

GÜNCEL REHBERLER IŞIĞINDA SEPSİS, KLASİK VE HIZLI TANI YÖNTEMLERİ, ULUSAL HEMOKÜLTÜR REHBERİ

Ayşe Esra KARAKOÇ

SB. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, ANKARA
aesrakarakoc@gmail.com

ÖZET

Sepsiste, tam ve antimikrobiyal tedavinin uygun şekilde yönlendirilmesi için patojeneminin doğrulanması ve etkenin identifikasyonu gerekir. Standart mikrobiyolojik yöntemler kan kültürü ve konvansiyonel identifikasyon/duyarlılık testleridir. Standart yöntemlerle sonuç alınması en az 72 saat ve daha uzun süreler gerektirir. Sepsis tanısında kan kültürü altın standart olmakla birlikte hızlı tanı yönünden yetersiz kalmaktadır. Örneklerin toplanmasından başlayarak kan kültürlerinin doğru sonuçlandırılmasını etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Kan kültürlerinin alınma zamanı, alınması gereken kan hacmi, kan/besiyeri oranı, standart kan kültürü setlerinin oluşturulması, setlerdeki şişe sayısı gibi çok sayıda teknik faktör kan kültürü sonuçlarını etkilemektedir. Kan kültürlerinin fastidiyöz ve yavaş üreyen organizmalarla ilgili duyarlılığı düşüktür. Kan kültürlerinin teknik ve diğer sınırlamalarını ortadan kaldırmak üzere sepsiste nükleik asit temeline dayanan yöntemler ve proteomik temelli yöntemler denenmektedir. Kan kültürü şişesinden ya da doğrudan kan, serum, plazma örneğinden saatler ve dakikalar içinde sonuç veren bu yöntemlerin maliyet etkinliğinin değerlendirilmesi gerekir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan kritik hastalarda sepsiste çoklu ilaca dirençli patojenlerin görülmesi aynı zamanda bu etkenlerin duyarlılık profilinin de hızlı tespitini gerektirmektedir. Çok sayıda direnç mekanizmasının varlığı ve bunun düzenlenmesine etki eden faktörler sepsiste hızlı yöntemlerin kullanımını sınırlandırmaktadır.

Anahtar sözcükler: bakteremi, hızlı tanı, kan kültürü, nükleik asit temeline dayanan yöntemler, polimeraz zincir reaksiyonu, proteomiks, sepsis

SUMMARY

Standart and Rapid Microbiological Methods in Diagnosis of Sepsis

The diagnosis and appropriate antimicrobial therapy of sepsis require confirmation of pathogenemia and identification of the pathogens. Blood culture and conventional identification/susceptibility tests are standart microbiological methods in sepsis diagnosis. At least 72 hours or longer periods are required to obtain the results with standart methods. Blood culture is the current gold standard in the diagnosis of sepsis; yet it has limitations related with rapid diagnosis. Numerous technical factors starting from the collection of blood affect the quality of blood culture results. Some of them are timing and method of blood collection, blood volume, blood/broth ratio, blood culture sets, number of bottles in blood culture sets, etc. The sensitivity of blood cultures is lowered in case of fastidious and slow growing microorganisms. Nucleic acid based methods and proteomics based methods are evaluated in order to overcome the technical and other limitations of blood culture. These methods that are performed on blood culture bottles or directly on whole blood, serum or plasma are rapid in terms of giving results in hours or minutes; yet their cost effectiveness need to be evaluated. The critically ill patients that are followed in intensive care units are challanged with multi resistant pathogens. The susceptibility profile is therefore required for correct management of these patients. The presense of a variety of resistance mechanisms and their regulatory factors limit the usefulness of rapid diagnostic methods in this context.

