

Çocukluk Çağı Nötropenik Ateş Ataklarında LightCycler® SeptiFast Testinin Tanısal Doğruluğu

Diagnostic Accuracy of the LightCycler® SeptiFast Assay in the Childhood Febrile Neutropenia

Esra MİMAROĞLU¹, Elvan ÇAĞLAR ÇITAK¹, Necdet KUYUCU², Gönül ARSLAN³

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Onkoloji Bilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Discipline of Pediatric Oncology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Medicine, Discipline of Pediatric Infectious Disease, Mersin, Turkey.

³ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

³ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 12.04.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 02.10.2017

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-TF DTB (EM) 2013-4 TU nolu proje ve TÜBİTAK tarafından 114S061 nolu proje olarak desteklenmiştir.

** Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında uzmanlık tezi olarak hazırlanan çalışmanın bir bölümünü oluşturmaktadır.

ÖZ

Kanser tedavisi alan hastalarda enfeksiyon önemli bir problemdir. Zamanında ve uygun tedavi ile mortalite oranlarında azalma saptanır. Sepsis tanısında kan kültürü altın standart test olmasına karşın birçok faktör çocuk olgularda kan kültürü sonuçlarını etkilemektedir. Bu nedenle gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ile mikrobiyolojik ajanların hızlı tanısı önem kazanmaktadır. Bu çalışmada nötropenik ateşli çocuk olgularda SeptiFast (SF) testi ile kan kültürü karşılaştırılarak testin etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ocak 2013-Aralık 2014 tarihleri arasında, ortalama yaşları 7.56 ± 4.8 (0-18) yıl olan çocukluk çağı kanseri nedeniyle tedavi alan 62 (34 erkek, 28 kız) olgu 94 nötropenik ateş (NA) atak dönemlerinde çalışmaya alınmıştır. Olgulardan antibiyotik başlamadan önce kan kültürü ve SF testi için kan örneği alınmıştır. Örnekler BACTEC 9120 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD) otomatize kan kültür sistemiyle mikrobiyoloji laboratuvarında çalışılmıştır. Üreyen bakterilerin tanımlanması konvansiyonel yöntemlerin yanında VITEK2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) tam otomatize tanımlama

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Elvan Çağlar Çitak, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Onkoloji Bilim Dalı, Yenişehir 33343, Mersin, Türkiye.
Tel (Phone): +90 324 241 0000-22120, **E-posta (E-mail):** caglarcitak@yahoo.com

sistemiyle, antibiyotik duyarlılıkları da yine VITEK2 ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle Mueller-Hinton agar kullanılarak "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre saptanmıştır. SF testi, ticari firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Doksan dört atağın 34 (%36.1)'ünde kan kültürü pozitifliği, 33 (%35.1)'ünde SF test pozitifliği saptanmıştır. Kan kültüründe saptanan ve kontaminasyon olduğu belirlenen beş koagülaz-negatif stafilokok analiz dışında bırakıldığında kan kültürü ile pozitiflik oranı 28/94 (%29.7) olarak belirlenmiştir. Doksan dört NA atağının 25'inde hem kan kültüründe üreme hem de SF testi ile pozitiflik (%26.6) saptanmıştır. Her iki yöntem karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$). İki yöntem arasında %28.7 oranında uyumsuzluk olduğu görülmüştür. Polimikrobiyal enfeksiyonlar sadece SF testiyle belirlenmiştir. Mantar saptanma oranı SF testinde kan kültürüne göre daha fazla bulunmuştur. SF testinin kan kültürü referans alındığında duyarlılığı %91, özgüllüğü %98.3, pozitif prediktif değeri %97, negatif prediktif değeri %96.7, tanısal performansı ise %96.2 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak; bu çalışmada PCR temelli testlerin çocuklarda ve NA ataklarında kullanışlı bir test olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesi için halen kan kültürüne ihtiyaç olsa da, SF testi erken tanı ve etkene yönelik uygun olabilecek tedavilerin başlanması için duyarlı bir test olarak değerlendirilmelidir.

