

**PRE-İNKÜBASYON SÜRESİ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VE  
*ACINETOBACTER BAUMANNII* TÜRLERİNİN OTOMATİZE BACTEC 9120  
KAN KÜLTÜR SİSTEMİNDE SAPTANMASINI ETKİLİYOR MU?**

DOES PRE-INCUBATION PERIOD AFFECT DETECTION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII* SPECIES WITH AUTOMATIZED BACTEC 9120 BLOOD CULTURE SYSTEM?

**Melek DEMİR\***, **Nural CEVAHİR\***, **İlknur KALELİ\***  
**Soner TİKVEŞLİ\***, **Ergun METE\***

**ÖZET:** Bu çalışmada nonfermentatif türlerin kan kültür sistemlerinde saptanmasında pre-inkübasyon süresinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* klinik suşlarının farklı yoğunluktaki süspansiyonları BACTEC-9120 plus+Aerobic/F şişelerine ekilmiş ve 0, 4, 8, 16 saat 36°C'de inkübe edildikten sonra sisteme yüklenmiştir. Hem *P.aeruginosa* ve hem de *A.baumannii* suşunun ekildiği tüm şişeler sisteme yüklendikten sonra 24 saat içinde pozitif olarak sinyal vermiştir. *P.aeruginosa* suşunda tüm pre-inkübasyon sürelerinde yoğunluk azaldıkça saptama süresi uzamıştır. Bu çalışma, laboratuvarımızda kullanılmakta olan BACTEC-9120 kan kültür sisteminin, nonfermentatif bakteriler için 36°C'de 16 saate kadar pre-inkübasyon sonrası saptamaya olanak tanıdığını göstermiştir.

**Anahtar sözcükler:** Kan kültürü, pre-inkübasyon süresi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, BACTEC-9120.

**ABSTRACT:** In this study, the effect of the pre-incubation period on detection of non-fermentative species in blood culture system was investigated. Different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* strains were inoculated into BACTEC-9120 plus+Aerobic/F bottles and incubated for 0, 4, 8, 16 hours at 36°C and then were loaded to the system. Both *P.aeruginosa* and *A.baumannii* strains yielded positive signals within 24 hours after loading. In all preincubation periods, as the concentration of *P.aeruginosa* strains decreased, the detection time was increased. The higher the concentration of *A.baumannii* strains, is the longer the signalling time as the pre-incubation period is increased, whereas the lower the concentration of *A.baumannii* strains, is the shorter the

\* Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

signalling time as the preincubation period is increased. Our study indicated that the BACTEC-9120 blood culture system determined non-fermentative bacteria after a pre-incubation time of 16 hours.

*Key words: Blood culture, pre-incubation time, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, BACTEC-9120.*

## GİRİŞ

Kandaki enfeksiyon etkenlerinin hızlı ve doğru saptanması klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının temel sorumlulukları arasındadır<sup>1,2</sup>. Otomatize kan kültür sistemleri, teknolojideki yeni gelişmeler ile birlikte kanda dolaşan bakterileri kısa sürede saptamaya olanak vermektedir. Kan kültürlerinde hızlı ve doğru üremelerin saptanabilmesi kullanılan sistemlere bağlı olması yanında uygun ve yeterli bir şekilde örneğin alınması ve zamanında laboratuvara ulaştırılmasına da bağlıdır. Alınan örneğin hemen laboratuvara gönderilmesi ve sistemlere hemen girişlerinin yapılması son derece önemlidir. Ancak bazen gerek fiziki koşullardan kaynaklanan ve gerekse laboratuvarların çalışma düzenlerinden kaynaklanan nedenlerden dolayı, alınmış olan kan kültür şişelerinin her zaman sisteme girişi hemen yapılamamaktadır. Bu durumlarda bazı yayınlarda 4 saati geçmemek koşulu ile dışarda bekletilebileceği veya 36°C'de bir süre inkübe edilebileceği belirtilmektedir<sup>1,3</sup>. Ancak dışarda bekleme süresi ne kadar uzarsa bakteri izolasyon şansı da o kadar azalmaktadır<sup>1</sup>.

