T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

SEPSİS SENDROMİK PANELLERİ İLE KAN KÜLTÜRÜNDE HIZLI TANIMLAMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Gülen Hürkal Yiğitler

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2022

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

SEPSİS SENDROMİK PANELLERİ İLE KAN KÜLTÜRÜNDE HIZLI TANIMLAMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Gülen Hürkal Yiğitler

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Banu Bayraktar

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince kıymetli bilgi birikimi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren, yardımlarıyla destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Banu Bayraktar'a,

Bilgi ve tecrübelerini paylaşarak uzmanlık eğitimimde emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Elif Aktaş'a,

Tüm uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmamın her aşamasında emeğini ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Murat Öcal'a,

Uzmanlık eğitimim süresince sağladıkları katkılardan dolayı Doç. Dr. Emin Bulut, Doç Dr. Ayşe Barış ve Uzm. Dr. Süleyman Pelit'e,

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım değerli asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışma ekibine,

Hayatımın her döneminde sevgilerini ve sonsuz desteklerini hissettiğim kıymetli aileme ve daima yanımda olan ve beni destekleyen sevgili eşim Yiğit Yiğitler'e çok teşekkür ederim.

Dr. Gülen Hürkal Yiğitler

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **İ**

İÇİNDEKİLER ..... **İİ**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **V**

TABLOLAR ..... **Vİ**

ŞEKİLLER ..... **Vİİ**

ÖZET ..... **Vİİİ**

ABSTRACT ..... **X**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları **3**

2.2. Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarında Sık Görülen Mikroorganizmalar **3**

2.2.1. Kateter ile İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonları 3

2.2.2. Üriner Sistem Enfeksiyonları 4

2.2.3. Alt Solunum Yolu Enfeksiyonları 4

2.2.4. İntraabdominal Enfeksiyonlar 5

2.2.5. Deri Enfeksiyonları 5

2.2.6. Enfektif Endokardit 5

2.2.6.1. Doğal Kapak Endokarditi 5

2.2.6.2. Protez Kapak Endokarditi 5

2.3. Standart Kan Kültürü Laboratuvar Yöntemi **6**

2.3.1 Set Kavramı ve Örneklerin Alınması - Preanalitik Süreç 6

2.3.2 Kan Kültürü İnkübasyon Yöntemleri 7

2.3.2.1 Kan Kültürünün Manuel Sistemler ile İnkübasyonu 7

2.3.2.2 Kan Kültürü Şişelerinin Otomatize Sistemler ile İnkübasyonu 8
2.3.3. Pozitif Kan Kültürü Şişelerinin Analizi 9
2.3.3.1. Gram Boyama ve Katı Besiyeri Ekimleri 9
2.3.3.2. Bakteri Tanımlama Yöntemleri 9
2.3.3.2.1. Konvansiyonel Yöntemler 9
2.3.3.2.2. Otomatize Sistemler 10
2.3.3.2.3. Kütle Spektrofotometrisine Dayalı Yöntemler 10
2. 4. Kan Kültüründe Moleküler Yöntemler 10
2.4.1. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 11
2.4.2. DNA Mikro Dizileme ve Peptit Nükleik Asit Floresan İn Situ Hibridizasyonu (PNA FISH) 13
3. GEREÇ VE YÖNTEM 14
3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Numuneler 14
3.2. Kan Kültürü İşleyişi 14
3.2.1. BACT-ALERT Kültür Besiyeri 14
3.2.2. BACT-ALERT 3D Sistemi 16
3.2.3. Laboratuvarımızda Rutin Kan Kültürü İşleyişi 16
3.2.4. Sendromik Panel ile Tanımlama 17
3.2.4.1. Örneklerin Zybio Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti ile Ekstraksiyonu ... 17
3.2.4.2. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Paneli ile Reaksiyonun Kurulması ve Amplifikasyon 19
3.2.4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi 22
3.4. İstatistiksel Analiz 24
4. BULGULAR 25
4.1. Çalışma Popülasyonu 25

4.2. Kültür ile Rutin Tanımlama Sonuçları 25

4.3. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Paneli Tanımlama Sonuçlarının Değerlendirilmesi 27

4.4. Antibiyotik Direnç Sonuçları 31

4.4.1. Karba-NP ve VITEK-2 ile Elde Edilen Antibiyotik Direnç Sonuçları 31

4.4.2. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Paneli Direnç Tespiti 32

4.5. Panel Dışı Mikroorganizmalar İçeren Kan Kültürlerinin İncelenmesi 34

4.6. Sonuç Verme Süreleri 35

4.6.1. Tanımlama Süreleri 35

4.6.2. Direnç Tespit Süreleri 35

5. TARTIŞMA 37

SONUÇLAR 47

KAYNAKLAR 48

ÖZGEÇMİŞ.....HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

EKLER.....HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

SİMGELER VE KISALTMALAR

KDE: Kan dolaşımı enfeksiyonları

MALDI-TOF: Matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı

MALDI-TOF MS: Matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrofotometrisi

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ADT: Antibiyotik duyarlılık testi

KNS: Koagülaz negatif stafilokok

FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi

TTP: Time to positivity

CAP: College of American Pathologists

MRSA: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*

VRE: Vankomisin dirençli enterokoklar

CRE: Karbapenem dirençli *Enterobacterales*

SCCmec: Stafilokokal kaset kromozomu *mec*

PBP: Penisilin bağlayıcı protein

TABLOLAR

Tablo 3.1. Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S panel hedefleri 19

Tablo 3.2. Panel stripleri kuyu içeriği 20

Tablo 3.3. Reaksiyon kurulum hacimleri 21

Tablo 4.1. Kan kültüründe üreyen *Staphylococcus* spp. izolatlarının dağılımı 27

Tablo 4.2. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S panel hedefleri ve monomikrobiyal üreme gösteren örneklerde tanımlama sonuçları 28

Tablo 4.3. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S panel hedefleri ve polimikrobiyal üreme gösteren örneklerde tanımlama sonuçları 29

Tablo 4.4. Rutin kan kültürü tanımlama ile uyumsuz PZR sonuçları 30

Tablo 4.5. Gram negatif izolatlarda antimikrobiyal direnç durumu 31

Tablo 4.6. Hızlı test ile elde edilen sonuçlar 31

Tablo 4.7. Gram pozitif izolatlarda VITEK-2 ile tespit edilen antmikrobiyal direnç durumu 32

Tablo 4.8. Antimikrobiyal direnç saptanmasında VITEK-2 ile PZR'ın karşılaştırılması 33

Tablo 4.9. Panelde bulunmayan etkenleri içeren şişelerdeki üreme dağılımları 34

Tablo 4.10. PZR ve VITEK-MS ile ortalama sonuç verme süreleri 35

Tablo 4.11. PZR, hızlı test ve VITEK-2 ile saptanan dirençlerin süre karşılaştırılması 36

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. BacT/ALERT® FA Plus aerobik ve BacT/ALERT® FN Plus anaerobik şişeleri 15

Şekil 3.2. Nükleik asit ektraksiyonu 18

Şekil 3.3. Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S panel PZR kurulumu 22

Şekil 4.1. Kan kültüründe üreyen mikroorganizmaların dağılımı..... 26

Şekil 4.2. Bio-speedy'nin performansının değerlendirilmesi 27

SEPSİS SENDROMİK PANELLERİ İLE KAN KÜLTÜRÜNDE HIZLI TANIMLAMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE), önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. kan kültürü sonuçlarının zamanında sonuçlandırılması, kritik öneme sahiptir. Sepsis tanısındaki gelişmeler ile KDE'lerin erken saptanması, hastaların antimikrobiyal tedavi yönetimini iyileştirmiştir. Bu çalışma, yeni bir sendromik sepsis PZR panel testini (Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S panel assay) tanımlama, direnç saptama ve geri dönüş süresinin (TAT) doğruluğu ve duyarlılığı açısından değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamıza, Mart 2022-Temmuz 2022 tarihleri arasında kliniklerden gönderilmiş ve 00.00-17.00 saatleri arasında, BACT-ALERT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) otomatize mikrobiyal tespit sistemleri ile pozitif üreme sinyali alınmış 256 kan kültürü şişesi incelendi. Laboratuvarımızdaki rutin kültür yönteminde üreyen koloniler, matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı (MALDI-TOF) teknolojisine sahip VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ile tanımlandı. Klinik olarak etken düşünülen izolatların, VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) sistemi ile antibiyogramları yapıldı ve Karba-NP testi ile karbapenemaz varlığı test edildi. Kültür yöntemi ile eş zamanlı olarak pozitif sinyali takiben, kan kültürü besiyerinden alınan örneğe, ilk olarak Zybio Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Zybio Inc., Çin) ve Zybio EXM 3000 Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi (Zybio Inc., Çin) kullanarak nükleik asit ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ekstraksiyonu tamamlanmış örneklere, Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S paneli (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri) ile Bio-Rad CFX96 Touch™ RT-PCR cihazında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışıldı. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar, tanımlama sonuçlarının ve tespit edilen direnç paternlerinin uyumu, sonuç verme süreleri açısından karşılaştırıldı.

Bulgular: İncelenen 256 kan kültürü örneğinin 27'si (%10,54), panel dışı mikroorganizma üremesi nedeni ile analiz dışı bırakıldı. Çalışmaya dahil edilen 229

kan kültürü örneğinin 196'sında monomikrobiyal, 33'ünde polimikrobiyal üreme görüldü. Monomikrobiyal üreme olan örneklerdeki gram pozitif izolatların %94,79'u, gram negatif izolatların %96,10'u, mayaların %100'ü PZR ile doğru olarak tanımlandı. Polimikrobiyal üremelerde ise 33 örneğin 29'unda (%87,87) sonuçlar tüm üreyen mikroorganizmalar için kültürle uyumlu bulundu. Ortalama sonuç verme süresi, PZR ile rutin tanımlamaya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi (p<0.05).

Karpabenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatının (n=12) %83,33'ünde PZR ile karbapenem direnç geni pozitif saptanmış olup, saptanmayan izolatlar karbapenemaz negatif bulundu. Standart kan kültürü işleyişinde dirençli olduğu gösterilen tüm vankomisine dirençli enterokok ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'larda panel *vanA* ve *mecA/C* direnç genleri saptandı. Buna göre, PZR ile rutin yönteme kıyasla karbapenem direnci 15,86 saat, vankomisin direnci 22,83 saat ve metisilin direnci 44,58 saat önce saptanabildi.

Sonuç: Çalışmamızda standart kültür yönteminden daha hızlı sonuç veren Sepsis PZR paneli ile %91,70 oranında kültürle uyumlu tanımlama sonuçları elde edildi. Bununla birlikte direnç genlerini de saptayarak kültürden çok daha kısa sürede sonuç elde edildi.

Anahtar kelimeler: Kan kültürü, Polimeraz zincir reaksiyonu, Multipleks sendromik panel, Antimikrobiyal direnç

EVALUATION OF RAPID IDENTIFICATION IN BLOOD CULTURE WITH SEPSIS SYNDROMIC PANEL

ABSTRACT

Aim: Bloodstream infections (BSI) are an important cause of mortality and morbidity, and timely conclusion of blood culture is critical. Improvements in the diagnosis of sepsis and early detection of BSIs have improved the antimicrobial therapy management of patients. This study aims and evaluates a novel syndromic sepsis PCR panel assay (Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S panel assay) in terms of accuracy of identification and resistance detection and also determines turnaround time (TAT).

Material and Methods: Between March 2022 and July 2022, 256 blood culture bottles with positive signal were obtained by BACT-ALERT automated microbial detection system between 00.00-17.00 and were included in our study. Microorganisms in the routine culture method in our laboratory were identified with VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) technology. Antibiotic susceptability tests were performed with the VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) system and the presence of carbapenemases was tested with the Carba-NP and mCIM tests. Following the positive signal concurrent with the culture method, nucleic extraction from the blood culture was performed using the Zybio Nucleic Acid Extraction Kit (Zybio Inc., China) and the Zybio EXM 3000 Nucleic Acid Extraction System (Zybio Inc., China). Polimerase chain reaction (PCR) was performed with extracted samples using the Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Panel (Bioeksen R&D Technologies) and the Bio-Rad CFX96 TouchTM RT-PCR device. The results obtained with both methods were compared in terms of the consistency of the identification results and the detection of resistance genes, and the turnaround time results.

Results: Of the 256 blood cultures examined, 27 (10,54%) were excluded due to the growth of non-targeted microorganisms in the panel. A total of 229 samples with 196 monomicrobial growth and 33 polymicrobial growth were included in our study.

In monomicrobial samples, 94.79% of gram positive isolates and 96.10% of gram negative isolates and all yeasts were correctly identified by PCR (100%). In polymicrobial samples, in 29 of 33 samples (87.87%), the results were found to be consistent with the culture for all microorganisms. The mean time to result was found to be statistically significantly lower than the routine identification by PCR ($p<0.05$). In 83.33% of the carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates (n=12), the carbapenem-resistance gene was positive by PCR. The isolates that were not detected with the carbapenem-resistance gene were carbapenemase negative. With PCR *vanA* and *mecA/C* resistance genes were detected in all vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant staphylococci, which were shown to be resistant in standard blood culture procedures. Carbapenem resistance was detected 15.86 hours, vancomycin resistance 22.83 hours, and methicillin resistance 44.58 hours earlier by PCR compared to the routine method.

Conclusion: In our study, 91.70% culture-consistent identification results were obtained with the Sepsis PCR panel, which gave faster results than the standard culture method. In addition, by detecting resistance genes, results were obtained in a much shorter time than culture. We concluded that the PCR method, which can contribute to patient management, significantly improves the turnaround time.

Keywords: Blood culture, Polimerase chain reaction, Multiplex syndromic panel, Antimicrobial resistance

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE), önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olduğundan kan kültürü sonuçlarının kliniğe zamanında bildirilmesi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının en kritik görevlerinden biridir [1]. Sepsis hastalarında etkili tedavinin zamanında uygulanması, hastanın prognozu açısından çok önemlidir. Son yıllarda dirençli bakterilerin yayılması nedeniyle ampirik tedavilerin etkinliği azalmıştır [2]. Ayrıca ampirik tedavide uzamış geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı da dünya çapında antibiyotik direncine katkıda bulunmaktadır [3], [4]. Bu nedenle kan kültüründe tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarının kısa sürede belirlenmesi, hastalara hızlı bir şekilde optimal antibiyotik tedavisi verilmesi ve hastaların hızla izolasyonunun sağlanmasına olanak sağladığı için büyük önem taşır.

Sepsis tanısındaki gelişmeler ve yeni yöntemlerin keşfi ile konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı ve daha güvenilir sonuçlar almak mümkün hale gelmiştir [1], [5]. Özellikle, doğrudan pozitif kan kültürü şişesinden tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testinin (ADT) uygulanması, ampirik tedaviden optimal tedaviye kadar geçen süreyi daha da kısaltmaktadır [6].

Son dönemde, tek bir klinik sendroma neden olabilecek geniş bir patojen dizisini tespit edebilen multipleks moleküler tanı testleri geliştirilmiştir [7]. İlk olarak solunum yolu etkenleri için kullanımı onaylanan sendromik paneller, kısa süre içinde kan kültürlerinde de tanı amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Bu testlerin, hızlı geri dönüş süresi sağlamaları ve KDE'ye neden olan çok sayıda hedefi içermeleri ve bunun yanında tedavi gerektirmeyen yaygın görülen kontaminantlar için de hızlı patojen tanımlaması sağlaması gibi avantajları nedeni ile klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanımı hızla yaygınlaşmıştır [8].

Bu testler, birden fazla patojeni aynı anda tespit edebilmenin yanı sıra, temel direnç genlerini de tespit ederek sınırlı duyarlılık bilgisi sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu testler sayesinde KDE'lerin erken saptanması ile hastaların antimikrobiyal tedavi yönetiminin iyileştiği gösterilmiştir [2].

Sendromik paneller, geleneksel kültür ve tanımlama yöntemlerinden 18 ila 24 saat önce patojen tanımlanmasını sağlamaktadır. Sınırlı duyarlılık bilgisi ise geleneksel fenotipik duyarlılık sonuçlarından 48 saat önce elde edilebilmektedir [8].

Bu çalışma, yeni bir sendromik sepsis polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) panelinin (Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S panel) patojen tanımlama etkinliğini, rutin yöntemler ve MALDI-TOF MS sistemi ile karşılaştırmayı, ana antibiyotik direnç genlerinin varlığı ile izolatların antibiyotik duyarlılık paternlerini belirlemeyi ve sepsis PZR panel kullanımının hem tanımlama hem de direnç sonucu verme süresine etkisini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları

KDE, kan dolaşımında canlı bakteriyel veya fungal mikroorganizmaların varlığı ile tanımlanan, klinik, hemodinamik ve laboratuvar değişiklikleri ile karakterize bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkaran bulaşıcı bir hastalıktır. Dolaşımda bakteri bulunması bakteriyemi; mantar bulunması ise fungemi olarak tanımlanır. Sepsis kavramı ise bakteriyemi veya fungemi durumlarında ortaya çıkan bir sendromdur.

