9:21–40.
119. Roh KH, Kim JY, Kim HN, Lee HJ, Sohn JW, Kim MJ, Cho Y, Kim YK, Lee CK. Evaluation of BACTEC Plus aerobic and anaerobic blood culture bottles and BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia in ICU patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Jul;73(3):239-42
120. Yadav, A.K., Wilson, C.G., Prasad, P.L., Menon, P.K., 2005. Polymerase chain reaction in rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian Pediatr.* 42, 681–685.
121. Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 2009;394:731–42.
122. Fournier PE1, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Aug;11(8):574-85.

123. Wu YD, Chen LH, Shang SQ, Lou JT, Du LZ, Zhao ZY: Gram stain specific probe based real-time PCR for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin Microbiol* 2008, 46(8):2613–2619.
124. Ohlin A, Bäckman A, Björkqvist M, Mölling P, Jurstrand M, Schollin J: Realtime PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal bacteraemia. *Acta Paediatr* 2008, 97(10):1376–1380.
125. Lodes, Uwe, et al. "PCR-based rapid sepsis diagnosis effectively guides clinical treatment in patients with new onset of SIRS." *Langenbeck's Archives of Surgery* 397.3 (2012): 447-455.
126. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D (1994) PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 32:335–351.
127. Gebert S, Siegel D, Wellinghausen N. Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MoLYsis. *J Infect.* 2008 Oct;57(4):307-16.
128. Pammi M, Flores A, Leeftang M, Versalovic J. Molecular assays in the diagnosis of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics.* 2011 Oct;128(4):e973-85..
129. Obara H, Aikawa N, Hasegawa N, Hori S, Ikeda Y, Kobayashi Y, Murata M, Okamoto S, Takeda J, Tanabe M, Sakakura Y, Ginba H, Kitajima M, Kitagawa Y. The role of a real-time PCR technology for rapid detection and identification of bacterial and fungal pathogens in whole-blood samples. *J Infect Chemother.* 2011 Jun;17(3):327-33.
130. Chen LH, Duan QJ, Cai MT, Wu YD, Shang SQ. Rapid diagnosis of sepsis and bacterial meningitis in children with real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction amplification in the bacterial 16S rRNA gene. *Clin Pediatr (Phila).* 2009 Jul;48(6):641-7.
131. A Wellinghausen N1, Kochem AJ, Disqué C, Mühl H, Gebert S, Winter J, Matten J, Sakka SG. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 2009 Sep;47(9):2759-65.

132. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34:1589–96.
133. Akiyama N, Mitani K, Tanaka Y, Hanazono Y, Motoi N, Zarkovic M, et al. Fulminant septicemic syndrome of *Bacillus cereus* in a leukemic patient. *Intern Med* 1997;36:221–6.
134. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med.* 2008;36:1487–92.
135. Werner AS, Cobbs CG, Kaye D, Hook EW (1967) Studies on the bacteremia of bacterial endocarditis. *JAMA* 202(3):199–203.
136. Cursons RT, Jeyerajah E, Sleigh JW. The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit Care Med.* 1999;27:937–40.
137. Lehmann LE, Hunfeld KP, Steinbrucker M et al (2010) Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med* 36(1):49–56.
138. Casalta JP, Gouriet F, Roux V et al (2009) Evaluation of the LightCycler® SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28 (6):569–573.
139. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR (1980) Gramnegative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 68(3):332–343.
140. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stuber F: A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008, 197:313–324 .
141. Lamothe F, Jaton K, Prod'homme G, Senn L, Bille J, Calandra T, Marchetti O: Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2010, 48(10):3510–3516.

142. Cogswell FB, Bantar CE, Hughes TG, Gu Y, Philipp MT. Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34(4):980e2.
143. Jordan JA, Durso MB. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* 2005; 7: 575–581.
144. JNadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148:257–266.
145. Horz HP, Scheer S, Huenger F, Vianna ME, Conrads G (2008) Selective isolation of bacterial DNA from human clinical specimens. *J Microbiol Methods* 72:98–102.
146. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N et al (2009) Molecular diagnosis of polymicrobial sepsis. *J Clin Microbiol* 47:1274–1275.
147. Karahan ZC, Mumcuoglu I, Guriz H, Tamer D, Balaban N, Aysev D, Akar N: PCR evaluation of false-positive signals from two automated bloodculture systems. *J Med Microbiol* 2006, 55:53–57.
148. Nakamura A, Sugimoto Y, Ohishi K et al. Diagnostic value of PCR analysis of bacteria and fungi from blood in empiric-therapy-resistant febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2030-6.
149. Mermel LA, Maki DG. Detection of bacteremia in adults: consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann Intern Med.* 1993;119:270–2.
150. van der Zee A, Peeters M, de Jong C et al. Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for legionella PCR are not suitable for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1126.
151. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Hoeft A, Stuber F (2002) Comparison of different decontamination methods for reagents to detect low concentrations of bacterial 16S DNA by real-time-PCR. *Mol Biotechnol* 22(3):231–242.
152. Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol* 2008;153(Suppl 1):S406–13.