Otomatize kan kültür sistemleri, şişelerde mikroorganizmaların ürettiği CO<sub>2</sub> artışını, pH ve redoks potansiyeli değişikliklerini floresan veya kolorimetrik yöntemler ile saptama temelinde çalışırlar. Bakteriyemi etkenleri arasında *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer nonfermentatif etkenler bir çok antibiyotiğe dirençli olmaları nedeniyle önemli etkenlerdir. Klaerner ve arkadaşları<sup>3</sup> 2000 yılında yayınladıkları çalışmalarında, BacT/ALERT Fan aerobik şişelerin nonfermentatif bakterileri saptamada yetersiz kaldığını ve *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının sisteme yüklenmeden önce 36°C'de 4 saatten daha fazla süre inkübe edilirse pozitif saptanamadığını belirtmiştir. Bu çalışma, deneysel olarak nonfermentatif bakterilerden *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşlarının hemen ve farklı sürelerde 36°C'de bekletildikten sonra BACTEC-9120 kan kültür sistemi tarafından saptanma süresinin araştırılması amacıyla planlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada BACTEC-9120 plus+aerobic/F şişeleri kullanıldı. Laboratuvarımızda bakteriyemik hastalardan daha önce izole edilen ve tanımlanan *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* klinik suşları kullanıldı.

Deneysel çalışma iki aşamada planlandı<sup>3</sup>. Birinci aşamada, taze kültürde üretilmiş olan *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* suşları buyyon içinde 0.5 McFarland standart bulanıklığa ayarlandı. Daha sonra bu hazırlanmış olan süspansiyondan 1 ml BACTEC-9120 plus+Aerobic/F şişelerine ekildi. Bu şişelerin birer tanesi hemen sisteme yüklenirken diğer şişeler 4, 8, ve 16 saat 36°C de etüvde inkübe

edildikten sonra sisteme yüklendi. İkinci aşamada, yukarıda belirtildiği şekilde her iki suşun 0.5 McFarland standart bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı ve daha sonra bu süspansiyondan 1/100 ve 1/1000 dilüsyonlarda yeni süspansiyonlar hazırlanarak bu süspansiyonlardan 100 µl kanlı agara ekildi. 24 saat sonra üremenin değerlendirilmesi amacıyla 36°C'de inkübe edilmek üzere etüve kaldırıldı. Bu her iki dilüsyondaki süspansiyondan 1 ml BACTEC-9120 plus+Arobc/F şişelerine ekildi. Bu şişelerin birer tanesi hemen sisteme yüklenirken diğer şişeler 4, 8 ve 16 saat 36°C' de etüvde inkübe edildikten sonra sisteme yüklendi. Her iki aşamadaki şişelerden sisteme yüklenmeden ve inkübasyona bırakılmadan hemen önce 100 µl örnek alındı, kanlı agara pasajlandı ve 24 saat sonra koloniler değerlendirildi. Sisteme 0, 4, 8 ve 16. saatte yüklenmiş olan tüm şişeler, pozitif alarm verdiği süreye kadar izlendi. Pozitif alarm veren şişelerden %5 koyun kanlı agara ve EMB agara pasajlar yapıldı ve 36°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra üremeler *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* yönünden değerlendirildi.

## B U L G U L A R

Hem *P.aeruginosa* ve hem de *A.baumannii* suşunun ekildiği tüm şişeler sisteme yüklendikten sonraki 24 saat içinde pozitif alarm vermiştir. Pasaj yapılan tüm şişelerde *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* yönünde üremeler saptanmıştır.

*P.aeruginosa* suşunun farklı konsantrasyonlarda ve farklı pre-inkübasyon sürelerine göre üreme süreleri Tablo I'de, *A.baumannii* suşuna ait üreme süreleri Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo I: Farklı Zamanlarda 36°C'de İnkübasyondan Sonra BACTEC-9120 Sistemine Yüklenmiş Olan *P.aeruginosa* İçeren Şişelerin Pozitif Saptama Süreleri

<i>P.aeruginosa</i> dilüsyon miktarı	Pre-inkübasyon Süresi/ Pozitif Saptama Süresi (Saat)			
	0 Saat	4 Saat	8 Saat	16 Saat
0.5 McFarland	4.09	1.68	1.23	0.67
1/100	8.68	4.42	2.90	0.67
1/1000	9.68	7.09	3.56	1.00

Tablo II: Farklı Zamanlarda 36°C'de İnkübasyondan Sonra BACTEC-9120 Sistemine Yüklenmiş Olan *A.baumannii* İçeren Şişelerin Pozitif Saptama Süreleri

<i>A.baumannii</i> dilüsyon miktarı	Pre-inkübasyon süresi/ Pozitif saptama süresi (saat)			
	0 saat	4 saat	8 saat	16 saat
0.5 McFarland	5.10	10.9	19.08	19.42
1/100	8.72	7.47	10.96	19.08
1/1000	11.24	5.46	4.21	8.55

## T A R T I Ş M A

Bakteriyemi hastane enfeksiyonlarının önemli nedenlerinden biridir. Yoğun bakım olanaklarının artmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarına rağmen bakteriyemiye bağlı ölüm oranı halen yüksektir. Son yıllarda bakteriyemi etkenleri arasında Gram pozitif etkenler daha ön sırada yer almakla birlikte Gram negatiflerin klinik önemleri halen devam etmektedir<sup>4</sup>.