KDE, endokardit, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, menenjit ve diğer lokalize enfeksiyonlardan önce ortaya çıkabilir, takip veya eşlik edebilir. Endovasküler kaynaklı KDE'ler primer bakteriyemi/fungemi; endovasküler kaynaklı olmayanlar ise sekonder bakteriyemi/fungemi olarak adlandırılır.

KDE'de, özellikle hastaların yeterli antimikrobiyal tedavi alamaması ve kaynak kontrolünün gecikmesi, her zaman kötü sonuçlarla ilişkilidir [9]. Etkenlerin hızlı saptanması ve elde edilen pozitif bulguların klinisyene erken bildirimi, hastaların daha erken uygun tedavi almasını sağlamakta olup klinik mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli işlevlerinden biri, KDE'ye neden olan mikroorganizmaların tespitidir. Kan kültürü, antibiyotik duyarlılık paterninin saptanmasına da olanak sağladığı için hala altın standart tanı yöntemidir.

2.2. Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarında Sık Görülen Mikroorganizmalar

2.2.1. Kateter ile İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonları

Özellikle, koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus* türleri, kolonizasyon ve biyofilm oluşumu göstererek hastanede antibiyotik dirençli kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olurlar. İnfüzyon hattında hasar var ise kateter kontamine olur ve infüzyon ilişkili bakteriyemi oluşabilir; genellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter cloacae* etken olarak saptanır.

Candida parapsilosis, kan kültürlerinden izole edilen en yaygın ikinci *Candida* türüdür ve özellikle kateter ile ilişkili KDE'nin en sık fungal etkendir [10], [11]. İntravasküler cihazların yüzeylerinde, sağlık çalışanlarının ellerinde biyofilm oluşturabilmeleri nedeniyle kalıcı kateterleri olan veya total parenteral nütrisyon ile beslenen hastalarda sık görülür [12], [13].

2.2.2. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonu, klinik olarak asemptomatik bakteriüriden septik şoka kadar çok çeşitli tablolara neden olabilir. Tüm bakteriyemilerin yaklaşık %17'sinde odak üriner sistem olup coğrafi bölgeye göre bu oran değişmektedir [11], [14]. En sık saptanan etken *Escherichia coli*'dir. *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. ve *Pseudomonas aeruginosa* da sık karşılaşılan gram negatif patojenlerdir. Gram pozitif bakterilerden ise en sık *Enterococcus* spp. saptanır [14], [15]. Üriner sistem enfeksiyonu etkenleri arasında mayalar daha nadirdir ve idrar kültüründe *Candida* türlerinin üremesi her zaman üriner sistem enfeksiyonu olarak değerlendirilmez; ancak özellikle immünsuprese hastalarda kandidemilerin ilk belirtisi olabileceği için dikkatli olunmalıdır [11], [16].

2.2.3. Alt Solunum Yolu Enfeksiyonları

Solunum yolu enfeksiyonlarında özellikle akciğer, en yaygın enfeksiyon bölgesidir ve pnömoniler, yüksek mortalite ile ilişkilidir. Bakteriyemilerin yaklaşık %12'sinden alt solunum yolu enfeksiyonları sorumludur. Şiddetli sepsise neden olan mikroorganizmanın türü, sonucun önemli bir belirleyicisidir ve sepsis nedeni olarak gram pozitif mikroorganizmaların sıklığı, zaman içinde artmıştır ve artık gram negatif enfeksiyonlardan daha yaygındır. En sık saptanan etkenler, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*'dir. Özellikle pnömokoksik pnömoni hastalarının %25'inde kan kültürü pozitifliği tespit edilir ve bu hastalarda mortalite yüksektir [11], [17]

2.2.4. İntraabdominal Enfeksiyonlar

Periton sıvısı, bağırsak rüptürü durumunda gastrointestinal mikrobiyota ile kontamine olarak sekonder peritonit tablosuna neden olur. Sekonder peritonitlerde en sık saptanan etken genellikle *E. coli*, anaerobik bakteriler ve enterokok türleridir. Primer peritonit olgularında ise en sık saptanan etkenler; *E. coli, K. pneumoniae* ve enterokok türleridir [11].

2.2.5. Deri Enfeksiyonları

Mikroorganizmalar eksojen ya da endojen olarak bulaşarak deri enfeksiyonlarına sebep olup, hematojen yollarla vasküler sistem boyunca yayılarak sepsise neden olabilir. *Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae* ve *S. aureus* en sık deri enfeksiyonlarına bağlı bakteriyemi nedenleridir. Bu enfeksiyonlar genellikle polimikrobiyal seyretmektedir [11].

2.2.6. Enfektif Endokardit

2.2.6.1. Doğal Kapak Endokarditi

En sık saptanan mikroorganizmalar; oral streptokoklar, stafilokoklar, enterokoklar, *Streptococcus bovis*, Kandidalar, HACEK grubu (*Haemophilus* türleri, *Aggregatibacter* türleri, Car*diobacterium* türleri, *Eikenella corrodens*, *Kingella* türleri) ve *Bartonella* türleridir [11].

2.2.6.2. Protez Kapak Endokarditi

Postoperatif dönemde bir yıldan kısa sürede protez kapak endokarditi olması, erken başlangıçlı protez kapak endokarditi olarak adlandırılır ve en sık saptanan etkenler, koagülaz negatif stafilokoklardır (KNS). Geç başlangıçlı protez kapak endokarditinde ise genellikle etkenler doğal kapak endokarditi ile benzerdir [11].

2.3. Standart Kan Kültürü Laboratuvar Yöntemi

2.3.1 Set Kavramı ve Örneklerin Alınması - Preanalitik Süreç

Kaliteli kan kültürü sonuçlarının elde edilmesi, preanalitik, analitik ve postanalitik süreçlerin doğru bir şekilde yönetilmesiyle mümkündür. Bu üç süreç arasında en çok hata kaynağı, kan örneğinin alınması ve laboratuvara gönderilmesini içeren preanalitik süreçtir.

Bir kan kültürü seti, tek bir damar girişimi ile alınmış kanın dağıtıldığı kan kültürü şişelerini ifade eder. Erişkin hastalarda, ideal bir kan kültürü seti, "aerobik" ve "anaerobik" olmak üzere iki kan kültürü şişesi içerir ve ideal olarak bir set için 20 mililitre alınmalıdır. Çocuk hastalarda ise kan kültürü için alınacak olan kan miktarına, hastanın toplam kan hacmine göre karar verilir.

Hastalardan alınması gereken kan kültürü seti sayısı, hastanın klinik durumuna, şüphelenilen enfeksiyona ve tedavinin aciliyetine göre değişebilir. Akut bakteriyemi/fungemi şüphesinde önerilen, farklı damarlardan, iki setin peş peşe alınmasıdır. Klinik şüpheye göre alınacak kan kültürü seti sayısı artırılabilir. Tek kan kültürü seti yeterli değildir ve ürediğinde kesin olarak etken kabul edilen bir patojen (*Salmonella* türleri, *Brucella* türleri, vb.) izole edilmedikçe, tek bir pozitif kültür sonucunun yorumlanması zordur.

Kan kültüründe üreyen her mikroorganizma etken değildir ve tek kan kültürü setinde, KNS, gram pozitif basiller, küf mantarları gibi olası kontaminantlar ürediğinde gerçek bakteriyemi/fungemi etkenlerinden ayırt edilemez. Kontaminasyon, genellikle cilt antisepsisinin yetersizliğinden kaynaklanır. İdeal olarak, bir laboratuvarda kan kültürü kontaminasyon oranları, %3'ün altında olmalıdır.

2.3.2 Kan Kültürü İnkübasyon Yöntemleri

2.3.2.1 Kan Kültürünün Manuel Sistemler ile İnkübasyonu

Manuel ticari sistemler, Castañeda şişeleri olarak bilinen klasik agar-broth kombinasyon şişelerinin varyasyonlarıdır. Bakteri üremesini sürekli olarak izleyen daha otomatik bir sistem için gerekli kaynaklara sahip olmayan laboratuvarlar için kullanılabilir bir seçenektir [18].

- Septi-Chek Sistemi (BD Diagnostics, Sparks, MD), bifazik agar lam sistemidir. Sistem, beyin-kalp infüzyon buyyon ve triptik soy buyyon içeren kan kültürü şişesi kullanır ve bu şişe agar yüzeyli ikinci bir plastik hazneye bağlanacak şekilde tasarlanmıştır. İlk "alt kültür", şişe ters çevrilerek, sıvı besiyerinin agar içeren bölmeye girmesi sağlanır ve 35°C'de 4 ila 6 saat inkübe edilir. Şişe daha sonra inkübasyonun devam etmesi için tekrar dik olarak yerleştirilir. Şişe düzenli aralıklarla tekrar ters çevrilebilir. Üreme makroskobik olarak incelenir [18].
- Oxoid Signal sistemi (Remel Inc., İngiltere), bakteri üremesini saptamak için CO_2 oluşumunu baz alan, tek şişeli manuel kan kültür sistemidir. Kan, şişeye inoküle edilir ve şişenin üzerine besiyerinin içine uzanan bir iğneye sahip şeffaf plastik sinyal ünitesi takılır. Kan kültüründe mikroorganizma varsa, metabolizasyon sonucu oluşan CO_2 şişe üzerinde birikerek, basınçla şişe içindeki kan-besiyeri karışımını iğne içerisinden sinyal ünitesine doğru ilerletir. Şişeler, makroskopik olarak takip edilir [18].
- Wampole Isostat/Isolator Sistemi (Alere, Waltham, MA), güç üreyen veya yavaş büyüyen mikroorganizmaların da üretilebildiği, kültür ortamı olarak sıvı besiyeri kullanmayan tek ticari kan kültürü sistemidir. Hem eritrositleri hem de lökositleri parçalayan bir kimyasal olan saponin içeren özel bir tüptür. Tüpe yaklaşık 7,5 ila 10 ml kan eklenir ve tüp birkaç kez ters çevrilerek karıştırılır ve böylece lizis reaksiyonu oluşur. Tüp daha sonra santrifüj edilerek mikroorganizmalar konsantre edilir ve oluşan pellet, kültür plaklarına ekilir [15], [18].

2.3.2.2 Kan Kültürü Şişelerinin Otomatize Sistemler ile İnkübasyonu

Son dönemde, kan kültüründe erken tespit ve yüksek duyarlılık avantajlarına sahip, laboratuvarlarda kullanımı yaygınlaşmış olan, sürekli monitörize inkübasyon sistemleri geliştirilmiş olup şu anda bakteriyemi ve fungemi tespitinde kullanım için, FDA tarafından onaylanmış üç otomatik mikrobiyal tespit sistemi mevcuttur. Bu sistemler; BacT/Alert (BacT/Alert Virtuo ve BacT/Alert 3D) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, ABD), ve VersaTREK (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH) sistemleridir. Her üç sistem de bir tür gaz algılama yoluyla mikrobiyal büyümeyi tespit eder; ancak farklı yöntemler kullanır.

BacT/Alert otomatik mikrobiyal tespit sistemi, çoğalan mikroorganizmalar tarafından üretilen CO_2 varlığında griden sarıya değişen dahili bir kolorimetrik sensör kullanır. Kan örneklerindeki antibiyotikleri baskılamak için aktif karbon içerir. Pozitif şişe okumaları, 10 dakikalık aralıklarla gerçekleşir [19].

BD BACTEC sisteminde, mikrobiyal büyümenin bir sonucu olarak üretilen CO_2 artışlarını algılayabilen kimyasal bir sensör bulunmaktadır. Sensör, mevcut CO_2 miktarıyla orantılı olan floresans artışını 10 dakikalık aralıklarla izler. Sistem, kan örneklerinden antibiyotikleri bağlamak için katyonik değişim ve adsorban iyonik olmayan reçineler kullanır [19]. Bu sayede bu katkı maddelerini içeren BACTEC ve BacT/Alert kültür ortamları, katkı maddesi içermeyen ortama kıyasla antimikrobiyal tedavi alan hastalarda da üremeye olanak sağlar [20].

Difco ESP kültür II sisteminden gelişen ve onun yerini alan VersaTREK otomatik mikrobiyal tespit sistemi, 2003 yılında ticari olarak piyasaya sürülmüştür. Bu sistem kullanılarak pozitif kültürlerin tespiti, harici bir basınç sensörü kullanarak numune şişesinin üst boşluğundaki gaz tüketiminin (O_2) ve üretiminin (CO_2, H_2 ve N_2) neden olduğu basınç değişikliklerini algılar. Pozitif şişe okumaları, 12 dakikalık (aerobik) ve 24 dakikalık (anaerobik) aralıklarla gerçekleşir. [19], [21].

2.3.3. Pozitif Kan Kültürü Şişelerinin Analizi

Kan kültüründe standart inkübasyon süresi beş gündür. Beş gün boyunca pozitif sinyal alınmazsa sonuç "üreme olmadı" olarak raporlanır. Şişelerde otomatize cihazlar ile üreme tespit edildiğinde, cihaz sinyal verir. İnkübasyonun başlangıcından pozitifliğin saptandığı ana kadar geçen süreye pozitiflik zamanını ifade eden "time to positivity (TTP)" denir. Pozitif sinyalin ardından şişeler mümkün olan en kısa sürede cihazdan çıkarılmalı ve işleme alınmalıdır.

2.3.3.1. Gram Boyama ve Katı Besiyeri Ekimleri

Kan kültüründe pozitif sinyal alınmasını takiben yapılacak en önemli ve birincil test, mikroorganizmaları karakterize etmek için en hızlı ve en basit test olan Gram boyamadır. Gram boyama tarafından sağlanan bilgiler, seçilen ampirik antimikrobiyal tedavinin düzenlenmesini kolaylaştırır [22], [23]. Bu nedenle, Gram boyama sonuçları kliniğe hızla bildirilmelidir. Direkt mikroskopik inceleme ile eş zamanlı olarak katı besiyerlerine de ekim yapılır [15]. %5 Koyun kanlı agar ve zengin besiyeri olarak çikolatamsı agar kullanılır. Gram negatif bakteriler için seçici besiyeri olan MacConkey agar veya eozin-metilen mavisi agara; mikroskobik incelemede maya hücreleri görülen şişelerde Sabouraud dekstroz agara da ekim yapılarak inkübe edilir. Pozitif sinyal alınan şişe, eğer anaerobik kan kültürü şişesi ise ek olarak Schaedler agara ekim yapılarak anaerobik ortamda inkübasyon sağlanır [15].

2.3.3.2. Bakteri Tanımlama Yöntemleri

2.3.3.2.1. Konvansiyonel Yöntemler

Gram pozitif bakterilerde, katalaz, koagülaz, safrada erime, eskülin hidrolizi, L pirolidonil β naftilamidi (PYR); gram negatif bakterilerde ise glikoz fermentasyonu, üreaz, oksidaz, indol, aminoasit dekarboksilasyonu gibi biyokimyasal testler kullanılır ve bu testlerin sonucuna göre tanımlama yapılır [15].

2.3.3.2.2. Otomatize Sistemler

Otomatize sistemler, biyokimyasal testleri kullanarak, antimikrobiyal duyarlılık testleriyle birlikte eş zamanlı olarak tanımlama da yapabilmektedir. En çok kullanılan üç otomatize sistem Microscan Walkaway (Beckman Coulter, Kaliforniya, ABD), Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, ABD), VITEK 2'dir (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa).

2.3.3.2.3. Kütle Spektrofotometrisine Dayalı Yöntemler

Matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrumları (MALDI-TOF MS), mikroorganizmaların matriks ile birlikte, direkt plastik, metal veya cam plaklara yayılarak tanımlamasında kullanılır. Hedef plaktaki mikroorganizma yayılan kuyucuklara lazer atışları gerçekleşir ve bu şekilde matriks lazer enerjisini absorbe ederek iyonize olur. Matriks daha sonra analiz edilen mikroorganizmaya proton aktararak onu yükler. İyonize olan analit kütleye göre ayıran bir sütun boyunca ilerler ve sonunda bir dedektöre ulaşır. Üretilen kütle spektrumları, özel yazılım tarafından analiz edilir ve kitaplığındaki kayıtlı mikroorganizma profilleriyle karşılaştırılır. Bu prosedürle tür identifikasyonu, immünolojik veya biyokimyasal testlere dayalı diğer prosedürlere göre çok daha hızlı, daha doğru ve daha ucuzdur [18] [24]. MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ve VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), ülkemizde kullanılan MALDI-TOF MS sistemleridir.