Keywords: bacteremia, blood culture, nucleic acid based technology, polymerase chain reaction, proteomics, rapid diagnosis, sepsis

Kan dolaşımı infeksiyonları tüm dünyada yüksek morbidite ve mortalite oranları ile önde gelen sağlık sorunlarından. Kan dolaşımı infeksiyonlarının ağır klinik formları sepsis ve septik şok birçok hasta grubunda önemli ölüm

sebepleridir. Sepsisin klinik formları her zaman bakteremi (ya da fungemi) ile ilişkilidir; ancak bakteremi ve fungemi her zaman sepsis sendromuna sebep olmaz. Bakteremi geçici, aralıklı ya da sürekli olabilir. Bakteremi kontrol edilemedi-

ğinde, inflamatuvar yanıt ve koagülasyon sisteminde önemli değişikliklerle karakterize bir infeksiyon süreci ile ilişkili olarak sepsis gelişir. Sepsis, şüpheli ya da doğrulanmış infeksiyona karşı konağın sistemik inflamatuvar yanıtından kaynaklanan klinik tablodur.

SEPSİS YÖNETİMİNDE MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

Kanıtı dayalı rehberler, hastanın sistemik inflamatuvar yanıtının sebebi olarak infeksiyonun erken tanınması ve uygun antimikrobiyal tedavinin zamanında verilmesine odaklanmaktadır. Septik şok ve ağır sepsiste antimikrobiyal tedavi başlanmadan önce kan kültürlerinin ve infeksiyonun odağına yönelik diğer kültürlerin alınması önerilir. Bundan sonra tanının ilk bir saatinde lokal patojen sürveyansına göre geniş spektrumlu, yüksek potensli antimikrobiyal tedavi başlanır. Bunlarla birlikte daha sonra mikrobiyolojik ve klinik verilere göre spektrumun daraltılması için antimikrobiyal tedavinin tekrar gözden geçirilmesi, düzeyi güçlü tanı ve tedavi önerileridir⁽⁴⁾.

Sepsis klinik tanısının mikrobiyolojik doğrulamasında, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ile sepsis ayrımı için patojeneminin belirlendiği kan kültürleri anahtar role sahiptir. Pozitif sonuçlar elde edildiğinde, patojen ve antimikrobiyal duyarlılığı belirlenir; rasyonel antibiyotik kullanımı sağlanır. Pozitif sonuçlar şüpheli sepsisin kanıtı dayalı tanı ve tedavisini mümkün kılar. Kan kültürlerinden elde edilen sürveyans verileri aynı zamanda empirik antimikrobiyal tedavi için epidemiyolojik kanıttır.

Ancak kan kültürlerinin antimikrobiyal tedaviden önce alınmaması ve diğer bazı faktörlerden dolayı kan kültürleri ile her zaman yeterli mikrobiyolojik destek sağlanamamaktadır. Günümüzde kullanılan otomatize kan kültür sistemlerindeki gelişmelere rağmen kan kültürünün teknik sınırlamaları ortadan kaldırılmış değildir. Kan kültürlerinde sonucu etkileyen faktörlerin bilinmesi kan kültürlerinin klinik faydasını artırır. Bunun yanı sıra sepsiste mikrobiyolojik tanıya katkı sağlamak üzere kan kültürüne ek hızlı tanı testlerinin geliştirilmesi ve rutin laboratuvarında kullanımlarının farklı hasta gruplarında araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Kan kültürlerinden yüksek klinik faydanın sağlanabilmesi ancak etkili bir klinik laboratuvar iletişimi ve işbirliği ile mümkündür. Bu da bilimsel veriler dikkate alınarak hazırlanan ulusal ve uluslararası hemokültür rehberleri ile sağlanabilir^(2,22).

SEPSİSİN MİKROBİYOLOJİK TANISINDA KAN KÜLTÜRÜ KULLANIMI VE SINIRLAMALARI

Kan dolaşımı infeksiyonlarının tanısında kan kültürü altın standarttır. Kan kültürleri dolaşımdaki canlı mikroorganizmaların tespit edilmesi esasına dayanır. Kan kültürleri aynı zamanda tespit edilen patojenlerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesine olanak sağlar. Sepsis tanısı için bugüne kadar geliştirilmiş hiçbir yöntem antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi konusunda fenotipik duyarlılık testlerinin yerine geçecek düzeye ulaşmamıştır. Ağır sepsiste yetersiz antimikrobiyal tedavinin mortalite için bağımsız risk faktörü olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır^(14,24). Septik şoklu hastalardan oluşan bir kohortta hipotansiyonun başlangıcından sonra etkili antimikrobiyal tedavi uygulamasındaki her bir saatlik gecikmenin hayatta kalım oranını ortalama %8 azalttığı gösterilmiştir⁽¹³⁾. Bu sebeplerle başlanan geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavinin doğru yönlendirilebilmesi için tek yol kan kültüründen etkenin izolasyonu ve fenotipik duyarlılık testlerinin yapılmasıdır.