Kan kültürü, bakteriyemi etkenlerini saptamada önemli ve güvenilir bir yöntemdir. Kan kültürü için son yıllarda tüm dünyada ve ülkemizde bir çok otomatize sistem kullanılmaktadır<sup>5-11</sup>. Otomatize sistemler pozitif saptama sürelerini alarm vermeleri nedeniyle kolaylaştırmaktadır. Ancak ülkemizde zaman zaman hastanelerin yapılanmaları gereği, kan kültürleri otomatize sistemlere zamanında ulaşamayabilmektedir. Birden fazla yerleşim yerinde hastanenin farklı birimlerinin bulunması nedeniyle örneklerin mikrobiyoloji laboratuvarına ulaşma süresi uzayabilmekte, bazen de aynı hastane içinde örneklerin servisten laboratuvara ulaşması gereken hızda olmayabilmektedir. Benzer sorunlar sadece ülkemizde yaşanmamakta, yurt dışında yayınlanmış çalışmalarda da vurgulanmaktadır<sup>2,3,8</sup>. Klaerner ve arkadaşlarının<sup>3</sup> 2000 yılında yaptıkları yayınları bu konuda oldukça önemli bir çalışmadır. Bu araştırmacıların çalışmasında, BacT/Alert sisteminde kullanılan "FAN medium" şişelerinin nonfermentatif bakterileri saptamada yetersiz kaldığı ve özellikle sisteme yüklemmeden önce 4 saatten daha uzun süre 36°C'de inkübe edilmesi durumunda saptama süresinin 7 günden daha fazla olabildiği bildirilmektedir<sup>3</sup>. Bu nedenle sisteme yüklemmeden önce en fazla 36°C'de 4 saat inkübasyonu önermişler ve daha fazla inkübasyon durumunda nonfermentatif bakterilerin üreme eğrilerinin sistem tarafından yeterince etkin bir şekilde saptanamadığını ve buna bağlı olarak pozitif saptama süresinin uzadığını ve yalancı negatiflik oranının arttığını vurgulamışlardır<sup>3</sup>.

Bu çalışmanın planlanmasında, hastane binalarımızın şehrin iki ayrı bölgesinde bulunması, otomatize kan kültür sisteminin ise yerleşke içindeki hastanede bulunan mikrobiyoloji laboratuvarında yer alması rol oynamıştır. Yerleşke dışındaki hastaneden merkez laboratuvara örneklerin gün içinde belirli aralıklarla taşınması, gece belirli bir saatten sonra taşıma işleminin acil örneklerin dışında yapılmaması ve bu örneklerin diğer hastanede etüvde inkübasyona bırakılıyor olması nedeniyle bu konunun araştırılmasının önemli olduğu düşünülmüştür. Daha önce yayınlanmış çalışmalarda nonfermentatifler dışındaki mikroorganizmalarda sorun saptanmadığı bildirilmiştir<sup>2,3</sup>. Bu nedenle çalışmamızda öncelikle iki önemli nonfermentatif bakterinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bizim çalışmamızda, *P.aeruginosa* suşunun farklı yoğunluktaki tüm örnekleri 24 saatten daha kısa süre içinde cihaz tarafından pozitif olarak saptanmıştır. Etüvde bekletilmeden hemen cihaza yapılan yüklemelerde bakteri yoğunluğu azaldıkça saptama süresi uzamıştır, ancak yine de 24 saati aşmamıştır. Benzer durum diğer pre-inkübasyon sürelerinde de gözlenmiştir.

Klaerner ve arkadaşları<sup>3</sup> da 36°C'de pre-inkübasyon yapmaksızın dilüsyon oranı arttıkça saptama süresinin uzadığını bildirmişlerdir. Aynı merkezden 2004 yılında yapılan benzer bir çalışmada da aynı hipotez BacT/Alert "FA medium" şişeleri kullanılarak test edilmiştir<sup>2</sup>. Bu araştırmacılar ise *P.aeruginosa* için yalancı