Anahtar sözcükler: Nötropenik ateş; kan kültürü; SeptiFast testi; çocukluk çağı.

ABSTRACT

Infection is the main problem among the patients receiving cancer therapy. The mortality rate can be reduced by the appropriate treatment in the right time. Although blood culture is the gold standard for the diagnoses of sepsis, many factors influence the results of blood culture in children. For this reason, real time polymerase chain reaction (Rt-PCR) has gained importance for the diagnoses of microbiological agents as it is faster than the conventional methods. In this study, we aimed to compare the efficacy of SeptiFast (SF) test with blood culture among children with neutropenic fever. Between January 2013 and December 2014, 62 children (34 boys, 38 girls) mean age 7.56 ± 4.8 (0-18) years with cancer were included in this study during their 94 febrile attacks of neutropenia (NA). Blood samples for blood culture and Septifast test were taken before the initiation of antibiotic therapy. Blood cultures were routinely collected in aerobic and anaerobic media and incubated using the BACTEC 9120 system (Becton-Dickinson Diagnostic Systems, USA). Identification and antimicrobial susceptibility testing of the isolates were performed using the Vitek2® system (bioMérieux, France) according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute. The LightCycler SF test was used according to the manufacturer instructions. Of 94 attacks 34 (36.1%) were positive for blood culture and 33 (35.1%) for SF test. The positivity ratio is found as 29.7% (28/94) by blood culture when the analysis of five coagulase negative staphylococci were excluded due to contamination. Positivity was detected in 25 (26.6%) of the 94 NA both with blood culture and SF test. The difference between these two tests was statistically significant ($p < 0.05$). There was discordance with a rate of 28.7% between these two methods. Polymicrobial infections were detected only with SF test. The detection of fungal infection rate was higher with SF test than blood culture. When SF test was compared with blood culture the results were as follows; sensitivity 91%, specificity 98.3%, positive predictive value 97%, negative predictive value 96.7%, diagnostic performance was 96.2%, respectively. As a result, PCR based tests can be used in children with NA attacks even though blood culture is still needed to perform the antibiotic sensitivity tests. SF test seems to be a sensitive test for the early diagnosis of the pathogens and the initiation of the appropriate therapy according to the etiological agent.

Keywords: Febrile neutropenia; blood culture; SeptiFast test; children.

GİRİŞ

Kan akımı enfeksiyonları hem nötropenik hem de kritik olgularda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir¹. Kan kültürü kan akımı enfeksiyonlarını saptamada altın standart

yöntemdir². Antibiyotik başlanmışsa duyarlılığın azalması, mantarlar için uzun inkübasyon süresi gereksinimi ve nadir mikroorganizmaların tanımlanmasındaki zorluklar kan kültürü için önemli sorunlardır^{3,4}.

Moleküler yöntemler ciddi enfeksiyonlarda mikroorganizmaların hızlı bir şekilde tanımlanmasını, etkin ve doğru tedaviye başlanmasını sağlamaktadır⁵. LightCycler® SeptiFast (SF) Testi (SeptiFast, Roche Diagnostics, Almanya) birçok patojeni saptayabilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) temeline dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem bakteri ve mantarların DNA dizilerinin tanımlanmasına dayanmaktadır⁶⁻⁸. SF testi, sepsis şüphesi olan olgularda kullanılmakla birlikte, kan kültürüne olan üstünlüğü halen belirsizliğini korumaktadır. Meta-analizler, SF testinin kabul edilebilir bir duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu analizlerde bakteri alt gruplarının heterojen olması nedeniyle, elde edilen sonuçların başka çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir^{9,10}.