2. 4. Kan Kültüründe Moleküler Yöntemler

Kültürden bağımsız oldukları için moleküler yöntemler, genellikle fenotipik yaklaşımlardan daha hızlıdır. Pozitif kan kültürü şişelerindeki mikroorganizmaların iki saatten kısa bir sürede hızlı tanımlanması için FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı birkaç ticari moleküler test mevcuttur. Bu testler, tek bir mikroorganizmayı veya aynı anda test edilebilen çok sayıda mikroorganizmayı hedef alabilir [1]. Gram boyama sonucuna göre test seçimi organize edilebilir. Belirli bir hedefe yönelik çalışılan PZR, kan kültürlerinde, direnç tayini araştırmalarında ve epidemiyolojik çalışmalarda faydalıdır. Bununla birlikte, amplifikasyona dayalı nükleik asit yöntemlerinin kan

kültüründe kullanımının; PZR inhibitörlerinin varlığı, yüksek miktarda mikrobiyal olmayan nükleik asitlerin varlığı, kontaminant DNA varlığı ve ölü mikroorganizmaların da nükleik asitinin tespiti gibi sınırlılıkları vardır [25].

Gerçek zamanlı PZR'de hedefin amplifikasyonu ve tespiti, aynı tüpte eş zamanlı olarak oluşur. Test bu sistemde, floresans oluşumunu monitörize eden belirli optikleri olan özel termal döngü cihazı ile gerçekleştirilmektedir [26].

2.4.1. Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İkibinlerin sonlarından bu yana, tek bir klinik sendroma neden olabilecek geniş bir patojen dizisini tespit edebilen multipleks moleküler tanı testlerinin geliştirilmesi için önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu, patojen tanısı için "sendromik panel yaklaşımı" olarak bilinir ve bu test tasarımı, özellikle son on yılda sürekli gelişen bir çalışma alanı olmuştur [7].

İlk olarak 2011 yılında solunum yolu etkenleri için geliştirilen bir sendromik panel, FDA tarafından onaylanmış ve kısa süre içinde, solunum yolu, kan, gastrointestinal sistem, menenjit ve ensefalit enfeksiyon etkenlerinin tespiti için birçok ticari test geliştirilmiştir. Bu testlerin, hızlı geri dönüş süresi sağlamaları ve çok sayıda hedefi içermeleri gibi avantajları nedeni ile klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanımı hızla yaygınlaşmıştır [8].

KDE'ler, morbidite ve mortalitesi yüksek olmaları nedeniyle, hastaları kısa sürede optimal tedaviye almak yüksek bir önceliktir ve pozitif kan kültüründen direkt yapılacak sendromik PZR testi, bu enfeksiyonlara neden olan en sık organizmaların çoğunu saptar ve bunun yanında, tedavi gerektirmeyen yaygın görülen kontaminantlar için de hızlı patojen tanımlaması sağlar. Ayrıca, birkaç sendromik sepsis paneli ek olarak antimikrobiyal direnç genlerini de tespit eder [8], [27].

Bu testler, geleneksel kültür ve tanımlama yöntemlerinden 18 ila 24 saat önce patojen tanımlanmasını sağlar. Sınırlı duyarlılık bilgisi ise geleneksel fenotipik duyarlılık sonuçlarından 48 saat önce elde edilir [8]. FilmArray BCID Panel (BioFire, ABD), GenMark ePlex BCID-GP Panel (GenMark Diagnostics, ABD), GenMark ePlex BCID-GN Panel (GenMark Diagnostics, ABD), GenMark ePlex BCID-FP Panel

(GenMark Diagnostics, ABD), Luminex Verigene Gram Positive Blood Culture Test (BC-GP) (Nanosphere, Inc, ABD), Luminex Verigene Gram Negative Blood Culture Test (BC-GN) (Nanosphere, Inc, ABD), T2 Biosystems T2 Candida Panel, T2 Biosystems T2 Bacteria Panel, Accelerate Pheno (Accelerate Diagnostics, ABD) panelleri, FDA tarafından onaylanmış sendromik KDE panelleridir [8]

KDE'ler için sendromik paneller, rutin kan kültürü çalışmalarına ek bir testtir ve kültürün veya tam antimikrobiyal duyarlılık testinin yerini almaz. Bunun istisnası, 90 dakika içinde yaygın kan dolaşımı patojenlerini hızla tanımlayan ve bakteriyel fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarını yaklaşık yedi saat içinde belirleyen Accelerate PhenoTest BC'dir (Accelerate Diagnostics, Tucson, AZ) [8], [28]

Bu panellerin sınırlılıkları arasında hedef dışı patojenlerin saptanmaması, tam duyarlılık bilgisinin olmaması, yüksek maliyetli olması ve yanlış pozitif sonuçlar verebilmesi yer alır. Sendromik panellerde her KDE patojeni, hedef mikroorganizma olarak gösterilmez ve hedef dışı mikroorganizmalar için herhangi bir tanımlanma sağlanamaz. Saptanan antimikrobiyal direnç bilgilerinin kapsamı da yine sendromik panelde bulunan hedeflere bağlıdır. Gram pozitif organizmalar için panellerin içerdiği direnç belirteçleri, optimal antimikrobiyal tedavi için çoğunlukla yeterlidir. Gram negatif mikroorganizmalar içinse çoğu panel hedefi kısıtlı kalmasına rağmen bu testlerin kullanımı etkili antimikrobiyal tedaviye ulaşım süresini kısaltarak tedavi yönetimine, özellikle de çoklu ilaca dirençli gram negatif bakteriler veya vankomisine dirençli enterokoklar gibi oldukça dirençli mikroorganizmaların saptanmasında fayda sağladığı gösterilmiştir [8], [29], [30].

Sendromik kan kültürü testlerinin çoğu, pozitif kan kültürü kullanır. Dolayısıyla test öncesi inkübasyon süresi gerektirir. Bu süreyi de ortadan kaldırmak için patojenleri doğrudan tam kandan test edecek sistemler geliştirilmiştir. T2 Biosystems (Lexington, MA) T2 Candida ve T2 Bacteria panelleri, FDA onaylı, kültürden bağımsız KDE sendromik testleridir. Kültüre dayalı sendromik panellerden daha hızlıdır; ancak daha sınırlı hedefleri vardır ve ancak geleneksel kan kültürününe ek test olarak kullanılabilir [8].

2.4.2. DNA Mikro Dizileme ve Peptit Nükleik Asit Floresan İn Situ Hibridizasyonu (PNA FISH)

Hızlı kan dolaşımı patojen tanımlaması için en eski moleküler yöntemlerden biri PNA FISH (AdvanDx) yöntemidir. Prosedür, pozitif kan kültürü ile bir slayt üzerinde gerçekleştirilir. Floresan işaretli sentetik PNA probu, patojen ribozomal RNA'sına bağlanır. FISH işareti, bağlı PNA-RNA hibritlerinin floresan mikroskopi altında görüntülenmesini sağlar. Yöntem, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa* ve *Candida* spp için %95-100 duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir; ancak çok fazla zaman gerektirir. Bu nedenle daha sonra, daha hızlı bir yöntem olan QuickFISH geliştirilmiştir [27].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, tek merkezli ve prospektif olarak tasarlanmıştır. Araştırmamızın tasarımı, Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO) kılavuzuna uygun olarak yapılmıştır.

Helsinki Bildirgesi'nde geçen uluslararası etik kurallarına uyulmuş ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 08.03.2022 tarihli 3457 sayılı karar ile onay almıştır (Ek-1).

Çalışmaya alınan numunelerin rutin yapılan işlemleri aynı şekilde sürdürülmüş; çalışma, bu iş akışını ve klinik yansımasını etkilemeyecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Numuneler

Çalışmamıza, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Seyrantepe Yerleşkesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Mart 2022-Temmuz 2022 tarihleri arasında kliniklerden gönderilmiş ve 00.00-17.00 saatleri arasında pozitif üreme sinyali alınmış 256 kan kültürü şişesi dahil edilmiştir.

Çalışmaya, erişkin hastalardan alınan kan kültürü setleri dahil edilmiş; çocuk hastaların kan kültürü şişeleri dahil edilmemiştir. Aynı hastadan alınan birden fazla sayıdaki kan kültürü şişelerinden sadece ilk sinyal veren; aynı setin diğer şişesinde Gram boyama ile farklı morfolojide bakteri görülen; aynı hastadan bir haftadan daha uzun süre geçtikten sonra alınan kan kültürü setlerinde üreme sinyali olduğunda çalışmaya alınmıştır.

3.2. Kan Kültürü İşleyişi

3.2.1. BACT-ALERT Kültür Besiyeri

Çalışmamızda sepsis şüpheli hastalardan alınan kanlar, hastanemizde rutin olarak kullanılan, kolorimetrik tespit özelliğine sahip, bakteri, mikobakteri, mantar ve mayalar dahil geniş çeşitlilikte mikroorganizmaları saptayan BACT-ALERT kültür

besiyerinde (bioMe´rieux, Marcy l'Etoile, France), klinik kan kültürü uygulama klavuzuna göre her hastadan en az iki set olacak şekilde laboratuvara gönderildi. Laboratuvara gönderilen bir set, BacT/ALERT® FA Plus Aerobik ve BacT/ALERT® FN Plus Anaerobik şişelerini içerir (Şekil-1).



Şekil 3.1. BacT/ALERT® FA Plus aerobik ve BacT/ALERT® FN Plus anaerobik şişeleri

BacT/ALERT® FA Plus Aerobik şişe:

- 30 ml'lik kompleks besiyeri (pepton/biyolojik özüt kombinasyonu (≥ %1,85 a/h), antikoagülan (≥ %0,083 a/h), vitaminler ve amino asitler (≥ %0,00145 a/h) karbon kaynakları (≥ %0,45 a/h), eser öğeler (≥ %0,0005 a/h) ve saf suda diğer kompleks amino asit ve karbonhidrat substratları)
- ≥1,6 g adsorban polimerik tanecik içerir.
- Şişeler, vakum altında N2, O2 ve CO2, atmosferini içerir [31].

BacT/ALERT® FN Plus Anaerobik şişe:

- 40 ml'lik kompleks besiyeri (Pepton/biyolojik özüt kombinasyonu (≥ %1,85 a/h), antikoagülan (≥ %0,083 a/h), vitaminler ve amino asitler (≥ %0,00145 a/h) karbon kaynakları (≥ %0,45 a/h), eser öğeler (≥ %0,0005 a/h) ve saf suda diğer kompleks amino asit ve karbonhidrat substratları)
- ≥1,6 g adsorban polimerik boncuk içerir.
- Şişeler vakum altında N_2 ve CO_2, atmosferini içerir [32].

3.2.2. BACT-ALERT 3D Sistemi

Hastanemiz kliniklerinden laboratuvara gönderilen kan kültürü şişeleri, kabulü yapıldıktan sonra BACT-ALERT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) otomatize mikrobiyal tespit sistemlerine yüklendi. Bu sistemler ile, test edilen numunede mikroorganizma varlığında, mikroorganizmaların kültür besiyerindeki substratları metabolize etmesi sonucu oluşan CO_2 ile kültür şişelerinin altındaki sensörün rengi daha açık bir renge dönüşür. Işık kaynağı bu sensörlerin üzerine ışık gönderir. Yansıtılan ışık bir fotodedektör tarafından ölçülür. Mikroorganizmaların ürettiği CO_2 arttıkça yansıtılan ışık artar. Cihaz da her 10 dakikada bir bu ışık düzeyini izler. Yüksek bir ilk CO_2 içeriği, sıra dışı yüksek CO_2 üretim oranı ve/veya sabit bir CO_2 üretimi seviyesi varsa, örneğin pozitif olduğuna karar verilir ve cihaz bu şişeler için pozitif sinyal verir. Beş günlük inkübasyon süresi boyunca şişeler cihazda takip edilir ve bu süreçte sinyal alınmazsa "Üreme Olmadı" olarak raporlanır. İnkübasyon boyunca pozitif sinyal alınan şişeler cihazdan çıkartılır ve bu şişeler ile rutin kan kültürü işleyişi sürdürülür.

Bu çalışmada, rutin kan kültürü işleyişi devam ederken, bir yandan da pozitif sinyal veren şişeler sendromik paneller ile PZR işlemine alındı.

3.2.3. Laboratuvarımızda Rutin Kan Kültürü İşleyişi

Laboratuvarımızda, kan kültürü şişelerinin beş günlük inkübasyon sürecinde pozitif üreme sinyali alınan şişelerden Gram boyama yapılması, sonucunun panik değer olarak kliniğe bildirimi ve kan kültürü şişesindeki sıvı besiyerinden katı besiyerlerine ekimi yedi gün 24 saat rutin olarak sürdürülmektedir.

Aerop kan kültürü şişesinden üreme sinyali alındığında, katı besiyeri olarak %5 koyun kanlı agar ve çikolatamsı agar kullanıldı. Ekim yapılan %5 koyun kanlı agar, atmosferik hava koşullarında; çikolatamsı agar ise %5 CO_2 ortamda 35-37ºC'de inkübasyona kaldırıldı. Anaerobik kan kültürü şişesinde üreme sinyali olduğunda ise diğer iki besiyerine ek olarak Schaedler besiyerine de ekim yapılarak anaerobik ortamda inkübasyonu sağlandı.

Laboratuvarımızda, inkübasyona kaldırılan katı besiyerleri, kısa inkübasyon süreli rutin tanımlama protokolü uygulanarak, saat 9.00 ve 14.00'da günde iki kez kontrol edildi ve belirgin üremesi olan plaklardaki koloniler, matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı (MALDI-TOF) teknolojisine sahip VITEK® MS (bioMe´rieux, Marcy l'Etoile, France) ile tanımlandı. Tanımlama sırasında, *Escherichia coli* ATCC 8739 suşu kontrol suşu olarak kullanıldı. Klinik olarak etken düşünülen izolatların, VITEK® 2 (bioMe´rieux, Marcy l'Etoile, France) sistemi ile antibiyogramı ve karbapenemaz varlığını hızlı tespit edebilmek için, laboratuvarımızda in-house hazırladığımız, *Enterobacterales* ve *Pseudomonas spp.* izolatlarında test ettiğimiz, Karba-NP testi ve mCIM testi yapıldı. Stafilokoklarda metisilin direnci, sefoksitin disk difüzyon testi ile tanımlandı. Kan kültüründe rutin olarak dış kalite kontrolü College of American Pathologists (CAP) yapıldı.

3.2.4. Sendromik Panel ile Tanımlama

3.2.4.1. Örneklerin Zybio Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti ile Ekstraksiyonu

Üreme olan kan kültürü şişelerindeki besiyerlerinden nükleik asit ekstraksiyon işlemi, manyetik boncuk ile saflaştırma temelli Zybio Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Zybio Inc., Çin) ve Zybio EXM 3000 Nükleik Asit Ekstraksiyon Sistemi (Zybio Inc., Çin) kullanılarak, üretici firmanın kan kültürü örnekleri ile çalışma prosedürü doğrultusunda yapıldı. Tüm işlemler Class IIA biyogüvenlik kabininde uygulandı.

Zybio EXM 3000 cihazı, adsorbe edilen manyetik boncukları farklı reaktif kuyularına taşımak için cihaz içerisine sabit manyetik çubukları kullanır. İlk aşamada, manyetik çubuk ile altı kuyucuklu kartuşun ikinci kuyusundaki sıvı-manyetik boncuk süspansiyonu hızla karıştırılırak, manyetik bocukların manyetik çubuklara yapışması sağlanır. İkinci aşama ise lizis aşamasıdır. Manyetik boncuklar ilk kuyucuğa taşınarak bu kuyucukta bulunan Proteinaz K, STL-B, 11XPEGN ve kan kültürü sıvı besiyerinin karışması sağlanır. Üçüncü ve dördüncü aşamada, üçüncü ve dördüncü kuyucuklardaki yıkama tamponu ile yıkama gerçekleştirilir. Beşinci aşama elüsyon aşamasıdır. Isı 85 dereceye yükseltilerek son kuyucukta elüsyon işlemi tamamlanır.