Kan kültürünün duyarlılığı birçok faktörden etkilenmektedir. Alınan kanın hacmi izolasyonu etkileyen en önemli faktördür. Erişkin bakteremisinde dolaşımdaki bakteri sayımı 10 CFU/ml'nin altındadır⁽²³⁾. Alınan kanın hacmi ile pozitif sonuç arasında doğrudan ilişki vardır. Kültür için alınan her 1 ml kan ile pozitiflik oranının % 3 arttığı gösterilmiştir. Her septik epizotta, bir kan kültür setindeki aerop ve anaerop şişelere uygun miktarlarda eklemek üzere en az 20-30 ml kan alınması ve farklı bölgelerden iki ya da üç set kan kültürü gönderilmesi önerilmektedir. Kateterle ilişkili kan dolaşımı infeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı için kateterden alınan kan kültür setine ek olarak periferik venden de kan kültürü gönderilmesi sonuçların değerlendirilmesi açısından önemlidir. Kan kül-

tür şişeleri özellikle çocuk hastalarda yetersiz hacimde kan ile doldurulmakta, bu da pozitiflik oranlarını azaltmaktadır. Kan besiyeri oranı kan kültüründe sonucu etkileyen diğer önemli faktörlerdendir.

Pozitiflik oranlarını düşüren diğer bir uygunsuzluk kan kültür şişelerinin cihaza zamanında yüklenmemesidir. Oda sıcaklığında ya da etüvde bekletildikten sonra cihaza yüklenen kan kültürlerinde hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir.

Kan kültürlerinde hatalı pozitifliğe yol açan kontaminasyon şeklindeki sonuçlar, hastalardan uygun olmayan yöntemle örnek alınması ile ilişkilidir ve kritik hastalarda kan kültürünün tanusal kullanımını sınırlamaktadır. Kontaminasyon oranları kurumlar arasında farklılık göstermekte ve kan kültürlerinin yorumlanmasında sorun oluşturmaktadır. Alınan kan kültürlerinin sayısının artırılması izolasyon oranlarını arttırmanın yanı sıra kan kültürlerinin kontaminasyon ile ilişkili yorumlanmasına katkı sağlaması yönünden de önerilmektedir⁽¹⁹⁾.

Kan kültür besiyerlerine antimikrobiyal ajanları nötralize eden reçine ve karbon benzeri maddeler eklenmiş olsa da antimikrobiyal tedavi başladıktan sonra alınan kan kültürlerinin duyarlılığı önemli ölçüde düşmektedir. İmmünkompromize ve nötropenik hastalarda kullanılan profilaktik antibiyotik ve antifungaller, bu hastalarda sistemik inflamatuvar yanıt sendromu bulguları geliştiğinde alınan kan kültürlerinin negatif kalmasına yol açmaktadır. Bu hastalardaki infeksiyonlar yönünden risk oluşturan mantarlar, *Nocardia*, *Mycoplasma* vb. yavaş üreyen ya da fastidiyöz organizmaların kan kültürlerinde elde edilmesinde duyarlılık daha da düşmektedir. İnfektif endokardit etkeni olabilen, kültürü yapılamayıp moleküler yöntemlerle tespit edilebilen *Coxiella burnetti*, *Chlamydomphila pneumoniae* vb. organizmalar tanıda kültürlerin % 2.5-31 oranlarında negatif kalmasına sebep olmaktadır⁽⁸⁾.

Antimikrobiyal tedavi, yetersiz örnek hacmi, hatalı preanalitik işlemler gibi çok sayıda faktörden dolayı stafilokoklar ya da streptokoklar gibi kültürde kolay üreyen organizmalarda bile hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Optimal şartlar sağlansa da kan kültürlerinin

pozitiflik oranları % 30'ları geçmemektedir.