Bu çalışma, kanser tedavisi gören nötroopenik ateşi (NA) olan çocuklarda kan akımı enfeksiyonlarının hızlı mikrobiyolojik tanısı için SF testinin etkinliğinin belirlenmesi ve sonuçların kan kültürü ile karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı (Onay No: 2013-181) alındı ve hastalar "Aydınlanmış Onam Formu" ile bilgilendirildi.

Olgular ve Örneklem

Ocak 2013-Aralık 2014 tarihleri arasında, ortalama yaşları 7.56 ± 4.8 (0-18) yıl olan çocukluk çağı kanseri nedeniyle tedavi alan 62 (34 erkek, 28 kız) olgu 94 NA atağı dönemlerinde çalışmaya alındı. NA koltuk altı ateşinin bir kez 38°C ve üstünde ya da 12 saat arayla iki kez 37.5°C ve üstünde olmasıyla birlikte mutlak nötrofil sayısının $0.5 \times 10^9/\text{L}$ 'nin altında olması ya da $0.5-1 \times 10^9/\text{L}$ arasında olup 24-48 saat içinde $0.5 \times 10^9/\text{L}$ 'nin altına düşmesinin beklenmesi olarak tanımlandı¹¹. Ateş kan ya da kan ürünü alımından sonra olmuşsa NA olarak değerlendirilmedi. Aynı hastada her bir kemoterapi küründen sonra gelişen NA atakları yeni bir atak olarak değerlendirildi. Başvuru sırasında olguların öyküsü alındı ve fizik muayeneleri enfeksiyon odağının saptanması amacıyla detaylı olarak yapıldı. Laboratuvar analizinde tam kan sayımı, periferik yayma, C-reaktif protein, karaciğer enzimleri ve böbrek fonksiyonları değerlendirildi. Ayrıca kateteri olan olgulardan kateter kültürü alındı. Solunum problemi olan olgularda akciğer grafisi ve mantar enfeksiyonu düşünülen olgularda akciğer tomografisi ile abdominopelvik ultrasonografik inceleme yapıldı.

Kan Kültürü

Olguların başvurusunda antibiyotik tedavisine başlamadan ve ilk kan kültüründen 30 dakika sonra ikinci kültür venöz yoldan alındı. Örneklerin kültürü mikrobiyoloji laboratuvarında BACTEC 9120 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, ABD) otomatize

kan kültür sisteminde inkübe edildi. Yedinci günde üreme olmayan örnekler negatif olarak değerlendirildi. Pozitif üreme olan kan kültürlerinin Gram boyamaları ile %5'lik koyun kanlı agar, "eosin methylene blue (EMB)" agar, çikolata agar ve Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerlerine ekimleri yapıldı, 35°C'de 24 saat inkübasyon sonrası değerlendirilmeye alındı. Gram boyamada bakteri görülmeyen ve üreme saptanmayan örnekler aynı şekilde tekrar işleme alındı ve üreme saptanmayan örnekler yalancı pozitif olarak değerlendirildi. Üreyen bakterilerin tanımlanması konvansiyonel yöntemlerin yanında VITEK2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) tam otomatize tanımlama sistemiyle antibiyotik duyarlılıkları da yine VITEK2 ile ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle Mueller-Hinton agar kullanılarak "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre değerlendirildi. Koagülaz-negatif stafilkokok (KNS), streptokok ve *Bacillus* cinsi bakteriler gibi flora bakterisi olma ihtimali olan ve kontaminasyona neden olabilecek üremeleri bakteremilerden ayırmak için aşağıda belirtilen üç kriter kullanıldı:

(i) Yetmiş iki saatten daha kısa süre içinde alınmış iki ya da daha fazla kan kültüründe üreme olması, (ii) Aynı mikroorganizmanın başka bir odaktan enfeksiyon etkeni olarak izole edilmesi ve (iii) Yirmi dört saat içinde üremiş olması¹².