negatiflik oranını, "FA medium" şişelerinde (%9.1) "FAN medium" şişelerine (%46.9) göre çok daha düşük bulduklarını bildirmişlerdir. *P.aeruginosa* klinik suşunun 8 saat ve daha fazla pre-inkübasyonda tutulması durumunda sistem tarafından beş gün içinde saptanamadığını, *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşunun 8 saatlik pre-inkübasyon sonrası saptandığını 16 saat ve daha fazla inkübasyonda beş gün içinde saptanamadığını belirtmişlerdir<sup>2</sup>. Ancak aynı suşların oda ısısında aynı sürelerde tutulması durumunda 24 saat içinde pozitif saptamanın gözlemlendiğini vurgulamışlardır. Yine aynı çalışmada 1/10.000 ve 1/100.000 dilüsyondaki örneklerde 35°C'de 0, 16 ve 24 saatlik pre-inkübasyon süresi sonunda üremeler araştırılmış ve 16 saatlik pre-inkübasyon süresi içinde yalancı negatifliğe rastlanmadığı belirtilmiştir<sup>2</sup>.

Bizim çalışmamızda *A.baumannii* suşunda 0.5 McFarland başlangıç yoğunluğunda hem direk sisteme yükleme ve hem de 36°C'de farklı pre-inkübasyon sürelerinden sonra cihaza yapılan yüklemelerde 24 saat içinde pozitif saptama sinyali alınmış ve yapılan pasajlarda da *A.baumannii* ile uyumlu üremeler gözlenmiştir. Ancak pozitif saptama süreleri *P.aeruginosa* ile karşılaştırıldığında daha uzun bulunmuştur. Yoğun konsantrasyonlarda pre-inkübasyon süresi uzadıkça sistemde saptanma süreleri uzun iken, daha düşük konsantrasyonda pre-inkübasyon süresi uzadıkça saptanma süreleri kısalmış olarak gözlenmiştir. Bu durumun, bakterinin metabolik aktivitesi ve üreme eğrisine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Daha düşük konsantrasyonlarda sisteme yüklenmeden önce pre-inkübasyon süresinde bakterinin ancak logaritmik faza gelebildiği ve sisteme yüklendikten sonra yüksek konsantrasyonlara göre daha çabuk saptanabildiği düşünülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda ise sisteme giriş yapılmadan 36°C'de bekleme süresi uzadıkça bakterinin üreme eğrisini tamamladığı ve bu durumun da sistem tarafından saptanma süresini uzattığı düşünülmüştür. Seegmüller ve arkadaşları<sup>2</sup> da çalışmalarında, benzer şekilde uzun pre-inkübasyon süresinin ve yüksek inokulum miktarının yalancı negatiflik oranını artırdığını bildirmişlerdir. Chapin ve Lauderdale<sup>12</sup> BACTEC-9240 ve DifcoESP sistemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, Difco ESP sistemine hemen yükleme yapılamayacaksa 8 saat 35°C'de inkübe edilebileceğini, bundan daha fazla bir süre sonra sisteme giriş yapılacaksa oda ısısında bekletilmesini, BACTEC-9240 sisteminde ise hemen sisteme giriş yapılamayacaksa 35°C'de 24 saate kadar bekletilebileceğini, 24 saatten daha uzun bir süre sonra sisteme giriş yapılacaksa oda ısısında bekletmeyi önermişlerdir. Bu araştırmacılar, *P.aeruginosa* ve *S.maltophilia* gibi iki nonfermentatif bakterinin de BACTEC-9240 tarafından 24 saate kadar 35°C'de pre-inkübasyon sonrası saptanabildiğini bildirmişlerdir<sup>12</sup>. Akan ve Yıldız'ın<sup>8</sup> çalışmasında, sisteme giriş gecikecekse oda ısısında bekletmenin 35°C'de bekletmekten daha iyi olduğu vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda, hem *P.aeruginosa* hem de *A.baumannii* için farklı yoğunluklardaki şişelerin farklı pre-inkübasyon sürelerine rağmen, sistem tarafından yükleme yapıldıktan sonraki 24 saat içinde pozitif saptanabildiği gözlenmiştir. *A.baumannii* için saptama süresi daha uzun olmakla birlikte bu bakterinin de 16 saat 36°C'de inkübasyondan sonra sisteme giriş yapıldığında bile en geç 19 saat içinde üremenin sistem tarafından saptanabildiğini, yani toplam süre olarak örnek alımından yaklaşık 35 saat içinde üremenin belirlenebildiği izlenmiştir. Bu ön çalışmamız, şehrin iki ayrı bölgesinde iki ayrı hastanemizin

olması ve bakteriyeminin saptanmasında son derece kıymetli olan kan kültürü örneklerinin taşıma sisteminden ve sisteme yüklemeye önceki koşullardan ne kadar etkilendiğinin, kendi koşullarımız içinde değerlendirilmesini ve kendimize yönelik bir protokol geliştirilmesini sağlaması açısından oldukça önemlidir.