Pozitif sinyal alınan kan kültürü şişeleri, 10 kez ters düz edilerek içinde bulunan sıvı besiyerinden çalışma için 1ml ayrılarak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Kite ait, ikinci kuyucuğunda manyetik boncuk süspansiyonu bulunan kartuşlar plastik kartuş standına oturtularak çalışma başlatıldı. Kartuşun bir numaralı kuyucuğuna sırası ile 15 µl Proteinaz K, 160 µl STL-B solüsyonu, 20 µl 11XPEGN (Polietilen Glikol + Sodyum Azide) solüsyonu ve son olarak çalışma için ayrılan kan kültürü sıvısından 25 µl pipetlendi. Kartuşun dördüncü kuyucuğuna ise 500 µl yıkama tamponu (WB) pipetlenerek üç dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hazırlanan kartuş, Zybio EXM 3000 nükleik asit ekstraksiyon sistemine yerleştirilerek ZYBIO-WB-B-200 programı ile çalışma başlatıldı. Toplam yirmi yedi dakikalık çalışma süresi tamamlandığında kartuş çıkarılarak kartuşun altı numaralı kuyusunda bulunan ekstrakt, pipetle alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve RT-PCR aşamasına geçildi. Nükleik asit ekstraksiyonu iş akışı Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Nükleik asit ektraksiyonu

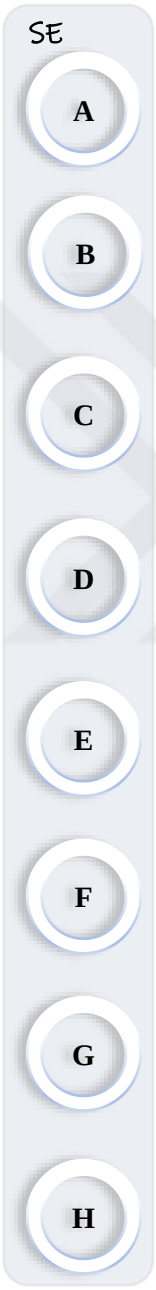
3.2.4.2. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Paneli ile Reaksiyonun Kurulması ve Amplifikasyon

Ekstraksiyonu tamamlanmış örnekler, sık karşılaşılan bakteriyel, fungal sepsis etkenlerinin ve temel direnç genlerinin saptanabildiği Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Paneli (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri) kullanılarak Bio-Rad CFX96 Touch™ RT-PCR cihazında çalışıldı. Panel ile hızlı tanı, hedef etkene özgü DNA bölgelerini hedefleyen gerçek zamanlı PZR (qPCR) ile gerçekleştirilmektedir. Panel hedefleri Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Striplerdeki kuyucuklarda araştırılan patojenler ve direnç genleri, değerlendirildiği kanallara göre Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S panel hedefleri

Direnç Geni	**Gram Negatif Bakteri**	**Gram Pozitif Bakteri**	**Mantar**
OXA-48	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Candida glabrata*
KPC	*Klebsiella pneumoniae*	*Enterococcus faecium*	*Candida tropicalis*
NDM	*Klebsiella oxytoca*	*Enterococcus faecalis*	*Candida krusei*
VIM	*Pseudomonas aeruginosa*	*Streptococcus pneumoniae*	*Candida albicans*
IMP	*Acinetobacter baumannii*	*Listeria monocytogenes*	*Candida parapsilosis*
Van A	*Stenotrophomonas maltophilia*	*Staphylococcus* spp.	
Van B	*Haemophilus influenzae*	*Streptococcus* spp.	
Mec A+C	*Neisseria meningitidis*		
	Enterobacterales		
	Pseudomonas spp.		

Tablo 3.2. Panel stripleri kuyu içeriği

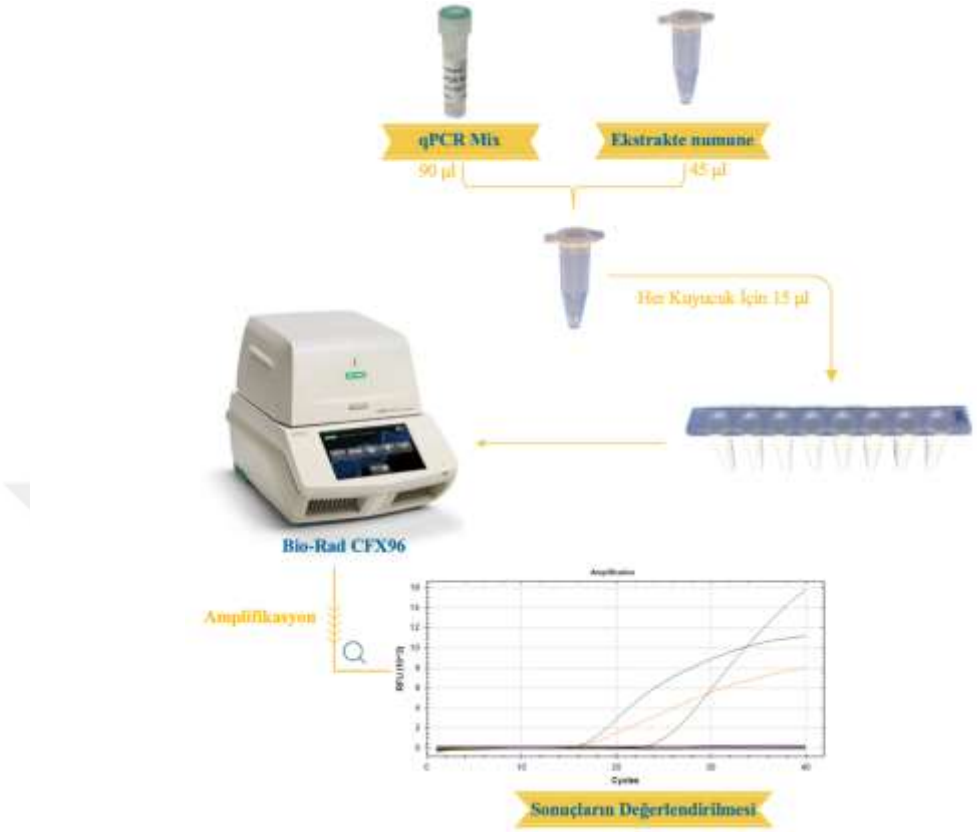
Strip	Kuyu İçeriği	Kanal	Hedef
	**A: SPCV Oligo Mix**	**FAM**	*Staphylococcus aureus*
		HEX	*Pseudomonas* spp.
		ROX	*vanA* - Vankomisin direnci
		CY5	*Candida krusei*
	B: CRVS Oligo Mix	**FAM**	*Candida glabrata*
		HEX	Dahili Kontrol (IC); insan RNase P
		ROX	*vanB* - Vankomisin direnci
		CY5	*Staphylococcus* spp.
	C: KPAC Oligo Mix	**FAM**	*Pseudomonas aeruginosa*
		HEX	*Candida albicans*
		ROX	*Klebsiella pneumoniae*
		CY5	*Acinetobacter baumannii*
	D: HKOC Oligo Mix	**FAM**	*Haemophilus influenzae*
		HEX	*Klebsiella oxytoca*
		ROX	*Candida parapsilosis*
		CY5	OXA-48 - Karbapenem direnci
	E: CRE Oligo Mix	**FAM**	KPC - Karbapenem direnci
		HEX	NDM - Karbapenem direnci
		ROX	VIM - Karbapenem direnci
		CY5	IMP - Karbapenem direnci
	F: LEMC Oligo Mix	**FAM**	*Listeria monocytogenes*
		HEX	*Enterococcus faecalis*
		ROX	*mecA+C* - Metisilin direnci
		CY5	*Candida tropicalis*
	G: SES Oligo Mix	**FAM**	*Stenotrophomonas maltophilia*
		HEX	x
		ROX	*Enterobacterales*
		CY5	*Streptococcus* spp.
	H: ENES Oligo Mix	**FAM**	*Enterococcus faecium*
		HEX	*Escherichia coli*
		ROX	*Neisseria meningitidis*
		CY5	*Streptococcus pneumoniae*

Test edilecek her numune için Tablo 2'de gösterilen şekilde bir strip kullanıldı (SE strip) ve tüm çalışmalarda bununla birlikte birer adet NTC (SE strip) ve PC (PC-SE strip) stripleri de çalışmaya eklendi. SE strip üzerinde bulunan her kuyucuk içerisinde, 5 µl araştırılan patojene yönelik oligo mix; PC-SE strip üzerinde bulunan her kuyucuk içerisinde ise 10 µl araştırılan patojene yönelik oligo mix ve pozitif kontrol template bulunmaktadır.

Reaksiyon kurulumu yapılırken, her numune için bir mikrosantrifüj tüpüne 90 µl 2X qPCR Mix ve 45 µl numune ekstraktı (negatif kontrol için 45 µl NTC) eklendi ve pipetaj yapılarak numuneye ait sekiz kuyucuklu stribin her kuyucuğuna 15'er µl dağıtıldı. PC-SE stribine ise, 2X qPCR Mix'ten 10'ar µl kuyucuklara dağıtıldı. Reaksiyon kurulum hacimleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Daha sonra striplerin kapakları kapatılarak, Bio-Rad CFX96 Touch™ RT-PCR cihazına yüklenip üretici firmanın oluşturmuş olduğu PZR protokolü uygulandı. Protokol 95°C'de üç dakikalık ön inkübasyonu takiben, 95°C'de beş saniye protein denatürasyonu ile 55°C'de 30 saniye bağlanma ve uzama aşamalarını içeren 40 döngüden oluşur. Reaksiyonun kurulumunun iş akışına Şekil 3'te yer verilmiştir.

Tablo 3.3. Reaksiyon kurulum hacimleri

	Strip	**Kullanılacak Bileşen**	**1 Strip İçin Hazırlanacak Miktar**		**1 Kuyucuk İçin Dağıtılacak Miktar**	**Kuyucuk İçeriği**	**Toplam Reaksiyon Hacmi**
Test Edilecek Numune	SE	2X qPCR Mix Numune Ekstraktı	90 µl 45 µl	135 µl	15 µl	5 µl	20 µl
NTC	SE	2X qPCR Mix NTC	90 µl 45 µl	135 µl	15 µl	5 µl	20 µl
PC	PC-SE	2X qPCR Mix	90 µl	90 µl	10 µl	10 µl	20 µl



Şekil 3.3. Bio-Speedy® Sepsis qPCR MX-30S panel PZR kurulumu

3.2.4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

"Threshold döngü sayısını" (Cq) hesaplamak için üretici tarafından önerilen eşik (threshold) seviyesi CFX96 touch TM cihazı için 200 RFU'dur. Amplifikasyon sonrasında, tüm amplifikasyon eğrilerinin şekilleri incelendi ve cihaz yazılımı tarafından numuneye bir Cq değeri atanmışsa ya da eğri sigmoidal ise Cq değeri son değerlendirme için kullanıldı. Sigmoidal olmayan eğriler negatif olarak değerlendirildi.

a. Kit Kontrollerin Değerlendirilmesi:

Her çalışma için, PC (Pozitif reaktif kontrol), NTC (Kontaminasyon kontrol) ve her numune için insan mRNA'sını test eden IC (Örneklem, RNA bütünlüğü, nükleik asit ekstraksiyonu ve ters transkripsiyon, qPCR inhibisyonu kontrolü) değerlendirildi. Cq değerlerine göre:

- PC → Cq≤38.0 ise geçerli,
- NTC → Cq yok ise geçerli,
- IC → Cq≤34.0 ise geçerli olarak değerlendirildi.
  (**IC Cq>34 iken hedef Cq≤38 ise, IC geçerlidir)

b. Bakteriyel Hedeflerin Değerlendirilmesi:

- Cq≤28.0 ise pozitif,
- Cq>28.0 ise negatif olarak değerlendirildi.

c. Maya Hedeflerinin Değerlendirilmesi:

- Cq≤35.0 ise pozitif,
- Cq>35.0 ise negatif olarak değerlendirildi.

d. İlaç Direnç Gen Hedeflerinin Değerlendirilmesi:

VanA, vanB (vankomisin direnci), OXA-48, KPC, NDM, VIM, IMP (karbapenem direnci), *mecA/C* (metisilin direnci)

- Cq≤35.0 ise pozitif,
- Cq>35.0 ise negatif olarak değerlendirildi.

e. Bir Numunede Birden Fazla Parametre Pozitif Sonuç Verdiğinde Değerlendirme:

- En düşük Cq veren parametre belirlendi (Min Cq).
- Diğer parametrenin Cq değeri - Min Cq <7 ise her iki parametre için pozitif sonuç verildi.
- Diğer parametrenin Cq değeri - Min Cq ≥ 7 ise Cq değeri yüksek olan parametre için negatif sonuç verildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışma verileri, günlük olarak Microsoft Excel 2019 programına kaydedildi. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics Version 25.0 programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler, sayısal değişkenler için minimum, maksimum, ortalama, standart sapma, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız iki grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında, veriler normal dağılmadığında Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm analizler, %95 güven aralığında gerçekleştirildi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi, $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

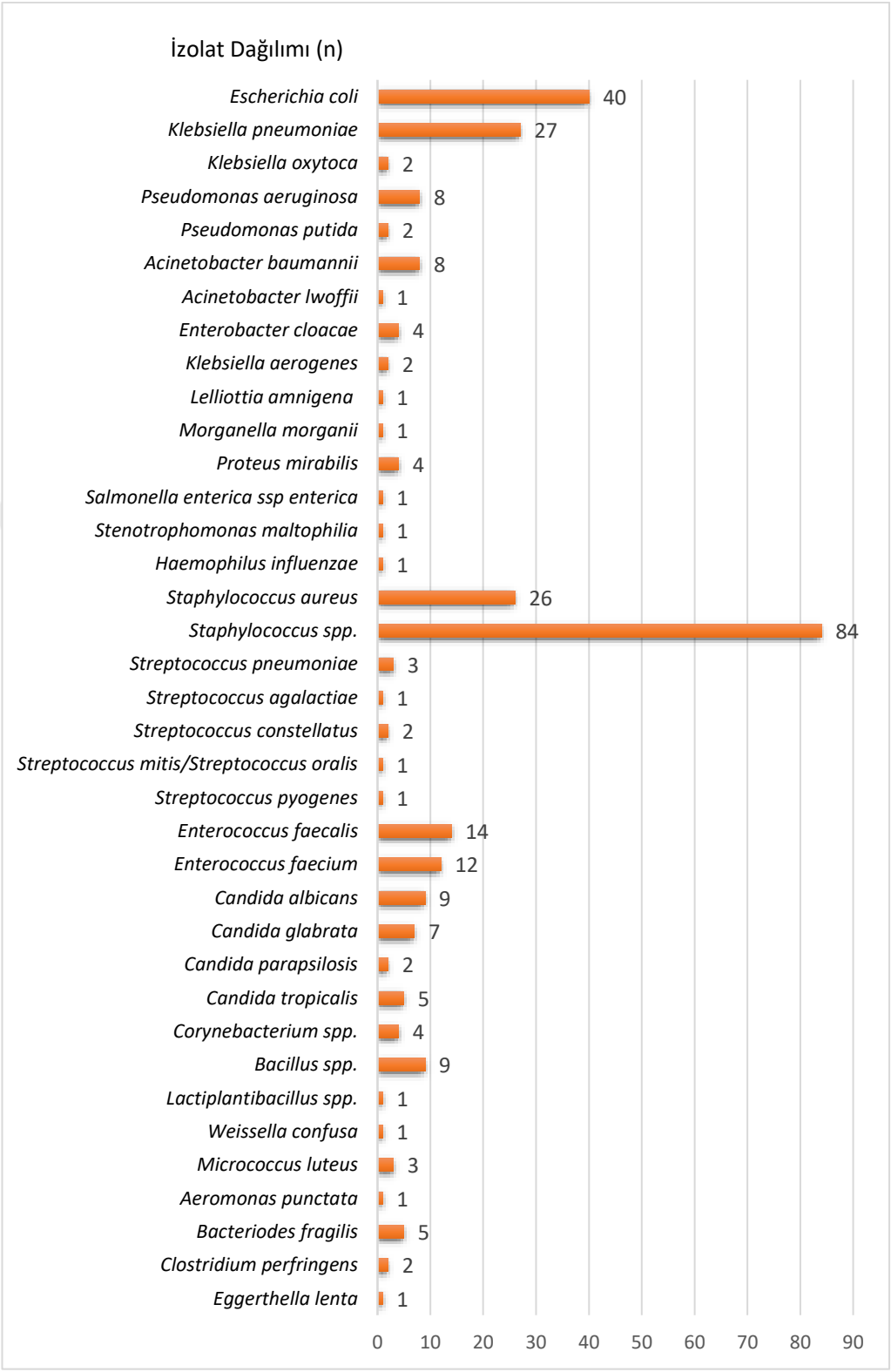
4.1. Çalışma Popülasyonu

Çalışmamızda, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Seyrantepe Yerleşkesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Mart 2022-Temmuz 2022 tarihleri arasında kliniklerden gönderilmiş ve 00.00-17.00 saatleri arasında pozitif üreme sinyali alınmış 230 hastanın, 162 aerobik ve 94 anaerobik olmak üzere 256 kan kültürü şişesi prospektif olarak incelendi.

Kan kültürü örnekleri incelenen hasta popülasyonunun 82'si (%35,65) kadın, 148'i (%64,34) erkekti. Hastaların yaşları 18 ile 101 arasında olup, yaş ortalaması 67.75 ± 15.83, medyanı 69 olarak belirlendi.

4.2. Kültür ile Rutin Tanımlama Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 256 kan kültürü örneğinde, 148'i (%49,66) gram pozitif kok, 109'u (%36,57) gram negatif basil, 17'si gram pozitif basil (%5,70), 24'ü (%8,05) maya olmak üzere toplam 298 patojen tanımlandı. En fazla, Koagülaz negatif stafilokoklar (84, %28,2), *Escherichia coli* (40, %13,4) ve *Klebsiella pneumoniae* (27, %9,1) izole edildi. Patojen dağılımına Şekil 4.1 ve Tablo 4.1'de yer verilmiştir.