SeptiFast (SF) Yöntemi

SF testi, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında ticari firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Test çalışması, örneğin hazırlanması (mekanik parçalama ve DNA saflaştırması), Rt-PCR amplifikasyonu, hibridizasyon problemleriyle bakteri ve mantar DNA'sının saptanması "SeptiFast Identification Software (SIS)" programı ile otomatik olarak tanımlanmasını içermektedir. SF testi için kullanılan kan miktarı ticari firmanın önerileri doğrultusunda 1.5 ml olarak belirlendi. Örneğin, mekanik parçalanması MagNA Lyser cihazında SeptiFast Lys Kit MGRADE (Roche Diagnostics, Almanya) kiti kullanılarak yapıldı. Her çalışmada negatif ve pozitif kontrol kullanıldı ve her örneğe internal kontrol DNA saflaştırmasından önce konuldu. DNA amplifikasyonu LightCycler 2.0 cihazında gram-pozitif, gram-negatif bakteri ve mantar olmak üzere üç farklı Rt-PCR reaksiyonuyla gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda, bakterinin 16S ve 23S ribozomal RNA dizisi arasında lokalize "the internal transcribed spacer region (ITS)" bölgesi ve mantarın 18S ve 5.8S ribozomal RNA dizisi hedef olarak seçildi. Tür tanımlaması SF tanımlama yazılımı ile "melting curve (Tm)" analizi yapılarak gerçekleştirildi. SF testi ile sepsis etkeni olarak tanımlanabilen mikroorganizmalar Tablo I'de gösterilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Klinik bulguların sunumunda sürekli değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma ve ortanca değerler kullanıldı. Kategorik verilerin özetlenmesi için frekans ve yüzdelere verildi. SF testi ve kan kültürü sonuçları arasındaki farklılık, Pearson ki-kare testi kullanılarak değerlendirildi. Hesaplamalar MedCalc paket programında yapıldı ve istatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak alındı.

Tablo I. LightCycler® SeptiFast Test Tarafından Saptanabilen Mikroorganizmalar

Gram-pozitif bakteriler	Gram-negatif bakteriler	Mantarlar
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Koagülaz-negatif stafilokok ^a (<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Streptococcus spp.</i> ^a (<i>S.pyogenes</i> , <i>S.agalactiae</i> , <i>S.mitis</i>)	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida glabrata</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	

^a Koagülaz-negatif stafilokok ve *Streptococcus spp.* için yarı nicel analitik eşik değeri üretici tarafından gerçek patojen ile cilt florası için ayrı ayrı verilmiştir.

BULGULAR

Hastaların %33.9'u lenfoma, %48.4'ü solid tümör ve %17.7'si diğer kanserler olarak takip ve tedavi edilen olgular olarak saptanmıştır. Olguların %11'i Evre II, %56.5'i Evre III ve kalanı Evre IV hastalık olarak izlenmekte olan hastalar olarak tespit edilmiştir. Başvuruda ortalama mutlak nötrofil sayısı $0.24 \pm 0.38 \times 10^9/L$ olarak belirlenmiştir. Ortanca nötropeni ve ateş süreleri sırasıyla 11 (3-48) ve 6 (1-14) gün olarak bulunmuştur. Olguların klinik ve laboratuvar bulguları Tablo II'de gösterilmiştir.

Atakların 34/94 (%36.1)'ünde kan kültürü pozitifliği, 33/94 (%35.1)'ünde SF testi pozitifliği saptanmıştır. Kan kültürü ile 34 mikroorganizma (14'ü gram-negatif, 16'sı gram-pozitif, 4'ü mantar), SF testi ile 37 mikroorganizma (20'si gram-negatif, 10'u gram-pozitif, 7'si mantar) belirlenmiştir. Hem kan kültürü hem de SF test pozitifliği olan 21 olgu saptanmış, bunların 11'inin gram-negatif, yedisinin gram-pozitif ve üçünün mantar olduğu gözlenmiştir. Kan kültüründe saptanan 33 mikroorganizmadan 6 [%17.6 (4 gram-negatif, 2 gram-pozitif)]'sının SF testi tarafından saptanabilen mikroorganizmalar arasında bulunmadığı saptanmıştır (Tablo III).