Otomatize cihazlar, genellikle ilk 24-48 saatte pozitif sinyal verdikten sonra Gram boyama yapılarak sonucu hastanın doktoruna bildirilir. Kan kültür şişesinden doğrudan antimikrobiyal duyarlılık testi ya da fenotipik testlerle patojenin ön belirlenmesi yapılsa da tam identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi daha uzun süre gerektirir. Fastidiyöz organizmalar, anaeroplular ve mantarlar için süre daha da uzar. Kan kültürünün sonuçlandırılması standart mikrobiyolojik yöntemler kullanıldığında en az 48-72 saat, birçok durumda bundan daha uzun süreler gerektirdiğinden antimikrobiyal tedavi mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından yeterince etkili şekilde yönlendirilememektedir.

Kan kültürü klasik ve altın standart tanı yöntemi olarak sepsis rehberlerindeki yerini korusa da kan kültürünün sınırlamalarını gidermek ve sepsisteki hızlı tanı ihtiyacını karşılamak üzere alternatif tanı yöntemleri geliştirilmiştir.

SEPSİSTE HIZLI TANI YÖNTEMLERİ

Sepsis tanısında nükleik asitleri temel alan yöntemler henüz rutin laboratuvar kullanımına girmemiş olmakla birlikte birçok hasta grubundaki hızlı tanı ihtiyacından dolayı çok sayıda araştırmada değerlendirilmiş, bazı sınırlamaları ile birlikte gelecek için umut verici bulunmuştur. Bu kapsamdaki yöntemler, kan kültür şişesinden mikroorganizmaların tespiti ve identifikasyonunu sağlayan yöntemler ve doğrudan kan, serum ya da plazma örneklerinden mikroorganizmaları tanımlayan yöntemler olarak iki gruptur.

Kan kültür şişesinden bakteriyel ve fungal DNA'nın nükleik asit temeline dayanan yöntemlerle tespit edilmesi yaklaşımı pozitif kan kültürlerinde denenmiştir⁽¹²⁾. Ancak bu yaklaşım kan kültürünün teknik ve duyarlılık sınırlamalarından etkilenmektedir. Aynı zamanda moleküler identifikasyon klasik kültür yöntemlerinden yalnızca birkaç saat önce sonuçlandırıldığından klinik kullanımı sınırlı bulunmuştur. Nükleik asit temelli yöntemler negatif kan kültürlerinden fastidiyöz patojenlerin tespitinde kullanılabilir⁽¹⁷⁾. Aynı zamanda kan kültüründe üremesi zaman alan ve subkültür gerektiren mantarlar gibi organizmaların araştırılması kan kültür şişesinden yapılabilir.

Patojenlerin doğrudan kan, serum ya da plazma örneklerinden tespitini sağlayan, valide edilmiş nükleik asit temelli yöntemlerin kritik hastalarda sonuç süresini klasik kültür yöntemlerine göre anlamlı ölçüde kısaltması beklenen bir bulgudur.

Nükleik asit temelli yöntemlerden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sepsiste kullanılmıştır. Sentetik oligonükleotid primerlerin seçilen DNA dizilerinin her iki ucuna bağlanması, DNA polimeraz enzimi ile DNA'nın replikasyonu ve çoğaltılan DNA'nın tespiti ve analizi ile klinik örnekteki düşük düzeydeki nükleik asidi bile kültür yöntemlerine göre çok daha kısa sürede tespit etmek mümkündür. Klasik PZR yöntemleri; örnek sayısının yüksek olduğu laboratuvarlarda, çoğaltılan ampikonlardan kaynaklanan "carryover" kontaminasyon riski taşır. Ampikonların floresan tespitine dayalı otomatize sistemler olan gerçek zamanlı PZR (GZ PZR) yöntemlerinde reaksiyon tek bir kuyuda gerçekleştiğinden kontaminasyon riski daha düşüktür. GZ PZR yönteminde floresan boyaların çift iplikli DNA'ya nonspesifik bağlanması ya da floresanla işaretli problemlerin kullanımı ile nükleik asit çoğalması gerçek zamanlı olarak izlenir. Çoğaltılan DNA'nın kantitasyonu ile bakteri yükünün belirlenmesi, kan kültürlerinde koagülaz negatif stafilkoklar ve viridans streptokoklar gibi olası kontaminantların değerlendirilmesinde bir avantaj olarak bildirilmiştir⁽¹⁰⁾.