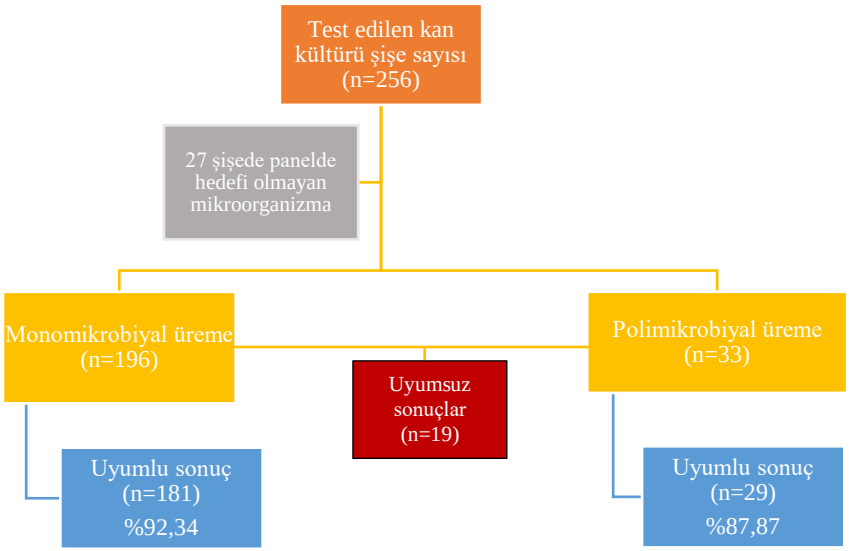
Şekil 4.1. Kan kültüründe üreyen mikroorganizmaların dağılımı

Tablo 4.1. Kan kültüründe üreyen *Staphylococcus* spp. izolatlarının dağılımı

İzolat	n
Staphylococcus epidermidis	35
Staphylococcus hominis	29
Staphylococcus haemolyticus	12
Staphylococcus capitis	4
Staphylococcus pettenkoferi	2
Staphylococcus auricularis	1
Staphylococcus simulans	1

4.3. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Paneli Tanımlama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Araştırmamızda test ettiğimiz 256 kan kültürü örneğinin 27'si (%10,54) panelde hedefi bulunmayan mikroorganizmaları içermesi nedeni ile analiz dışı bırakıldı. Bu örneklere bölüm 4.5'te yer verilmiştir. Araştırmamızda analiz ettiğimiz 229 kan kültürü örneğinin, 196'sında monomikrobiyal, 33'ünde polimikrobiyal üreme görüldü. Monomikrobiyal üremesi olan 196 örneğin 181'inde (%92,34), polimikrobiyal üremesi olan 33 örnekte ise 29'unda (%87,87) kültür tanımlamaları ve PZR uyumluydu. 15'i monomikrobiyal, 4'ü polimikrobiyal olan 19 örnekte iste kültür ve PZR uyumsuzluğu mevcuttu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Bio-speedy'nin performansının değerlendirilmesi

Monomikrobiyal üremesi olan 196 örneğin, 77'si gram negatif basil, 96'sı gram pozitif kok, 23'ü mayaydı. Panel, gram pozitif izolatların %94,79'unda doğru tanımlama yapılabildi. Kültürde üreyen üç *Staphylococcus spp.* ve iki *Streptococcus spp.* PZR ile tanımlanamadı. Gram negatif izolatların %96,10'unda PZR ile doğru sonuç elde edildi. Üç *Proteus mirabilis* izolatı PZR ile tanımlanamadı. Mayaların %100'ü ise PZR ile doğru olarak tanımlandı. Tanımlama sonuçları Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S panel hedefleri ve monomikrobiyal üreme gösteren örneklerde tanımlama sonuçları

VITEK-MS tanımlama	**n**	**PZR**							
		Tür	Cq değeri			Cins / Aile	Cq değeri		
			Ort	**Min**	**Maks**		**Ort**	**Min**	**Maks**
Escherichia coli	33	33	17,03	11,46	22,33	33	17,66	15,11	23,65
Klebsiella pneumoniae	20	20	14,84	12,70	19,14	20	16,82	13,18	21,07
Klebsiella oxytoca	1	1	17,21			1	18,12		
Pseudomonas aeruginosa	5	5	20,74	16,20	23,47	5	16,57	15,05	19,12
Pseudomonas putida	1					**0***			
Acinetobacter baumannii	5	5	18,84	16,71	21,18				
Enterobacter cloacae	4					4	17,94	15,26	21,12
Klebsiella aerogenes	2					2	15,34	15,02	15,67
Morganella morganii	1					1	17,87		
Proteus mirabilis	3					**0**			
***Salmonella* ssp.**	1					1	18,53		
Haemophilus influenzae	1					1	22,12		
Staphylococcus aureus	23	23	17,68	11,41	22,30	23	18,91	13,44	24,18
***Staphylococcus* spp.**	50					**47**	**20,94**	**15,04**	**26,12**
Streptococcus pneumoniae	2	2	13,68	12,32	15,05	2	21,41	20,13	22,69
Streptococcus agalactiae	1					1	23,10		
Streptococcus constellatus	2					**1**	23,12		
Streptococcus mitis/oralis	1					**0**			
Streptococcus pyogenes	1					1	24,96		
Enterococcus faecalis	7	7	18,95	14,23	22,43				
Enterococcus faecium	9	9	17,94	15,66	23,56				
Candida albicans	9	9	23,59	21,16	27,04				
Candida glabrata	7	7	23,62	20,49	33,9				
Candida parapsilosis	2	2	23,12	22,11	24,14				
Candida tropicalis	5	5	21,58	17,51	24,86				

**Pseudomonas putida PZR ile P. aeruginosa olarak isimlendirildi*

Polimikrobiyal üreme olan 33 örnekte, 68 mikroorganizma izole edildi (31 örnekte 2 mikroorganizma, 2 örnekte 3 mikroorganizma). Panel 33 örneğin tamamında en az bir mikroorganizmayı tür ya da cins/aile düzeyinde doğru tanımladı; 29'unda ise sonuçlar tüm üreyen mikroorganizmalar için kültürle tamamen uyumlu bulundu (%87,87). En sık iki koagülaz negatif stafilokokların birlikteliği (n=8), daha sonra *Enterococcus faecalis* ile koagülaz negatif stafilokok birlikteliği (n=6) saptandı. Polimikrobiyal üremelerde PZR tanımlama sonuçları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S panel hedefleri ve polimikrobiyal üreme gösteren örneklerde tanımlama sonuçları

Hasta No	**VITEK-MS**		**PZR**	
	Mikroorganizma	**n**	**Tür**	**Cins/Aile**
6, 58, 97, 145, 151, 162, 183, 188	Koagülaz negatif stafilokok Koagülaz negatif stafilokok	8	x	*Staphylococcus* spp. (8)
44, 71, 93, 165, 178, 185	*Enterococcus faecalis* Koagülaz negatif stafilokok	6 *	*Enterococcus faecalis* (4)	*Staphylococcus* spp. (6)
197	*Enterococcus faecium* Koagülaz negatif stafilokok	1	*Enterococcus faecium* (1)	*Staphylococcus* spp. (1)
89, 160, 223	*Staphylococcus aureus* Koagülaz negatif stafilokok	3	*Staphylococcus aureus* (3)	*Staphylococcus* spp. (3)
215, 253	*Klebsiella pneumoniae* *Acinetobacter baumannii*	2	*Klebsiella pneumoniae* (2) *Acinetobacter baumannii* (1)	*Enterobacterales* (2)
55, 212	*Klebsiella pneumoniae* *Escherichia coli*	2	*Escherichia coli* (2) *Klebsiella pneumoniae* (2)	*Enterobacterales* (2)
96	*Escherichia coli* *Proteus mirabilis*	1	*Escherichia coli* (1)	*Enterobacterales* (1)
171	*Escherichia coli* *Lelliottia amnigena*	1	*Escherichia coli* (1)	*Enterobacterales* (1)
175	*Escherichia coli* *Klebsiella aerogenes*	1	*Escherichia coli* (1)	*Enterobacterales* (1)
43	*Streptococcus pneumoniae* Koagülaz negatif stafilokok	1	*Streptococcus pneumoniae* (1)	*Streptococcus* spp. (1) *Staphylococcus* spp. (1)
84	*Acinetobacter baumannii* Koagülaz negatif stafilokok	1	*Acinetobacter baumannii* (1)	*Staphylococcus* spp. (1)
251	*Klebsiella pneumoniae* *Pseudomonas aeruginosa*	1	*Klebsiella pneumoniae* (1) *Pseudomonas aeruginosa* (1)	*Enterobacterales* (1) *Pseudomonas* spp. (1)
73	*Klebsiella pneumoniae* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*	1	*Escherichia coli* (1) *Klebsiella pneumoniae* (1) *Pseudomonas aeruginosa* (1)	*Enterobacterales* (1) *Pseudomonas spp.* (1)
238	*Pseudomonas aeruginosa* *Enterococcus faecium*	1	*Pseudomonas aeruginosa* (1) *Enterococcus faecium* (1)	*Pseudomonas* spp. (1)
255	*Pseudomonas putida*** Koagülaz negatif stafilokok	1	x	*Staphylococcus* spp. (1)
111	*Escherichia coli* *Klebsiella oxytoca*	1	*Escherichia coli* (1) *Klebsiella oxytoca* (1)	*Enterobacterales* (1)
259	*Stenotrophomonas maltophilia* Koagülaz negatif stafilokok	1	*Stenotrophomonas maltophilia* (1)	*Staphylococcus* spp. (1)

* Numunelerin birinde *Enterococcus faecalis* ile birlikte iki farklı KNS izole edildi.
***Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlandı.

Monomikrobiyal üremesi olan örneklerin %8,28'inde ve polimikrobiyal üremesi olan örneklerin %12,12'inde rutin tanımlama ve PZR uyumsuzluğu tespit edildi.

Tablo 4.4. Rutin kan kültürü tanımlama ile uyumsuz PZR sonuçları

Hasta No	Standart Kültür Tanımlama Sonuçları	PZR tanımlama sonuçları (Tür, Cins/Aile)	
Monomikrobiyal Üremeler			
10	*Staphylococcus hominis*		x
14	*Staphylococcus epidermidis*		x
24	*Staphylococcus haemolyticus*		x
35	*Streptococcus constellatus*		x
39	*Streptococcus mitis/Streptococcus oralis*		x
230	*Streptococcus pneumoniae*	*Streptococcus pneumoniae*	*Staphylococcus spp.* *Streptococcus spp.*
98	*Enterococcus faecalis*	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus spp.*
112	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus faecium*	*Staphylococcus spp.*
121	*Enterococcus faecalis*	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus spp.*
41	*Escherichia coli*	*Escherichia coli* *Enterococcus faecalis*	*Enterobacterales*
75	*Proteus mirabilis*		x
208	*Proteus mirabilis*		x
141	*Proteus mirabilis*		x
204	*Acinetobacter baumannii*	*Acinetobacter baumannii*	*Staphylococcus spp.*
90	*Pseudomonas putida*	*Pseudomonas aeruginosa*	x
Polimikrobiyal üremeler			
93	*Staphylococcus epidermidis* *Enterococcus faecalis*	x	*Staphylococcus spp.*
185	*Staphylococcus simulans* *Enterococcus faecalis*	x	*Staphylococcus spp.*
253	*Klebsiella pneumoniae* *Acinetobacter baumannii*	*Klebsiella pneumoniae*	*Enterobacterales*
255	*Staphylococcus hominis* *Pseudomonas putida*	x	*Staphylococcus spp.*

4.4. Antibiyotik Direnç Sonuçları

4.4.1. Karba-NP ve VITEK-2 ile Elde Edilen Antibiyotik Direnç Sonuçları

Laboratuvarımızda rutinde kullanılan VITEK-2 otomatize sistemi ile elde edilen gram negatif izolatlardaki antimikrobiyal direnç sonuçlarına Tablo 4.3'te yer verilmiştir. *Enterobacterales* ailesi içinde, *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının, en yaygın karbapenem direncine sahip olduğu görüldü (16, %59,25). Tüm izolatlar arasında ise *Acinetobacter baumannii* %100 karbapenem dirençli idi. Çalışmamıza dahil ettiğimiz *Escherichia coli* izolatlarında karbapenem direncine rastlanmadı.

Tablo 4.5. Gram negatif izolatlarda antimikrobiyal direnç durumu

Mikroorganizma	n	KOL R*	CZA R**	MP R***	IMP R***	ETP R***
Escherichia coli	40	0	0	0	0	0
Klebsiella pneumoniae	27	6	0	**14**	**14**	**16**
Klebsiella oxytoca	2	0	0	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	8	0	0	**2**	**3**	NA
Pseudomonas putida	2	0	0	0	0	NA
Acinetobacter baumannii	8	1	NA	**8**	**8**	NA
Enterobacter cloacae	4	0	0	0	0	1
Klebsiella aerogenes	2	0	0	0	0	0
Morganella morganii	1	1	0	0	0	0
Proteus mirabilis	4	NA	0	0	1	0

*Kolistin mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır.

** CZA disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır

***MP: Meropenem, IMP: İmipenem ve ETP: Ertapenem VITEK-2 otomatize sistemi ile çalışılmıştır.

Çalışmamızda VITEK-2 sistemi ile karbapenemlerden en az birine dirençli olan izolatlar arasında, Karba-NP ve mCIM testleri ile 16 *Klebsiella pneumoniae* izolatının 14'ünde karbapenemaz aktivitesi saptanırken, üç *Pseudomonas aeruginosa* izolatında herhangi bir pozitiflik saptanamamıştır.

Tablo 4.6. Hızlı test ile elde edilen sonuçlar

	n	VITEK-2 Karbapenem dirençli	VITEK-2 Karbapenem duyarlı	Karba-NP/ mCIM pozitif	Karba-NP/ mCIM negatif
Klebsiella pneumoniae	27	16	11	14	13
Pseudomonas aeruginosa	8	3	5	0	8

Gram pozitif izolatlarda VITEK-2 otomatize sistemi ile elde edilen antimikrobiyal direnç sonuçlarına Tablo 4.7'de yer verilmiştir. *Staphylococcus aureus* izolatlarında metisilin direnç oranı %11,53 olarak saptandı. Hastanemiz yoğun bakımlarında yatan iki hastada vankomisine dirençli enterokok tespit edildi. Tüm vankomisine dirençli enterokoklar, *Enterococcus faecium* olarak tanımlandı. Koagülaz negatif stafilokoklar arasında 75'i kontaminant bakteri olarak değerlendirilmiş olup (%89,28) enfeksiyon etkeni olarak görülen dokuzuna antibiyotik duyarlılık testi çalışıldı ve metisilin direnç oranı %88,8 olarak tespit edildi.

Tablo 4.7. Gram pozitif izolatlarda VITEK-2 ile tespit edilen antmikrobiyal direnç durumu

Mikroorganizma	n	MPR	IMPR	VAR	TER	FOXR	Metisiline Dirençli Stafilokok	Vankomisine Dirençli Enterokok
Staphylococcus aureus	26			0	0	3	3 (%11,53)	
Koagülaz negatif Stafilokok	9*			0	0	8	8* (%88,8)	
Enterococcus faecalis	14			0	0			
Enterococcus faecium	12			2	2			2
Streptococcus pneumoniae	3	0	0	0	0			
Streptococcus agalactiae	1	0	0	0	0			
Streptococcus constellatus	2	0	0	0	0			
Streptococcus mitis/oralis	1	0	0	0	0			
Streptococcus pyogenes	1	0	0	0	0			

*84 Koagülaz negatif Stafilokok arasında 9'u klinik olarak etken olduğu düşünülmüş, antibiyogram çalışılmıştır. Direnç sayıları bu numuneler için verilmiştir.

4.4.2. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S Paneli Direnç Tespiti

Çalışmamızdaki 84 izolatta direnç genlerinden biri veya birden fazlası saptandı. NDM, 46 izolatta tespit edildi ancak tespit edilen izolatların direnç profili ile uyumlu olmaması nedeniyle uygunsuz sonuç olarak kabul edilerek bu parametre değerlendirme dışı bırakıldı.

Polimikrobiyal üreme olan şişelerde tespit edilen direnç genlerinin hangi etkene ait olduğu saptanamayacağı için PZR ile tespit edilen direnç yüzdeleri monomikrobiyal üreme olan şişeler üzerinden hesaplanmıştır. Buna göre 12 karpabenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatının 10'unda (%83,33), PZR ile karbapenem direnç geni gösterilmiş olup yedi izolatta OXA-48 (%58,33), iki izolatta, KPC (%16,66), bir izolatta ise OXA-48 ve KPC (%8,33) birlikte pozitif saptanmıştır. PZR ile OXA-48 veya KPC saptanan tüm Klebsiella pneumoniae izolatlarında, karba-np ile karbapenemaz varlığı, VITEK-2 ile en az bir karbapeneme direnç gösterilmiştir. Standart kan kültürü işleyişinde dirençli olduğu gösterilen tüm VRE ve MRSA'larda panel *vanA* ve *mecA/C* direnç genleri saptanmıştır.