Kan kültüründe saptanan 10 KNS'nin beş tanesi iki kültürden yalnızca bir kültürde ürettiği için kontaminasyon olarak kabul edilmiştir. Bu olgular çıkartıldığında kan kültürü pozitiflik oranı 28/94 (%29.7) olarak belirlenmiştir. Her iki yöntem karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Örneklem içinde yer alan örneklerin 25/94 (%26.6)'ünde hem kan kültürü hem de SF testi pozitif olarak tespit edilmiştir.

Kan kültürü ve/veya SF testinde saptanan mikroorganizmaların listesi karşılaştırmalı olarak Tablo III'te verilmiştir. Polimikrobiyal enfeksiyonlar sadece dört atakta SF test ile saptanmış ve saptanan mikroorganizmalar Tablo IV'te gösterilmiştir.

Kan kültürü ve SF testi sonuçlarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi Tablo V'te gösterilmiştir.

Tablo II. Olguların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Yaş [yıl, ortalama ± SD (aralık)]	7.56 ± 4.8 (0.5-17)
Cinsiyet [n (%)]	
Erkek	34 (%54.8)
Kız	28 (%45.2)
Hastalık [n (%)]	
Non-Hodgkin lenfoma	21 (%33.9)
Nöroblastom	8 (%12.9)
Osteosarkom	6 (%9.7)
Ewing sarkom	5 (%8.1)
Rabdomiyosarkom	5 (%8.1)
Wilms tümörü	3 (%4.8)
Germ hücreli tümör	3 (%4.8)
Diğerleri	11 (%17.7)
Evre [n (%)]	
II	7 (%11.3)
III	35 (%56.5)
IV	20 (%32.3)
Nötropenik ateş sınıflaması [n (%)]	
Nedeni bilinmeyen ateş	43 (%45.7)
Klinik dokümanate enfeksiyon	21 (%22.3)
Mikrobiyolojik dokümanate enfeksiyon	30 (%31.9)
Lökosit sayısı (x10 ⁹ /L, ortalama ± SD)	0.605 ± 0.313
Mutlak nötrofil sayısı (x10 ⁹ /L, ortalama ± SD)	0.243 ± 0.386
Mutlak monosit sayısı (x10 ⁹ /L, ortalama ± SD)	0.03 ± 0.015
Hemoglobin (g/dl)	8.37 ± 1.68
Trombosit sayısı (x10 ⁹ /L, ortalama ± SD)	112.297 ± 95.082

Kan kültürü ile SF testi sonuçları arasında uyumsuzluk olduğu saptanmıştır. Beş mikroorganizma (*Campylobacter fetus*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus spp.*) SF testi analizinde olmadığı için kan kültürü ile saptanırken, gram-negatif mikroorganizmalar arasında iki *Klebsiella pneumonia/oxytoca*, bir *Escherichia coli*, bir *Pseudomonas aeruginosa* ve bir *Proteus mirabilis* polimikrobiyal enfeksiyon etkeni olarak SF testiyle saptanmıştır. Bir olguda SF testi ile tanımlanan *Serratia marcescens* kan kültüründe üretilmemiş ancak idrar kültüründe aynı mikroorganizma üremiştir. *K.pneumoniae/oxytoca* için farklılık olan iki olguda polimikrobiyal enfeksiyon belirlenmiş, beraberinde bu olguların birinde pnömoni diğerinde ise yara yeri enfeksiyonu saptanmıştır. *P.aeruginosa* için SF testi ile iki olguda farklılık belirlenmiştir. Bu olguların birinde polimikrobiyal enfeksiyon varken diğer olguda belirgin bir enfeksiyon odağı saptanmamıştır.