Kan kültür şişelerinin otomatize sistemlere girişi gecikecekse, oda ısısında mı yoksa 36°C'de belli bir süre inkübasyondan sonra mı sisteme yüklenmesi gerektiği halen açık değildir. Bazı çalışmalarda özellikle nonfermentatifleri de göz önünde bulundurarak 4-8 saati geçmeyecek şekilde 36°C'de, süre uzayacaksa oda ısısında pre-inkübasyon önerilmektedir<sup>2,3</sup>. Yine pre-inkübasyonda tutulmuş şişeler sisteme yüklenmeden önce örnek alınıp boyama ve pasajı yapıldıktan sonra yüklenirse, sistemin saptamakta zorlandığı durumlarda yardımcı olabileceği ve yalancı negatiflik oranının düşeceği belirtilmiştir<sup>3</sup>. Buna karşın Meessen ve Vries-Hospers<sup>13</sup>, yükleme öncesi pre-inkübasyonda tutulan tüm şişelerin pasajının zaman alıcı olduğunu, bunun yerine bu tip şişelerde sisteme giriş yapılmadan önce şişelerin tabanına bakılarak gözle görülür bir renk değişimi (sarı) varsa boyama ve pasajın yapılmasının daha akılcı olduğunu ifade etmişlerdir.

Bizim çalışmamız, kendi çalışma koşullarımızda ve şu an laboratuvarımızda kullanılmakta olan sistemin nonfermentatif bakteriler için 36°C'de 16 saate kadar pre-inkübasyon sonrası saptamaya olanak tanıdığını göstermiştir. Bu konuda üretici firmaların önerileri önemli olmakla birlikte, örneklerin laboratuvara hemen ulaşmasının mümkün olmadığı durumlarda nasıl bir yol izlenmesi gerektiğinin belirlenebilmesi amacıyla, laboratuvarların kullandıkları sistemleri benzer çalışmalar ile test etmelerinin yararlı olacağı kanaatindeyiz. Ancak mümkün olan en kısa sürede, benzer şekilde yapılmış çalışmalar da göz önüne alındığında 8-16 saati geçmeyecek şekilde sisteme girişlerin yapılması, yalancı negatiflik oranını azaltacak ve sistem tarafından daha kısa sürede saptamaya olanak tanıyacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Başustaoğlu A, Gün H. Kan kültürleri hakkında bilmemiz gerekenler. *Hast İnfek Derg* 1998; 2: 15-9.
2. Seegmüller I, Eschenbach U, Kamereck K, Miethke T. Sensitivity of the BacT/ALERT FA-medium for detection of *Pseudomonas aeruginosa* in pre-incubated blood cultures and its temperature-dependence. *J Med Microbiol* 2004; 53: 869-74.
3. Klaerner HG, Eschenbach U, Kamereck K, Lehn N, Wagner H, Miethke T. Failure of an automated blood culture system to detect nonfermentative gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1036-41.
4. Bakır M. Nozokomiyal gram negatif bakteriyemi. *Hast İnfek Derg* 1998; 2: 200-9.
5. Viganò EF, Vasconi E, Agrappi C, Clerici P. Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 235-40.
6. Mirrett S, Reller LB, Petti CA, et al. Controlled clinical comparison of BacT/ALERT standard aerobic medium with BACTEC standard aerobic medium for culturing blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2391-4.
7. Ardic N, İlga U, Ozyurt M, Haznedaroglu T. Comparison of BACTEC and BacT/ALERT systems in evaluation of blood cultures. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38: 409-14.

8. Akan OA, Yıldız E. Comparison of the effect of delayed entry into two different blood culture systems (BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D) on culture positivity. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 193-6.
9. Durmaz G, Us T, Aydınli A, Kiremitci A, Kiraz N, Akgun Y. Optimum detection times for bacteria and yeast species with the BACTEC 9120 aerobic blood culture system: evaluation for a 5-year period in a Turkish university hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 819-21.
10. Demir M, Kaleli İ, Cevahir N, Mete E, Şengül M. İki yıllık kan kültür sonuçlarının değerlendirilmesi. *İnfek Derg* 2003; 17: 297-300.
11. Kara A, Kanra G, Cengiz AB, Apiş M, Gür D. Pediatric blood culture: time to positivity. *Türk J Pediatr* 2004; 46: 251-5.
12. Chapin K, Lauderdale TL. Comparison of Bactec 9240 and Difco ESP blood culture systems for detection of organisms from vials whose entry was delayed. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 543-9.
13. Meessen NE, de Vries-Hospers HG. Failure of an automated blood culture system to detect nonfermentative gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2803-4.