Tablo 4.8. Antimikrobiyal direnç saptanmasında VITEK-2 ile PZR'ın karşılaştırılması

İzolat	n	VITEK-2			PZR							
		CR	MR[a]	VR	OXA-48	KPC	OXA-48 + KPC	VIM	IMP	*van A*	*van B*	*mec A/C*
Monomikrobiyal örnekler												
Escherichia coli	33	0										
Klebsiella pneumoniae	20	12			7	2	1					
Diğer *Enterobacterales*	12	2										
Pseudomonas aeruginosa	5	3										
Acinetobacter baumannii	5	5						1				2[b]
Staphylococcus aureus	23		3[c]									4[c]
Koagülaz negatif Stafilokok	50		4[d]									28[d]
Enterococcus spp.	26			2						2		1[e]
Polimikrobiyal örnekler												
Klebsiella pneumoniae *Pseudomonas aeruginosa*	1	1 1			1							
Klebsiella pneumoniae *Acinetobacter baumannii*	2	2 2			1		1					
Koagülaz negatif Stafilokok Koagülaz negatif Stafilokok	8		NA NA									4
Staphylococcus aureus Koagülaz negatif Stafilokok	1		0 NA									1
Acinetobacter baumannii Koagülaz negatif Stafilokok	1	1	 NA									1

a. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır.
b. *Mec* A/C tespit edilen *Acinetobacter baumannii* içeren iki örnekte PZR ile *Staphylococcus spp.* pozitif saptanıp hastaya ait diğer şişelerde kültürde Koagülaz negatif Stafilokok üremesi oldu.
c. *Mec* A/C tespit edilen dört *Staphylococcus aureus*'tan üçünde disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci saptandı. Hastaya ait aynı koldan alınan diğer şişede koagülaz negatif stafilokok üredi.
d. Panel 50 KNS'nin toplam 28'inde Mec A-C direnç geni saptadı ancak bunlardan beşi klinik olarak etken düşünülerek antibiyotik duyarlılık testi çalışılan izolatlardı ve bu izolatların hepsi
e. *Mec* A/C tespit edilen bir şişede, *Enterococcus spp.* ile birlikte *Staphylococcus spp.* pozitif saptanmıştır (121 numaralı hasta).

4.5. Panel Dışı Mikroorganizmalar İçeren Kan Kültürlerinin İncelenmesi

Araştırmamızda incelediğimiz 256 kan kültürü örneğinin 27'sinde üreyen en az bir izolat Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S panelinin hedeflerinde bulunmadığı için tanımlanamadı (%10,54). 27 örneğin 22'si monomikrobiyal, beşi polimikrobiyaldi. Beş örneğin birinde üreyen iki bakteri de panel hedeflerinde mevcut değilken, dört örnekte ise tanımlanamayan mikroorganizma ile birlikte bulunan diğer mevcut mikroorganizmaların tümü PZR ile tanımlandı. Bir örnekte, kültürde tespit edilememiş ancak hastanın analiz edilen şişesi ile aynı anda laboratuvara gönderilen diğer üç şişesinde üreyen *Staphylococcus aureus* tespit edildi. Tablo 4.9'da kültürde izole edilen ancak panelde bulunmayan etkenleri içeren şişelerdeki üremeler gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Panelde bulunmayan etkenleri içeren şişelerdeki üreme dağılımları

İZOLAT DAĞILIMI	n	PZR
Bacillus altitudinis/pumilus	3	
Bacillus cereus group	1	
Bacillus licheniformis	1	
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens/vallismortis	1	
Bacteriodes fragilis	5	
Clostridium perfringens	2	
Corynebacterium afermentans	1	
Corynebacterium striatum	1	
Eggerthella lenta	1	
Lactiplantibacillus spp.	1	
Micrococcus luteus	3	
Trichosporon asahii	1	
Weissella confusa	1	
Acinetobacter lwoffii ***Bacillus altitudinis/pumilus***	1	
Corynebacterium striatum *Klebsiella pneumoniae* (CR) *Enterococcus faecalis*	1	*Klebsiella pneumoniae* *Enterococcus faecalis* OXA-48
Corynebacterium amycolatum *Staphylococcus haemolyticus*	1	*Staphylococcus spp.* *mec* A/C
Bacillus licheniformis *Enterococcus faecium*	1	*Enterococcus faecium*
Bacillus altitudinis/pumilus *Staphylococcus epidermidis* *Staphylococcus hominis* *(diğer şişede S. aureusu var)*	1	*Staphylococcus spp.* *Staphylococcus aureus*

4.6. Sonuç Verme Süreleri

4.6.1. Tanımlama Süreleri

Araştırmamızda, Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S paneli ile ortalama tanımlama süresi 5,04 saat olarak tespit edildi. Bu süre, rutin uygulama olan, kültür sonrası VITEK-MS'in 21,49 saat tanımlama süresinden 16,45 saat daha kısaydı. Bu süre farkının mayalarda en yüksek (21,48 saat), gram negatiflerde en düşük olduğu gözlendi (12,50 saat). Her bir parametre için süreler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). Her iki yöntemle de elde edilen ortalama sonuç verme sürelerinin saat cinsinden karşılaştırılması Tablo. 4.10'da gösterildi.

Tablo 4.10. PZR ve VITEK-MS ile ortalama sonuç verme süreleri

	PZR Sonuç Verme Süresi *Mean±SD* (%95 GA)	**Kültür Sonuç Verme Süresi** *Mean±SD* (%95 GA)	***p***	**Sonuç Süreleri Arasındaki Fark**
Monomikrobiyal Tüm Örnekler (n=196)	**5,04** ± 2,93 (4,62-5,46)	**21,49** ± 8,91 (20,23-22,74)	p<0,05	**16,45**
Gram pozitif (n=96)	**4,97** ± 3,05 (4,33-5,61)	**23,38** ± 8,25 (21,70-25,05)	p<0,05	**18,41**
Gram negatif (n=77)	**5,09** ± 2,79 (4,44-5,74)	**17,59** ± 8,93 (15,56-19,62)	p<0,05	**12,50**
Maya (n=23)	**5,17** ± 3,00 (3,87-6,47)	**26,65** ± 6,16 (23,98-29,31)	p<0,05	**21,48**
Polimikrobiyal Örnekler (n=68)	**5,53** ± 2,76 (4,83,6,22)	**27,05** ± 10,51 (24,50-29,60)	p<0,05	**21,52**

4.6.2. Direnç Tespit Süreleri

Klebsiella pneumoniae izolatlarında PZR ile karbapenem direnci rutin yönteme kıyasla 15,86 saat daha erken tespit edildi. Bu süre hesaplanırken, *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında hızlı test ile saptama süreleri ve PZR karşılaştırıldı. Vankomisin direnci, PZR ile rutin yöntemden 22,83 saat; metisilin direnci 44,58 saat önce saptanabildi.

Tablo 4.11. PZR, hızlı test ve VITEK-2 ile saptanan dirençlerin süre karşılaştırılması

	PZR Panel Direnç Tespit Süresi (TS)	**Hızlı Test* Ortalama Direnç Tespit Süresi (TS)**	**Standart Antibiogram Direnç Tespit Süresi (VITEK-2)**	**Hızlı test ve PZR TS farkı**	**Standart antibiogram ve PZR TS farkı**
CR *Klebsiella pneumoniae* (n=10)	**5,39**	**18,13**	**38,90**	**12,74**	**33,51**
CR *Klebsiella pneumoniae* (n=2)	**x**	**x**	**x**	**x**	**x**
VR *Enterococcus spp.* (n=2)	**10,49**	NA	**33,32**	NA	**22,83**
MR** *Staphylococcus aureus* (n=3)	**4,71**	NA	**49,29**	NA	**44,58**

CR: Karbapenem dirençli, VR: Vankomisin dirençli, MR: metisilin dirençli

*Hızlı test: Karba-NP, mCIM testleri direkt üreyen koloniden çalışılmıştır.

**Sefoksitin disk ile doğrulanmış sonuçlar

TS'ler pozitif sinyal saatinden itibaren hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli işlevlerinden biri kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların tespiti ve karakterizasyonudur. Çünkü tedavi stratejilerinde gelişmeler olmasına rağmen sepsisin mortalitesi oldukça yüksektir [1], [33]. Sepsis Hayatta Kalma Kampanyası yönergelerine göre, patojenlerin tanımlanmasından önce ampirik olarak geniş spektrumlu antibiyotiklerin uygulanmasını önerilmektedir [34], [35]. Ancak şiddetli sepsis hastalarının yaklaşık %20-30'unun yetersiz ampirik antimikrobiyal tedavi almakta olduğu bildirilmiştir [36]. Etkili antibiyotik tedavisinin gecikmesi mortalite riskini artırır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) veya karbapenem dirençli *Enterobacterales* (CRE) gibi dirençli bakterilerin ortaya çıkması nedeniyle antibiyotik tedavisinin optimizasyonu bir zorunluluktur. Ayrıca bunun yanında, gereksiz antibiyotik kullanımıyla oluşan seçim baskısı, bulaşıcı hastalıkların tedavisi için büyük bir zorluk oluşturan antibiyotiğe dirençli suşların artan prevalansına katkıda bulunur [34]. Birden fazla antibiyotiğin rastgele kullanımı ayrıca ilaçlara özgü yan etkilere ve *C. difficile* enfeksiyonuna neden olabilir [36]. Tüm bu nedenler, sepsis yönetiminde patojenlerin ve antimikrobiyal direnç durumlarının doğru ve hızlı bir şekilde belirlenmesinin önemini artırmaktadır.

Geleneksel olarak, kan kültüründe KDE'ye neden olan patojenlerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması, çoklu inkübasyon adımlarını içerdiğinden zaman alıcı bir yöntemdir. Otomatik sistemlerdeki son gelişmeler, kan kültüründe patojenlerin tanımlanması için gereken süreyi yaklaşık 10-24 saate kadar önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, direkt pozitif kan kültüründen MALDI-TOF MS uygulanmasının geliştirilmesi, patojenlerin pozitif sinyal alındıktan sonra birkaç dakika içinde tanımlanmasını büyük ölçüde mümkün kılmıştır [24]. Yapılan çalışmalarda, MALDI-TOF MS kan kültüründen direkt tanımlamada yüksek performans göstermiştir ancak bu yöntem ile patojenin antibiyotik direnç durumu analiz edilememektedir. Direnç tespiti için ek olarak antibiyotik duyarlılık testi uygulanır ve bu yöntem yaklaşık 24 saat süreye ihtiyaç duymaktadır [34].

İlk olarak 2011 yılında solunum yolu etkenleri için geliştirilmiş, daha sonra pek çok başka sistem için de geliştirilmiş olan sendromik paneller kan kültüründe bir

devrim yaratmıştır. Sendromik PZR testleri, KDE'lere neden olan mikroorganizmaların çoğunluğu ve tedavi gerektirmeyen yaygın görülen kontaminantlar için hızlı tanımlama sağlamaktadır. Bu tahliller, geleneksel kültür ve tanımlama yöntemlerinden 18-24 saat önce tanımlama sağlar [8].

Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S panel performansını değerlendirmeyi amaçladığımız araştırmamızda, 229 pozitif kan kültürü şişesinden direkt PZR testi sonucuna göre Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S paneli ile %91,70 oranında kültürle uyumlu tanımlama gerçekleştirilmiş olup hem monomikrobiyal hem de polimikrobiyal üremesi olan örneklerde, KDE'ye en sık neden olan *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* izolatlarının tamamı tür düzeyinde doğru tespit edildi (%100). Bununla birlikte PZR ile ortalama sonuç verme süresi ise rutin tanımlamaya göre 16,45 saat kısaldığı görüldü. Bio-Speedy sepsis paneli ile ilgili daha önce yayınlanmış çalışma bulunmamakla birlikte Türkiye'de direkt kan kültürü şişesinden yapılmış olan multiplex panel tabanlı PZR testi kullanan araştırma mevcut değildir. Ward ve ark. pozitif kan kültürlerinde geleneksel MALDI-TOF MS tabanlı yöntemlerle Verigene ve BCID multipleks testlerin doğruluklarını ve geri dönüş sürelerini karşılaştırmıştır. Araştırma sonucuna göre bu testlerin, geleneksel yöntemlere kıyasla geri dönüş süresini sırasıyla 27,9 ve 29,1 saat azalttığı; Verigene ve BCID testlerinin, geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında sırasıyla numunelerin %90,6'sı ve %87,2'si için doğru tanımlama sağladığı tespit edilmiştir [37].

Bhatti ve arkadaşlarının, BCID ve Verigene testlerinin performanslarını geleneksel, kültür tabanlı yöntemlerle (Vitek MS) kıyasladıkları araştırmada, monomikrobiyal kültürlerde tanımlanabilir izolatların BCID ve Verigene testleriyle sırasıyla %95'i ve %99'unun doğru şekilde tanımlandığı; her iki testte de konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa tanımlama süreleri olduğu bildirilmiştir (25,6 saate karşı 1,15 ila 2,5 saat) [38]. Altun ve ark. kan kültürü şişelerinde monomikrobiyal ve polimikrobiyal üreme için BCID panelinin klinik performansını ayrı ayrı değerlendirdi. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında (MALDI-TOF MS tabanlı koloni tanımlama), BCID testinin monomikrobiyal ve polimikrobiyal üremeler için tanımlama başarısını %91,6 (153/167) ve %71 (17/24) oranında saptamışlardır [39].

Walker T. ve ark. gram negatif bakterilere yönelik Verigene BC-GN panel ile yaptıkları çalışmada, PZR ile geleneksel kültür yöntemine kıyasla çok daha kısa sürede tanımlama sonucu elde etmişlerdir (10.9 saate karşı 37.9 saat). Banerjee R. ve ark. ise BioFire FilmArray Blood Culture ID Panel kullandıkları çalışmada gram boyama ile tanımlama arasındaki süreleri karşılaştırmışlar, otomatize tanımlama sistemine kıyasla daha kısa tanımlama süresi olduğunu göstermişlerdir (1,3 saate karşı 22,3 saat) [44].

Araştırmamızda, sendromik PZR paneli ile rutin tanımlamaya kıyasla gram negatiflerde 12,50; gram pozitif bakterilerde 18,41 ve mayalarda 21,48 saat daha erken tanımlama yapılmıştır. Gram negatif bakteriler gram pozitif bakterilere ve mayalara göre daha hızlı üreyerek laboratuvarımızda uyguladığımız kısa inkübasyon süreli tanımlama protokolünde daha erken tespit edilmiştir. Bu nedenle süreler arasındaki fark en az gram negatif bakterilerde iken, *Candida* türlerinin üreme hızlarının yavaş olması aradaki süre farkının fazla olmasına sebep olmuştur.

Kan dolaşımı enfeksiyon etkenleri çeşitli çalışmalarda farklı dağılım oranlarında bildirilmiştir. Ülkemizde, Çetin F. ve ark. yaptığı ve kan kültüründe izole edilen etkenlerin iki yıllık dağılımını inceledikleri çalışmada en sık izole edilen 10 etken koagülaz negatif stafilokoklar (%53,22), *E. coli* (%7,41), *Acinetobacter* spp. (%7,19), *S. aureus* (%5,96), *Klebsiella* spp. (%4,12), *Pseudomonas* spp. (%3,72), *Serratia marcescens* (%3,37), *E. faecalis* (%3,37), *E. faecium* (%2,80), *C. albicans* (%1,75) olarak tespit edilmiştir [45]. Turhanoğlu ve ark.'nın yaptığı beş yıllık değerlendirmede benzer oranlar tespit edilmiş; farklı olarak %2 oranında *Micrococcus luteus* izole edilmiştir [46]. Çeken ve ark. yaptığı çalışmada, kan kültüründen izole edilen gram negatif bakteriler arasında en sık *E. coli* (%38,7), *Klebsiella spp*. (%25,3), diğer *Enterobacterales*'ler (%12,3), *P. aeruginosa* (%10,1), *Acinetobacter baumannii* (%10) saptanmıştır [47]. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak kan kültüründe en sık saptanan gram negatif bakteriyel etkenler *E. coli* ve *K. pneumoniae* iken, koagülaz negatif stafilokoklardan sonra *S. aureus* ise en sık saptanan gram pozitif bakteriyel etkendir. Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S paneli, ülkemizde olduğu gibi hastanemizde de kan kültürü enfeksiyon etkeni olarak en sık karşılaşılan etkenleri kapsamaktadır.