Tablo III. Başvuruda Kan Kültürü ve/veya LightCycler® SeptiFast testi (SF)^a ile İzole Edilen Mikroorganizmalar

Tür	Saptanan tür sayısı		
	Kan kültürü n	SF n	Kan Kültürü ve SF n
Gram-negatif bakteri	13	20	11
<i>Escherichia coli</i>	2	3	2
<i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca^a</i>	4	6	4
<i>Serratia marcescens</i>	-	1	-
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	5	3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	1	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1	1
<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	-	1	-
<i>Campylobacter fetus^b</i>	1	-	-
<i>Citrobacter freundii^b</i>	1	-	-
Gram-pozitif bakteri	16	9	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	1	-
Koagülaz-negatif stafilokok (<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i>)	10	5	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2	1
<i>Streptococcus spp.</i> (<i>S.pyogenes</i> , <i>S.agalactiae</i> , <i>S.mitis</i>)	3	1	1
<i>Enterococcus faecium/faecalis^a</i>	-	-	-
<i>Bacillus cereus^b</i>	1	-	-
<i>Bacillus spp.^b</i>	1	-	-
Mantar	4	7	3
<i>Candida albicans</i>	3	2	2
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	1	2	1
<i>Candida crusei</i>	-	1	-
<i>Candida glabrata</i>	-	1	-
<i>Aspergillus</i>	-	1	-

^a SF testi ile saptanan ancak tür olarak ayrımı yapılamayan mikroorganizmalar ikili olarak belirlenmiştir (*K.pneumoniae/K.oxytoca*, *E.cloacae/E.aerogenes*, *S.epidermidis/S.haemolyticus*, *S.mitis/S.agalactiae*).

^b SF testi analizinde olmayan mikroorganizmalar.

Tablo IV. LightCycler® SeptiFast Test ile Saptanan Polimikrobiyal Enfeksiyon Etkenleri

Olgu	Polimikrobiyal enfeksiyon etkenleri
1	Koagülaz-negatif stafilokok (<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i>) <i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i> <i>Candida crusei</i>
2	Koagülaz-negatif stafilokok (<i>S.epidermidis</i> , <i>S.haemolyticus</i>) <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>
3	Koagülaz-negatif stafilokok (<i>S.epidermidis</i> , <i>S.haemolyticus</i>) <i>S.pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida glabrata</i>
4	<i>E.coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>K.pneumoniae/oxytoca</i>

Tablo V. Kan Kültürü ile LightCycler® SeptiFast Test Sonuçlarının Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

LightCycler® SeptiFast	Kan kültürü		Total
	Pozitif (%)	Negatif (%)	
Negatif (%)	22	15	37
Pozitif (%)	12	45	57
Total	34	60	94

Gram-pozitif mikroorganizmalar değerlendirildiğinde; 10 olguda KNS üremesi saptanmış, ancak NA'nın başvuru sırasında alınan iki kan kültüründen yalnız bir tanesinde üreme olması nedeniyle beş KNS suşunun kontaminasyon olduğu kabul edilmiştir. Kan kültüründe üreme olmamasına karşın, SF testi ile saptanan üç KNS ve iki *Streptococcus pneumoniae*'nin polimikrobiyal enfeksiyonlara ait bir etken olarak saptandığı belirlenmiştir (Tablo IV). KNS iki olguda hem kan kültürü hem de SF testinde saptanmıştır. Bu olgularda tedaviye bağlı olarak yaygın oral mukozit saptanmıştır. Diğer üç olguda herhangi bir enfeksiyon odağı olmamasına karşın, 48-72 saat içerisinde tedaviye vankomisin eklenmesiyle birlikte, 8-12 saat içerisinde ateşlerinin düştüğü gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus* bir olguda yalnız SF testi ile saptanmıştır. Bu olguda pnömoni ve ciddi mukozit saptanmıştır. Yalnız SF testi ile saptanan ve polimikrobiyal enfeksiyona neden olan etkenlerden *S.pneumoniae* iki olguda lobar pnömoni etkeni olarak belirlenmiştir.