PZR yönteminin septisemi tanısında kullanımında ilk kritik basamak nükleik asitlerin pürifikasyonudur. Kan kültür şişesinde veya direkt örneklerdeki PZR inhibitörleri, farklı kaynaklardan bakteriyel ve fungal DNA kontaminasyonu, yüksek düzey insan DNA'sının interferansı ve örnekler arasında çapraz kontaminasyon ilk aşılması gereken sorunlardır^(9,18).

PZR temelli yöntemlerin kullanımında üç yaklaşım vardır. Birinci yaklaşımda genus ya da tür düzeyinde tanımlama yapan patojen spesifik primerler kullanılır. Bu durumda spesifik klinik ihtiyaçlar için, spesifik organizmalar araştırılır. Fastidiyöz ya da yavaş üreyen organizmaların etken olduğu kan kültürü negatif endokarditler, riketsiyoz, Q ateşi, bartonelloz, bruselloz patojen spesifik primerler kullanılarak araştırılabilir. Stafilkoklarda *mecA*, enterokoklarda *van* genle-

rinin araştırılması, direnç fenotipinin belirlenme süresini 12-16 saat kısaltsa da klinik etkisi ve maliyet etkinliği kanıtlanmamıştır⁽⁶⁾. Patojen spesifik yaklaşımın kan dolaşımı infeksiyonlarının araştırılmasında sınırlı kullanımı vardır.

Hematolojik ve nonhematolojik maligniteli nötropenik hastalarda invaziv aspergillozun (İA) erken tanısında genus spesifik PZR yaklaşımının faydalı olduğunu gösteren yayınlar vardır. Çevresel kontaminasyon hatalı pozitiflik yönünden önemli bulunmuş, IA tanısında tek negatif PZR sonucunun tanıyı ekarte edeceği bildirilmiştir^(1,16).

Bakteri ve mantar genomlarının korunmuş ve ortak bölgelerini hedef alan üniversal primerlerin kullanımı ile geniş bir organizma yelpazesi araştırılabilir. Kan dolaşımı infeksiyonlarına sebep olan birçok mikroorganizma bu yaklaşımla tespit edilebilir. Ancak pozitif kan kültürlerinde bu yaklaşımın mikrobiyolojik tanıya katkısı sınırlıdır. Bu amaçla bakteriler için 16S, 5S veya 23S rRNA genlerini çoğaltan panbakteriyel ve mantarlar için 18S, 5.8S veya 28S ribozomal DNA'yı (rDNA) çoğaltan panfungal primerler kullanılmıştır. Hedef gen bölgesinin PZR ile amplifikasyonundan sonra ileri identifikasyon için dizi analizi, polimorfizm analizi, hibridizasyon, genus ya da tür spesifik GZ PZR çalışılması bu yaklaşımdaki test sonuçlanma süresini uzatır. Bu yaklaşımın bakteremi veya fungeminin güçlü klinik şüphesi ile birlikte kan kültürünün negatif kaldığı durumlarda kullanılması önerilmiştir⁽¹⁷⁾. Çevresel bakteriyel ya da fungal DNA kontaminasyonuna bağlı hatalı pozitiflik dikkate alınmalıdır.

Rutin laboratuvarlar için sepsis tanısında umut veren yaklaşım multipleks nükleik asit temelli yöntemlerdir. Bakteriyel ve fungal ribozomal gen bölgeleri arasında kodlanmayan, yüksek heterojenite gösteren "internal transcribed spacer-ITS" 1 ve 2 bölgeleri PZR'de primer olarak ve hibridizasyonda prob olarak kullanılır. Kan dolaşımı infeksiyonlarından sıklıkla izole edilen patojenlerin farklı gen bölgelerini hedef alan multipleks PZR'de analiz; elektroforetik patern analizi, prob hibridizasyon-ELISA veya GZ PZR ile yapılır^(20,21).