Panel hedef yelpazesinin genişliği sonucu direkt olarak etkilemektedir. BioFire kan kültürü tanımlama 2 (BCID2) paneli, BCID'ye göre 17 ek hedef ve direnç geni içeren genişletilmiş bir paneldir. Yapılan BCID ve BCID2 karşılaştırma çalışmasında, süre olarak iki panel arasında fark bulunamamış; BCID panelinin kültür sonuçlarının %98'inde, BCID2 panelinin ise kültür sonuçlarının %97'sinde tüm hedef mikroorganizmaları doğru bir şekilde tanımladığı saptanmıştır. BCID2'de özellikle BCID panelinin saptayamadığı 13 *Enterococcus faecalis* izolatı saptanmış, bu da teorik olarak optimal antimikrobiyal tedavi süresinde 34 saatlik bir avantaj sağladığı belirtilmiştir [6]. BCID2 paneli, Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S panelinden farklı olarak bakteriyel etkenlerden *Proteus* spp., *Klebsiella aerogenes, Bacteriodes fragilis* ve iki farklı *Staphylococcus spp.* içermektedir. Çalışmamızda kültürde üreyen üç *Proteus mirabilis* izolatı PZR ile tanımlanamamıştır. Bununla birlikte çalışmamızda, hastanemizde en sık saptanan anaerop etkenin *Bacteriodes fragilis* olduğu görüldü (%1,67). Ancak panelde anaerop bakterilerin hiçbiri mevcut değildi. Bu nedenle panelde bu mikroorganizmaların bulunmasının faydalı olabileceği düşünüldü.

Kan kültürlerinin cilt florası ile kontaminasyonu kaçınılmazdır [11]. *Staphylococcus* spp. en yaygın kontaminant mikroorganizma olmakla birlikte, enfeksiyon etkeni de olabilir ve bu nedenle tanımlanması önemlidir. Araştırmamızda kültürde tek mikroorganizma olarak üreyen 81 *Staphylococcus* spp. PZR ile cins düzeyinde başarılı bir şekilde tanımlanmış ve 72'si kontaminant bakteri olarak değerlendirilmiştir. Bunun dışında, cilt flora elemanı olduğu varsayılan, başta izolatların %1'ini oluşturan *Micrococcus luteus* ve %3'ünü oluşturan *Bacillus* spp. olmak üzere diğer panel dışı mikroorganizmaların sayısı PZR tarafından tespit edilen birçok patojenden daha fazlaydı. Kan kültürlerinde yaygın görülen kontaminantın tanımlanması, deeskalasyonu sağlayabilir ve bu nedenle klinik olarak yararlı olabilir [48], [49].

Panel dışı mikroorganizmalar içeren 27 örneğin 23'ünde PZR ile hiçbir sonuç elde edilemedi, rutin kültürün sonuç verme süresine herhangi bir etkisi olmadı. Dört örnekte ise en az bir bakteri tanımlanmış olup tanımlanamayan mikroorganizmalar kontaminant olarak değerlendirildi. Bu örneklerden birinde, üreyen üç kontaminant mikroorganizmanın yanında, kültürde tespit edilememiş ancak hastanın analiz edilen

şişesi ile aynı anda laboratuvara gönderilen diğer üç şişesinde üreyen, hastanın esas KDE'sinin etkeni olan *Staphylococcus aureus* da tespit edildiği için panelin bu örneklerde kliniğe katkı sağlayacak sonuçlar verdiğini söyleyebiliriz.

Moleküler yöntemler cansız mikroorganizmalarda bulunan genetik materyali tespit edebildiğinden, PZR'ların yanlış pozitif sonuçlarının birkaç olası kaynağı vardır. Yanlış pozitif sonuçlarının ilk nedeni, numune alındığı sırada hastaların antibiyotik tedavisi almalarından kaynaklanan, cansız mikroorganizmalardır. Hasta başlangıçta polimikrobiyal bakteriyemi geçirmiş olabilir ve bir mikroorganizma kan kültürü şişelerinde üreyebiliyorken, diğer cansız mikroorganizma antibiyotik tedavisi nedeni ile kültürde üreyemez ve ancak PZR ile saptanabilir [33]. Yanlış pozitifliğin diğer bir nedeni kan kültürü şişelerindeki bileşenler olabilir. BacT/ALERT® FA Plus ve BacT/ALERT® FA Plus kültür şişelerinin prospektüsünde, şişelerdeki sıvının steril olmasına rağmen, canlı olmayan, Gram boyama ile boyanabilen mikroorganizmalar içerebileceği belirtilmektedir ve bu mikroorganizmalar moleküler tekniklerle de tespit edilebilir [31], [32]. Ayrıca şişelerdeki kontaminasyonlar da yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Yapılan bir araştırmada, PZR ile alınan yanlış pozitif sonuçların BacT/Alert standart anaerobik şişelerinin (bioMérieux) *Pseudomonas aeruginosa* DNA'sı ile kontaminasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir [37]. Bu nedenle multipleks moleküler paneller kullanılırken ve özellikle de test, kendileri testlerin parçası olmayan malzemeler (örn. kan kültürü şişesi içerikleri) içeriyorsa, kalite kontrol ölçümlerinin dikkatli bir şekilde geliştirilmesi gereklidir [40]. Alternatif olarak, canlı olmayan kontamine bir cilt florası elemanının kültür alınma sırasında kültür şişesine inokülasyonu yanlış pozitif PZR sonucuna neden olabilir. Araştırmamızda PZR ve kültür arasındaki 19 örnekte tutarsızlık mevcuttu ve bunlardan 6'sı yanlış pozitif sonuçlardı. Bu sonuçların analiz hatası olma olasılığı, örneklerin donmuş alikotlarının alt kültürlerinden mikroorganizmaların tanımlanması yapılarak araştırıldı. Buna göre, yanlış pozitif olarak değerlendirilen 6 örneğin 2'sinde yeniden yapılan kültür sonucuna göre Staphylococcus epidermidis ürediği gözlendi. Bu durum, hastaların almış oldukları antibiyotik tedavileri veya örnekte bulunan ve baskın olan diğer etkenlerin üremeyi baskılayabilmeleri sebebiyle kültürde saptanamayan etkenlerin PZR ile saptanabileceğine dikkat çekti ancak dört örnekteki

yanlış pozitiflik açıklanamadı. Bu sonuçlar, primer dizayn hatası ya da üretim hatası gibi kit kaynaklı nedenlerle de olabilir.

Polimikrobiyal KDE'li hastaların sayısı, dirençli bakterilerin artışı ve hastanede yatış süresinin uzaması nedeniyle artmaktadır. Bu nedenle, birkaç farklı izolatı tanımlama yeteneği, modern hızlı tanımlama yöntemleri için önemli bir parametredir. Direkt MALDI-TOF gibi hızlı tanımlama yöntemlerinin polimikrobiyal üreme gösteren örneklerde mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanımı oldukça azdır [24], [41]. Bio-Speedy sepsis paneli, karışık kültürlerdeki mikroorganizmaları saptama yeteneğine sahiptir. Araştırmamızda incelediğimiz klinik örneklerden 33'ü (%12,89) kültürde tanımlanabilen birden fazla mikroorganizma içeriyordu ve 29'unda üreyen tüm mikroorganizmalar PZR ile doğru tanımlanırken 4'ünde üreyen en az bir mikroorganizma doğru tanımlanmıştır. Bazı çalışmalar, çoklu mikroorganizmaların varlığının uyumsuz PZR sonuçlarına neden olduğunu göstermiştir ve araştırmacılar bu durumu, birden fazla mikroorganizma pozitif olan kültürlerde, birinin daha hızlı üreyerek kültür sisteminde pozitif sinyali tetikleyebileceği ancak pozitif sinyal anında, ikinci mikroorganizmanın moleküler tespit seviyesinin altında olabileceği ile ilişkilendirmişlerdir [42], [43]. Bu neden, araştırmamızda uyumsuz sonuç gördüğümüz polimikrobiyal örneklerde PZR'da KNS tespit edilebilirken ikinci mikroorganizmaların tespit edilememesinin nedeni olabilir (Tablo 4.4).

PZR panelinin geleneksel kültür yöntemine ve diğer hızlı tanımlama yöntemlerine göre güçlü yanı antibiyotik direnç genlerinin hızlı tespitidir. PZR ile sınırlı duyarlılık bilgisi, geleneksel fenotipik duyarlılık sonuçlarından 48 saat önce elde edilir [8]. Çalışmamızda da tüm VRE ve MRSA'lar, *van* A ve *mec* A/C genleri analiz edilerek başarılı bir şekilde, rutin kültür yönteminden çok daha kısa sürede tanımlanmış olup, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının %83,33'ünde karbapenem direncine neden olan gen kültürde üreyen bakteriden karbapenemaz saptanmasına kadar geçen süreden 12,74 saat daha erken saptanabilmiştir.

Bugüne kadar enterokoklar arasında dokuz tip glikopeptid direnci tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi klinik olarak daha anlamlı olanlarıdır. VanA fenotipi, *vanA* geni tarafından kodlanır ve vankomisinin yanı sıra teikoplanine karşı indüklenebilir yüksek düzey direnç söz konusudur. VanB fenotipi ise *vanB* geni

tarafından kodlanır ve yalnızca vankomisine karşı değişken (orta-yüksek) seviyelerde indüklenebilir direnç görülür. Teikoplanin, *vanB* genini indüklememesi sebebiyle duyarlı görülürken, VanB operonunun bir kez dahi eksprese edilmesi halinde teikoplanine de direnç gelişmektedir [26].

Enterokok enfeksiyonları arasında *E. faecalis*'in oranı diğer türlere göre fazla olmasına rağmen *E. faecium* izolatları daha sık görülen glikopeptit direnci nedeniyle ön plana çıkmaya başlamıştır. 2022'de yayınlanan, 2020 verilerini içeren CAESAR (The Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance network) raporunda Türkiye'deki *E. faecium* izolatlarında VRE oranının %15,4 olduğu bildirilmiştir [50]. Alçi ve arkadaşları, yatan hastalarda yaptıkları rektal tarama araştırmasında, 137 sürüntü örneğinde VRE pozitifliği saptamışlardır. İzole ettikleri VRE kökenlerinin büyük çoğunluğunu *E. faecium* (% 77,4) izolatları oluşturmuştur [51]. Fransa'da yapılan bir çalışmada da araştırmacılar, VRE'lerin büyük çoğunluğunun *E. faecium* izolatları olduğunu (%94,8); bu izolatların %65,8'inin VanA, %33,9'unun VanB, %0,2'sinin VanD fenotipi olduğunu saptamışlardır [52]. Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de Vankomisin direncine en sık *vanA* geni neden olmaktadır. Bilen ve arkadaşları, üç yıllık süreçte retrospektif olarak VRE'leri inceledikleri araştırmada, 27 vankomisin dirençli *E. faecium* izolatının hepsinde *vanA*; bu izolatların 1'inde *vanA-vanB* birlikteliği saptamışlardır [53]. Araştırmamızda, literatür ile uyumlu olarak 2 VRE'nin ikisi de *E. faecium* izolatıdır ve ikisinde de *vanA* geni saptanmıştır. Araştırmamızda kullandığımız panelde *vanA* ve *vanB* genleri ayrı ayrı tespit edilebilmektedir. Bu sayede herhangi birinin tespitinde tedavi direkt olarak optimize edilebilir.

Stafilokoklarda görülen *mecA* geninin veya yeni tanımlanan homoloğu olan *mecC* geninin aracılık ettiği metisilin direnci, hasta yönetimi üzerinde kritik bir etkiye sahip olduğundan çok önemli bir direnç mekanizmasıdır. 1980'lerin başından bu yana, sağlık hizmetiyle ilişkili MRSA'nın yaygınlığı birçok bölgede artmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa'da MRSA prevalansı %10 ila %50 arasında değişmektedir. MRSA'nın dünya çapında neden olduğu enfeksiyon yükü, son on yılda toplum kökenli MRSA'nın ortaya çıkması ve son zamanlarda çiftlik hayvanlarıyla ilişkili *S. aureus* enfeksiyonları nedeniyle daha da artmıştır. Yabancı, mobil bir DNA

elementi (SCCmec (stafilokokal kaset kromozomu *mec*)) üzerinde *S. aureus* ve diğer stafilokok türleri tarafından edinilen *mecA* geni ve homologları, geleneksel beta-laktam antibiyotiklerin azaltılmış aktivitelerinden sorumlu ek bir penisilin bağlayıcı protein (PBP), PBP2a veya PBP2c'yi kodlar [26]. Bu nedenle, MRSA suşlarında hücre duvarı biyosentezi β-laktam antibiyotiklerin varlığında bile devam eder. MRSA'nın saptanması, hem hastalara bireysel olarak uygun tedavi verilmesi hem de MRSA'nın sürveyansı için çok önemlidir.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, metisilin direncini tespit etmede oldukça başarılı olmasının yanında, MRSA'yı MSSA ve koagülaz negatif stafilokoklardan ayırmak için de kullanılır. Günümüzde, IDI-MRSA/GeneOhm MRSA (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, Amerika Birleşik Devletleri) ve GeneXpert MRSA (Cepheid, Sunnyvale, CA) dahil olmak üzere FDA onaylı, ticari olarak temin edilebilen iki PZR tabanlı test, MRSA'yı doğrudan klinik örneklerden saptamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki test de SCCmec'in sağ ucundaki J3 bölgesi ile bağlantılı olarak *S. aureus*'daki orfX geninin 3' ucunu hedefleyen, ancak doğrudan *mecA*'yı hedeflemeyen kantitatif, gerçek zamanlı PZR tabanlı yöntemlerdir [54]. BCID2 (Biofire) multiplex panelinde de MRSA ile MR-KNS (Metisilin Dirençli Koagülaz Negatif Stafilokok) ayrımını yapabilmek için panele *mecA/mecC*'nin yanında SCCmec sağ ekstremite bileşkesi (MREJ) eklenmiştir. Bu panel ile yapılan bir çalışmada, metisilin dirençli *S. epidermidis*'lerin %77'sinde *mecA/mecC* geni saptanmış; *S. aureus*'ların ise %18'inde *mecA/mecC* ve MREJ saptanarak MRSA ve MR-KNS ayrımı yapılmıştır [6].

Çalışmamızda disk difüzyon ile sefoksitin dirençli bulunan 3 MRSA izolatında ve sefoksitin duyarlı olan iki *S. aureus'*ta (MSSA) PZR ile *mecA/C* pozitif saptadık. MSSA'lardan birinde aynı şişede, diğerinde ise aynı hastanın farklı şişesinde kültürde koagülaz negatif stafilokok üremesi olduğu görüldü. PZR ile saptanan direnç genlerinin şişedeki hangi bakteriye ait olduğu ayırt edilemedi. Kontaminasyon olarak değerlendirilen bu iki KNS'nin direnç genine sahip olması, yanlışlıkla MRSA sonucu verilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle sendromik sepsis PZR panellerinde MRSA ile MR-KNS ayrımını sağlayan MREJ'in hedefler arasında yer almasının uygun olacağı düşünülmüştür.

GES-2 dışında, *P. aeruginosa'*daki tüm karbapenemazlar, genellikle metalloenzimler olarak adlandırılan Ambler sınıf B'ye aittir (NDM, VIM, IMP). Enzimatik olmayan karbapenem direnç mekanizmaları arasında, porin kodlayan genlerin ekspresyon kaybı, kromozomal olarak kodlanan porin genlerindeki mutasyonlar ve akış pompalarını kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu yer alır [55]. Araştırmamızda üç karbapenem dirençli *P. aeruginosa'*da karba-np ile karbapenemaz aktivitesi, PZR ile karbapenemaz geni saptanmama nedeni bu suşlarda enzimatik olmayan diğer mekanizmaların karbapenem direncine neden olması olabilir.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarından 2'sinde karba-np ile karbapenemaz aktivitesi, PZR ile karbapenemaz geni saptanmadı. Bu iki izolatın karbapenem direncinin non-enzimatik mekanizmalar kaynaklı olabileceği düşünüldü. KDE'ler için sendromik paneller kültüre ek bir test olarak kullanılmaktadır. Ancak yalnızca direnç genlerini saptayabilmesi sebebiyle kültür veya antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yerine geçmez, ön bilgi vermekte faydalıdır [8].

Multiplex PZR tabanlı platformların bazı sınırlaması mevcuttur. Bunlardan ilki tanımlanacak olan türlerin ve direnç genlerinin sadece üretici tarafından belirlenenlerle kısıtlı olmasıdır. Diğer bir sınırlama ise testlerin maliyetidir. Bu testlerin ülkemizde sosyal güvenlik kurumu tarafından karşılanmadığından kamu laboratuvarlarında sepsis panelleri sadece araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Sendromik PZR panelleri, üreticiye, kullanılan kite ve yönteme bağlı olarak, ekstraksiyondan PZR kurulumuna kadar gerçekleşen tüm işlemlerin hataya açık olmaları nedeni ile tecrübeli personel gerektirmektedir. Yeni geliştirilecek olan sürümlerle veya tüm aşamaların kapalı sistemde otomatize olarak yapıldığı kapalı test sistemleri ile iş akışı sırasında oluşabilecek aksaklıkların önüne geçilebilir.