Mantar enfeksiyonları açısından değerlendirme yapıldığında; *Candida glabrata* ve *Candida crusei*'nin polimikrobiyal enfeksiyon etkenleri arasında oldukları saptanmıştır. SF testi ile *Aspergillus fumigatus* varlığı tespit edilen olguda toraks bilgisayarlı tomografide mantar topu saptanmıştır. Kan kültüründe *Candida albicans* saptanan olguda mukozit varlığı tespit edilmiştir. *Candida parapsilosis* ise tifilit olan olguda belirlenmiştir.

SF testi kan kültürü ile karşılaştırıldığında testin duyarlılığının %91, özgüllüğünün %98.3, pozitif prediktif değerinin %97, negatif prediktif değerinin %96.7, tanısal performansının ise %96.2 olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda çocukluk çağı kanserlerinin tanı ve tedavilerindeki olumlu gelişmelere karşın enfeksiyonlar halen önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Hızlı mikrobiyolojik tanı ile erken ve özgül antibiyotik tedavisinin başlanması sonuçları olumlu bir şekilde etkilemektedir. Mikrobiyolojik tanı olmadığında geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gerekmekte ve bu durum antimikrobiyal direncin artmasıyla birlikte yüksek maliyetlere neden olmaktadır^{9,13}. Gram-negatif bakteriler NA'da önemli enfeksiyon etkenleridir fakat yıllar içerisinde gram-pozitif bakteriler ön plana geçmiştir¹⁴.

Sepsis tanısında halen altın standart test kan kültürü olmaya devam etmektedir¹⁵. Alınan kan miktarı, alınma tekniği, kan kültürü alınan bölgenin temizliğinde kullanılan maddeler sonuçları etkilemektedir. Özellikle kontaminasyonlar NA'da önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ayrıca kültür sonuçlarının geç sonuçlanması da uygun antibiyotik seçimlerinde gecikmelere neden olmaktadır. Bu durum kan kültüründen farklı yöntemlerle hızlı ve doğru mikroorganizma izolasyonunun gerekliliğini doğurmuştur¹⁵.

Mikroorganizmaların hızlı saptanmasında kullanılan Rt-PCR yöntemleri kanda dolaşan mikroorganizmaların nükleik asit tespitine dayanan bir yöntemdir. Yöntem bakteri tanısında 16S ve 23S bölgeleri arasındaki iç transkripsiyon bölge dizinlerinin amplifikasyon ve dizi analizlerini kullanırken, mantarların tanısında 18S ve 5.8S ribozomal DNA amplifikasyonu ve dizi analizini kullanmaktadır¹⁵.

Sepsisli olgularda saptanmış kan kültürü pozitiflik oranları çalışmalarda farklılık göstermektedir^{16,17}. Her ne kadar mikroorganizmaları üretilebilmesi enfeksiyon şiddeti ile orantılı olsa da; sepsis ve septik şokta kan kültürü pozitiflik oranı yaklaşık olarak %40 olarak saptanmıştır¹⁶. Önceki çalışmalarda SF testi gibi Rt-PCR temelli tekniklerin mikroorganizma izolasyon oranını artırdığı görülmektedir⁶⁻⁸. Yapılan çalışmalar SF testinin sonuçlarının farklılıklarını ortaya koymaktadır. Bazı çalışmalarda SF testi kan kültürüne göre üstün gözükürken, bazı çalışmalarda eşit, bazı çalışmalarda ise daha düşük duyarlılıkta bildirilmektedir^{6,8,9,18,19}. Çalışmalardaki hasta grupları, saptanan mikroorganizmalardaki farklılıklar, alınan kan kültürü sayısı, kan kültürü için alınan kan miktarı ve kan kültürü ve SF testi için kan alımından önce antibiyotik tedavisinin başlanmış ya da başlanmamış olması çalışma sonuçlarında farklılıklara neden olmaktadır. Yapılan bir meta-analizde 41 çalışma irdelenmiş, 10.493 kan kültürü örneği SF testiyle karşılaştırılmıştır. Bu çalışma-

nın sonucunda SF testi kan kültürü ile karşılaştırıldığında SF testinin duyarlılığının %68, özgüllüğünün ise %86 olduğu ancak sepsis şüphesi olan olgularda SF testinin kullanımı konusunda kesin önerilerde bulunulmasının zor olduğu belirtilmiştir¹⁰.