Sepsis yönetiminde yüksek sayıda nükleik asit hedefini artırmanın yolu DNA "mikroar-

ray"lerdir. Patojen ve direnç genlerini içeren hedeflerin kaplandığı mikroçiplerin kullanımı sepsis tanı ve tedavisinde araştırılmıştır⁽³⁾. Anti-mikrobiyal direnci gösteren genetik "marker"ların sayısı arttıkça "mikroarray" yöntemi patojeninin hızlı tanısının yanı sıra direncin de hızlı belirlenmesi yönünden umut verici bir yöntem olarak görülmektedir.

Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda sepsis yönetiminde antibiyotiklere dirençli organizmaların varlığının ve duyarlılık paterninin hızlı belirlenmesi önemlidir. PZR ile direncin taranması ve hızlı tespiti, bazı durumlarda uygun bir yaklaşımken, çok sayıda direnç mekanizması ve direnç geninin bulunduğu durumlarda uygulanamaz. Moleküler yöntemlerle patojenlerin hızlı tespiti empirik tedaviyi yönlendirerek maliyetleri düşürür. Ancak özellikle çoklu dirençli patojenler için spesifik duyarlılık paterninin belirlenememesi bu yöntemlerin klinik faydasını sınırlamaktadır. Aynı zamanda direnci belirleyen genlerin ekspresyon düzeyini etkileyen regülatuar genler gibi faktörler de fenotipik direnci etkileyerek moleküler yöntemleri sınırlamaktadır.

Sepsiste PZR sonuçlarının yorumu ve hastanın dolaşımındaki DNA varlığının infeksiyonun göstergesi olarak önemi henüz tam bir kesinlikle ortaya konmuş değildir. Moleküler yöntemlerle tespit edilen mikrobiyal DNA'nın hatalı pozitifliğine; "carryover" kontaminasyon, çevresel DNA, geçici bakteriyemi ve başarılı antiinfektif tedaviden sonra dolaşımda DNA persistansı sebep olabilir.

Pozitif kan kültür şişelerinden hızlı mikroorganizma tanısı için kullanılan, amplifikasyonun olmadığı, nükleik asit temelli bir yöntem floresan in situ hibridizasyondur (FISH). Sentetik oligomer yapıdaki peptid nükleik asit probolar (PNA) floresanla işaretlidir; bakteri ve mantarların DNA ve RNA yapılarına bağlanır. *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar, *Enterococcus faecalis* ve diğer enterokoklar, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*'yı içeren bakteriyel panel ve *Candida* türleri paneli için yüksek duyarlılık ve özgüllük değerleri bildirilmiştir⁽⁷⁾. *C. albicans* PNA FISH kitinin kullanımı, empirik başlanan kaspofungin tedavisini kısalttığı için maliyet etkin bulunmuş ancak stafilo-

kok pozitif kan kültürleri için çok daha düşük maliyetli testler olduğu bildirilmiştir⁽¹¹⁾.

Kan kültürlerinden mikrobiyal patojenlerin direkt tespitinde umut veren ve nükleik asit temeline dayanmayan bir yöntem "matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry-MALDI-TOF MS"dir. Proteomik teknoloji kullanılarak dakikalar içerisinde bakteri ve mantarlar proteomik profillerine göre tanımlanmaktadır. Yöntemin aynı zamanda antibiyotik direnç "marker"larını belirlemek için kullanılabileceğini bildiren çalışmalar vardır⁽⁶⁾. Analiz yapabilmek için mikrobiyal hücre sayısının kültür ile artırılması proteomik teknolojinin sınırlamasıdır. Cihaz maliyeti yüksek olmakla birlikte MALDI-TOF MS rutin laboratuvarlar için biyokimyasal tanımlama ve nükleik asit temelli yöntemlerin karşısında geçerli bir alternatif olarak yer almaktadır.