Bio-Speedy sepsis paneli, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. bakteri cinslerini ve *Enterobacterales* ailesinin üyelerini içermektedir. Buna göre PZR sonuçları değerlendirilirken tek başına *Staphylococcus* spp. pozitifse, kültürün *Staphylococcus* cinsinin bir üyesini içerdiği belirlenebilmektedir. Bununla birlikte aynı numunede *S. aureus* da pozitif ise diğer stafilokokların varlığı/yokluğu hakkında yorum yapılamaktadır. Benzer şekilde panel,

örnekte bir *Pseudomonas* ya da *Streptococcus* türünün veya *Enterobacterales* ailesinin bir üyesinin varlığını saptarsa, aynı numunede panelde tür düzeyinde tanımlama yapılabilecek hedefi bulunmayan aynı cinsten ya da aileden ikinci bir mikroorganizmanın varlığı ya da yokluğu hakkında yorum yapılamaması bir diğer kısıtlılıktır.

Araştırmamızın temel sınırlılığı, pozitif sinyal alınan şişeden PZR uygulamasının yalnızca mesai saatleri içerisinde yapılmış olmasıdır. Bu durum, saat 00:00 ile 08:00 arasında pozitif sinyal veren şişelerde PZR ile daha geç sonuç alınmasına neden olmuştur. İdeal uygulama, pozitif sinyal alınmasının hemen ardından her şişeye PZR yapılmasıdır. Çalışmanın bu şekilde uygulanması, sonuç verme süresinde daha fazla iyileşme sağlayacaktır.

Araştırmamızın diğer bir sınırlılığı ise tek merkezli dizayn edilmiş olması ve izolat sayısının kısıtlılığıdır. Özellikle *Listeria monocytogenes* ve *Neisseria meningitidis* gibi nadir izole edilen etkenler çalışmamızda tespit edilmemiş; KDE'lere neden olan MRSA, VRE izolatların düşük prevalansı dikkate alındığında yalnızca sınırlı sayıda örnek dahil edilmiştir. Karbapenem dirençli *E. coli*'nin ise çalışmamıza dahil izolatlarda mevcut olmaması nedeniyle, panelin bu bakteri için direnç genlerini tespit etme yeteneği hakkında bir sonuç elde edilememiştir.

SONUÇLAR

Araştırmamızda, standart kültür yönteminden daha hızlı sonuç veren sepsis PZR paneli ile %91,70 oranında kültürle uyumlu tanımlama sonuçları elde edildi.

229 kan kültürü örneğininde monomikrobiyal üremesi olan örnekler arasında gram pozitif izolatların %94,79'u, gram negatif izolatların %96,10'u, mayaların tümü PZR ile doğru tanımlandı (%100). Polimikrobiyal üremesi olan örneklerde ise %87,87 oranında kültürle uyumluluk saptandı.

Ortalama sonuç verme süresi, PZR ile rutin tanımlamaya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi ($p<0.05$). Bu fark özellikle polimikrobiyal üremelerde ve maya üreyen örneklerde daha fazlaydı.

Bio-Speedy Sepsis qPCR MX-30S paneli tanımlamanın yanı sıra birçok direnç geni saptama kapasitesine sahiptir ve karpabenemaz pozitif *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının, vankomisine dirençli enterokokların ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ların tümünde dirence neden olan gen saptandı ve rutin yönteme kıyasla karbapenem direnci 15,86 saat, vankomisin direnci 22,83 saat ve metisilin direnci 44,58 saat önce saptandı.

Araştırmamızda pozitif sinyal alınan şişeden PZR uygulaması yalnızca mesai saatleri içerisinde yapılmıştır. İdeal uygulama, pozitif sinyal alınmasının hemen ardından her şişeye PZR yapılmasıdır. Çalışmanın bu şekilde uygulanması, sonuç verme süresinde daha fazla iyileşme sağlayacaktır.

Tüm bunlar göz önüne alındığında kısa sürede yüksek saptama oranı ile çok sayıda etkeni ve direnç genini eş zamanlı saptayabilen PZR'ın kan kültürlerinde kullanımının hasta yönetimi ve toplum sağlığı açısından etkin bir uygulama olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

[1] M. D. Gonzalez, T. Chao, and M. A. Pettengill, "Modern Blood Culture Management Decisions and Method Options," *Clin Lab Med*, vol. 40, no. 4, p. 379, 2020, doi: 10.1016/j.cll.2020.07.001.

[2] B. Berinson *et al.*, "Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for Blood Culture Processing in Clinical Practice," *J Clin Microbiol*, vol. 59, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.1128/JCM.00543-21.

[3] K. C. Claeys, E. L. Heil, S. Hitchcock, J. Kristie Johnson, and S. Leekha, "Management of Gram-Negative Bloodstream Infections in the Era of Rapid Diagnostic Testing: Impact With and Without Antibiotic Stewardship," *Open Forum Infect Dis*, vol. 7, no. 10, pp. 1–8, Oct. 2020, doi: 10.1093/OFID/OFAA427.

[4] B. F. Teshome, S. M. Vouri, N. Hampton, M. H. Kollef, and S. T. Micek, "Duratıon Of Exposure To Antıpseudomonal Antıbıotıcs In The Crıtıcally Ill And Development Of New Resıstance," 2019, doi: 10.1002/phar.2201.

[5] B. Lamy, M. Sundqvist, and E. A. Idelevich, "Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 26, no. 2, pp. 142–150, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.017.

[6] K. E. Graff *et al.*, "Clinical Impact of the Expanded BioFire Blood Culture Identification 2 Panel in a U.S. Children's Hospital," 2021, doi: 10.1128/Spectrum.00429-21.

[7] M. Roger Couturier and J. Dien Bard, "Direct-from-Specimen Pathogen Identification Evolution of Syndromic Panels," 2019, doi: 10.1016/j.cll.2019.05.005.

[8] J. Dien Bard and E. Mcelvania, "Panels and Syndromic Testing in Clinical Microbiology," 2020, doi: 10.1016/j.cll.2020.08.001.

[9] J.-F. Timsit, E. Ruppé, F. Barbier, A. Tabah, and M. Bassetti, “Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement,” *Intensive Care Med*, vol. 46, pp. 266–284, 2020, doi: 10.1007/s00134-020-05950-6.

[10] B. Almirante *et al.*, “Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases ofCandidaBloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003,” *J Clin Microbiol*, vol. 43, no. 4, pp. 1829–1835, 2005, doi: 10.1128/JCM.43.4.1829-1835.2005.

[11] Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği, “Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi- Kan Dolaşımı Örnekleri,” vol. V2, 2022.

[12] C. Y. Chen *et al.*, “Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with candidaemia due to Candida parapsilosis sensu lato species at a medical centre in Taiwan, 2000-12,” *J Antimicrob Chemother*, vol. 70, no. 5, pp. 1531–1538, Oct. 2015, doi: 10.1093/JAC/DKU540.

[13] D. H. Yamin, A. Husin, and A. Harun, “Risk Factors of Candida parapsilosis Catheter-Related Bloodstream Infection,” *Front Public Health*, vol. 9, p. 631865, Aug. 2021, doi: 10.3389/FPUBH.2021.631865.

[14] M. Guliciuc *et al.*, “The Urosepsis—A Literature Review,” *Medicina (B Aires)*, vol. 57, no. 9, 2021, doi: 10.3390/MEDICINA57090872.

[15] H. D. Garcia, Lynne S.; Isenberg, “*Clinical Microbiology Procedures Handbook”*, vol. 3rd Ed. ASM, 2007.

[16] N. Markus Dreger, S. Degener, P. Ahmad-Nejad, G. Wöbker, and S. Roth, “Urosepsis-Etiology, Diagnosis, and Treatment,” 2015, doi: 10.3238/arztebl.2015.0837.

[17] F. B. Mayr, S. Yende, and D. C. Angus, “Epidemiology of severe sepsis,” *https://doi.org/10.4161/viru.27372*, vol. 5, no. 1, pp. 4–11, 2013, doi: 10.4161/VIRU.27372.

[18] W. Gary W., Procop; Deirdre, Church; Geraldine, Hall; William M., Janda; Elmer W., Koneman; Paul C., Schreckenberger; Gail L., "*Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology", 7th Ed. 2017.* 2017.

[19] G. Li *et al.*, "Comparison of the Performance of Three Blood Culture Systems in a Chinese Tertiary-Care Hospital," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 9, Aug. 2019, doi: 10.3389/fcimb.2019.00285.

[20] S. Yıldız "BACTEC PLUS AEROBİK / F ve BACTEC PLUS ANAEROBİK / F otomatize erişkin kan kültür şişelerindeki izolatların üremelerinin ve üreme zamanlarının karşılaştırılması". Uzmanlık tezi, 2017.

[21] M. L. Yarbrough, M. A. Wallace, and C. A. D. Burnham, "Comparison of Microorganism Detection and Time to Positivity in Pediatric and Standard Media from Three Major Commercial Continuously Monitored Blood Culture Systems," *J Clin Microbiol*, vol. 59, no. 7, p. e0042921, Jun. 2021, doi: 10.1128/JCM.00429-21.

[22] Y. Uehara *et al.*, "Impact of reporting gram stain results from blood culture bottles on the selection of antimicrobial agents," *Am J Clin Pathol*, vol. 132, no. 1, pp. 18–25, Jul. 2009, doi: 10.1309/AJCP0H2DAMBXZUSS.

[23] T. Hautala *et al.*, "Blood culture Gram stain and clinical categorization based empirical antimicrobial therapy of bloodstream infection," *Int J Antimicrob Agents*, vol. 25, no. 4, pp. 329–333, 2005, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.11.015.

[24] H. Zengin Canalp and B. Bayraktar, "Direct Rapid Identification from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS: Specific Focus on Turnaround Times," *Microbiol Spectr*, vol. 9, no. 3, Dec. 2021, doi: 10.1128/SPECTRUM.01103-21.

[25] O. Opota, A. Croxatto, G. Prod'hom, and G. Greub, "Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art," *Clinical Microbiology and*

Infection, vol. 21, no. 4. Elsevier B.V., pp. 313–322, Apr. 01, 2015. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.003.

[26] James H. Jorgensen and Michael A. Pfaller, *Manual of clinical microbiology*, 11th edition. ASM, 2015.

[27] R. C. She and J. M. Bender, "Advances in Rapid Molecular Blood Culture Diagnostics: Healthcare Impact, Laboratory Implications, and Multiplex Technologies," 2018, doi: 10.1373/jalm.2018.027409.

[28] P. Pancholi *et al.*, "Multicenter evaluation of the accelerate PhenoTest BC kit for rapid identification and phenotypic antimicrobial susceptibility testing using morphokinetic cellular analysis," *J Clin Microbiol*, vol. 56, no. 4, pp. 1329–1346, Apr. 2018, doi: 10.1128/JCM.01329-17/FORMAT/EPUB.

[29] S. H. Macvane, F. S. Nolte, and C.-A. D. Burnham, "Benefits of Adding a Rapid PCR-Based Blood Culture Identification Panel to an Established Antimicrobial Stewardship Program," *J Clin Microbiol*, vol. 54, pp. 2455–2463, 2016, doi: 10.1128/JCM.00996-16.

[30] T. Walker *et al.*, "Clinical Impact of Laboratory Implementation of Verigene BC-GN Microarray-Based Assay for Detection of Gram-Negative Bacteria in Positive Blood Cultures," 2016, doi: 10.1128/JCM.00376-16.

[31] "BioMerieux BacT/ALERT® FA Plus 410851."

[32] "BioMerieux BACTALERT FN PLUS 410852".

[33] H. Salimnia *et al.*, "Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial," 2016, doi: 10.1128/JCM.01679-15.

[34] C. M. Kang *et al.*, "Rapid identification of bloodstream bacterial and fungal pathogens and their antibiotic resistance determinants from positively flagged blood cultures using the BioFire FilmArray blood culture identification

panel," *J Microbiol Immunol Infect*, vol. 53, no. 6, pp. 882–891, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.JMII.2020.03.018.

[35] L. Evans *et al.*, "Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021," *Intensive Care Med*, vol. 47, no. 11, pp. 1181–1247, Nov. 2021, doi: 10.1007/s00134-021-06506-y.

[36] A. M. Caliendo *et al.*, "Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 57 Suppl 3. 2013. doi: 10.1093/cid/cit578.

[37] C. Ward, K. Stocker, J. Begum, P. Wade, U. Ebrahimsa, and S. D. Goldenberg, "Performance evaluation of the Verigene® (Nanosphere) and FilmArray® (BioFire®) molecular assays for identification of causative organisms in bacterial bloodstream infections," *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 34, no. 3, pp. 487–496, Mar. 2015, doi: 10.1007/S10096-014-2252-2.

[38] M. M. Bhatti, S. Boonlayangoor, K. G. Beavis, and V. Tesic, "Evaluation of FilmArray and Verigene systems for rapid identification of positive blood cultures," *J Clin Microbiol*, vol. 52, no. 9, pp. 3433–3436, 2014, doi: 10.1128/JCM.01417-14.

[39] O. Altun, M. Almuhayawi, M. Ullberg, and V. Ozenci, "Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles," *J Clin Microbiol*, vol. 51, no. 12, pp. 4130–4136, Dec. 2013, doi: 10.1128/JCM.01835-13.

[40] P. Ramanan, A. L. Bryson, M. J. Binnicker, B. S. Pritt, and R. Patel, "Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology," 2017, doi: 10.1128/CMR.

[41] J. Kok, L. C. Thomas, T. Olma, S. C. A. Chen, and J. R. Iredell, "Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper™ and Time of Flight Mass

Spectrometry," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, p. 23285, 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0023285.

[42] A. J. Blaschke *et al.*, "Rapid Identification of Pathogens from Positive Blood Cultures by Multiplex PCR using the FilmArray System," *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 74, no. 4, p. 349, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2012.08.013.

[43] T. R. Southern *et al.*, "Implementation and performance of the BioFire FilmArray® Blood Culture Identification panel with antimicrobial treatment recommendations for bloodstream infections at a midwestern academic tertiary hospital," *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 81, no. 2, pp. 96–101, 2015, doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2014.11.004.

[44] R. Banerjee *et al.*, "Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 61, no. 7, pp. 1071–1080, Oct. 2015, doi: 10.1093/cid/civ447.

[45] F. Çetin, I. Mumcuoğlu, A. Aksoy, Y. Gürkan, and N. Aksu, "Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarliliklari," *Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, vol. 71, no. 2, pp. 67–74, 2014, doi: 10.5505/TurkHijyen.2014.23230.

[46] M. Turhanoglu, "Evaluation of the Results Obtained from Microbiological Analysis of Blood Cultures over 5 Years," *Journal of Family Medicine and Health Care*, vol. 2, no. 4, p. 43, 2016, doi: 10.11648/j.jfmhc.20160204.14.

[47] N. Çeken, H. Duran, and T. K. Atİk, "Distribution of gram negative bacteria isolated from blood culture and antibiotic resistance rates," *Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, vol. 79, no. 3, pp. 451–460, 2022, doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.57983.

[48] J. L. Nagel *et al.*, "Impact of antimicrobial stewardship intervention on coagulase-negative Staphylococcus blood cultures in conjunction with rapid

diagnostic testing," *J Clin Microbiol*, vol. 52, no. 8, pp. 2849–2854, 2014, doi: 10.1128/JCM.00682-14.

[49] K. K. Perez *et al.*, "Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 137, no. 9, pp. 1247–1254, 2013, doi: 10.5858/ARPA.2012-0651-OA.

[50] European Centre for Disease Prevention and Control. and World Health Organization., *Antimicrobial resistance surveillance in Europe : 2022 : 2020 data*. 2022.

[51] G. Alçi, D. Güneşer, A. Güner, and A. Karahasan, "Hastanede Yatan Hastalardan Alınan Rektal Sürüntü Örneklerinde Vankomisine Dirençli Enterokok Taranması: Stratejik Değerlendirme," *ANKEM Dergisi*, pp. 70–76, Dec. 2021, doi: 10.54962/ankemderg.1048456.

[52] N. Bourdon *et al.*, "Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 66, no. 4, pp. 713–721, Apr. 2011, doi: 10.1093/jac/dkq524.

[53] S. Bilen *et al.*, "Phenotypic and Genotypic Evaluation of Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) Strains Isolated from Various Clinical Specimens," *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 2021, doi: 10.5222/tmcd.2021.50023.

[54] J. A. McClure *et al.*, "A Novel Assay for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Directly From Clinical Samples," *Front Microbiol*, vol. 11, Jun. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01295.

[55] P. Nordmann, P. Nordmann, and L. Poirel, "Clinical Infectious Diseases Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria," *Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in GNB • cid*, vol. 2019, no. 7, pp. 521–529, 2019, doi: 10.1093/cid/ciz824.