Nötropenik hastalarda sepsisin erken tanısı için fungal antijenler de kullanılmaktadır. Bunlardan özellikle galaktomannan ve 1,3-beta-D-glukan bu hastaların takip ve tedavisinde preemptif tedaviyi yönlendiren ancak sınırlamaları da olan hızlı yöntemler olarak araştırılmaktadır. Mikrobiyolojik yöntemler dışındaki nonspesifik sepsis "marker"larından bazıları interlökin-6, C-reaktif protein, prokalsitonin ve "triggering receptor expressed on myeloid cells" (TREM-1) molekülüdür⁽¹⁵⁾.

KAYNAKLAR

1. Aşçıoğlu S, Rex JH, de Pauw B et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus, *Clin Infect Dis* 2002;34(1):7-14. <http://dx.doi.org/10.1086/323335>
2. Başustaoğlu A (ed). Ulusal hemokültür rehberi, 1.baskı, Ankara (2013).
3. Cleven BE, Pakla-Santini M, Gielen J, Meembor S, Kronke M, Krut O. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray, *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2389-97. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02291-05>
4. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM et al. International guidelines for management of severe

- sepsis and septic shock, *Crit Care Med* 2008;36(1): 296-327.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000298158.12101.41>
5. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry, *J Med Microbiol* 2000;49(3):295-300.
 6. Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, Witte W. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive-testing blood cultures, *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5256-62.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.10.5256-5262.2005>
 7. Forrest GN, Manke K, Jabra-Rizk MA et al. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs, *J Clin Microbiol* 2006;44(9): 3381-3.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00751-06>
 8. Fournier PE, Thuny F, Richet H et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: A prospective study of 819 new cases, *Clin Infect Dis* 2010;51(2):131-40.
<http://dx.doi.org/10.1086/653675>
 9. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate, *J Clin Microbiol* 1998;36(10):2810-6.
 10. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination, *Clin Microbiol Rev* 2006;19(4): 788-92.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00062-05>
 11. Hermsen ED, Shull SS, Klepser DG et al. Pharmacoeconomic analysis of microbiologic techniques for differentiating staphylococci directly from blood culture bottles, *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):2924-9.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00623-08>
 12. Klouche M, Schroder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections, *Clin Chem Lab Med* 2008;46(7):888-908.
<http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2008.157>
 13. Kumar A, Roberts D, Wood KE et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock, *Crit Care Med* 2006; 34(6):1589-96.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>
 14. Larche J, Azoulay E, Fieux F et al. Improved survival of critically ill cancer patients with septic shock, *Intensive Care Med* 2003;29(10):1688-95.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00134-003-1957-y>
 15. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non culture based methods in diagnosis of sepsis, *Clin Microbiol Rev* 2010;23(1):235-51.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00043-09>
 16. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect Dis* 2009;9(2):89-96.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70019-2)
 17. Schabereiter Gurtner C, Nehr M, Apfalter P, Makristathis A, Rotter ML, Hirschl AM. Evaluation of a protocol for molecular broad range diagnosis of culture negative bacterial infections in clinical routine diagnosis, *J Appl Microbiol* 2008;104(4): 1228-37.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03648.x>
 18. Smith K, Diggle MA, Clarke SC. Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples, *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2440-3.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.6.2440-2443.2003>
 19. Weinstein MP. Blood culture contamination: Persisting problems and partial progress, *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2275-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.6.2275-2278.2003>
 20. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hyplex BloodScreen multiplex PCR enzyme linked immunosorbent assay system for direct identification of gram positive cocci and gram negative bacilli from positive blood cultures, *J Clin Microbiol* 2004;42(7):3147-52.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.3147-3152.2004>
 21. Wellinghausen N, Wirths B, Franz AR, Karolyi L, Marre R, Reischl U. Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real time Light Cycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48(4):229-41.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.11.005>
 22. Wilson ML, Mitchell M, Morris AJ et al (eds). Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, M47-A, Vol.27, Number 17, Wayne Pennsylvania (2007).
 23. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia, *Clin Microbiol Rev* 1990;3(3):269-79.
 24. Zaragoza R, Artero A, Camarena JJ, Sancho S, Gonzalez R, Nogueira JM. The influence of inadequate empirical antimicrobial treatment on patients with bloodstream infections in an intensive care unit, *Clin Microbiol Infect* 2003;9(5):412-8.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00656.x>