Uygun olmayan ya da geç başlanan antibiyotik tedavisi sepsiste mortalite ve morbiditeyi artırmaktadır. Septik şokta uygunsuz antibiyotik ile mortalite oranı %40'lara ulaşmaktadır. PCR temelli yöntemlerle mikroorganizmanın erken belirlenmesi ve uygun antibiyotik tedavisinin erken başlanması mortalite oranlarında düşüşe katkı sağlamaktadır. Bu durum, yoğun bakım ünitelerinde ve hastanede yatış süresini kısaltmakta ayrıca maliyeti düşürmektedir. Bu nedenle özellikle sepsis ve septik şok düşünülen olgularda moleküler yöntemlerle hızlı sonuçlara ulaşmak önem kazanmaktadır²⁰⁻²⁷.

NA ataklarında kan kültürü ve SF testinin karşılaştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır²⁰⁻²⁷. Kan kültürü pozitifliğini etkileyen önemli faktörlerden biri olgulara kan kültürü alımı öncesinde antibiyotik başlanmasıdır. Bu durumda mikroorganizma yükü azalmakta ve kan kültürü pozitifliği olumsuz yönde etkilenmektedir²⁰⁻²⁷. Çalışmamızda olguların hepsinde antibiyotik başlanmadan önce kan kültürü alınmış olup bu olumsuz faktör dışlanmıştır. Antibiyotik tedavisine başlanması PCR temelli testleri etkilememektedir. SF testi için ise önemli bir kısıtlama antibiyotik duyarlılık testinin eş zamanlı kan kültüründe üreme olması durumunda yapılabilmesi eğer kan kültüründe üreme yoksa duyarlılığın saptanamamasıdır. Çalışmamızda SF testi ile daha fazla pozitiflik sağlanmış ve bunlar klinik ve diğer laboratuvar verileriyle karşılaştırıldığında gerçek enfeksiyon etkenleri olarak kabul edilmiştir. SF testinin önemli bir avantajı da düşük kan hacimlerinde çalışılabilmesi olup, pediatrik olgular için bu durum önem arz etmektedir. Çalışmamızda kontaminasyon olan olgular çıkartıldıktan sonra kan kültürünün pozitiflik oranı %29.7, SF testinin pozitiflik oranı %35.1 olarak saptanmıştır. Çalışmalarda NA atakları sırasında saptanan KK pozitiflik oranı %13-28, SF testi ile pozitiflik oranı %22-33 arasında bildirilmektedir²⁰⁻²⁷. Çalışmalarda elde edilen farklı sonuçların kan kültürü sayısına, kültür için alınan kan miktarına ve kan kültürü öncesi antibiyotik kullanım durumuna bağlı olduğu gözükmemektedir.

Çocukluk çağı NA'da SF testi etkinliğini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada yüksek riskli NA olan çocuk olgularda PCR yöntemi ile patojen saptanma oranı %20 iken, kan kültüründe bu oran %5 olarak bildirilmiştir²⁸. Bu çalışmanın sonucu irdelendiğinde SF testinin çalışmamızda olduğu gibi mikroorganizmaları saptamada daha duyarlı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda polimikrobiyal enfeksiyonlar sadece SF testi ile tanımlanmış olup, bu bulgu az sayıda mikroorganizma yükünde bile ajanların SF testi ile tanımlanabileceğini ve hastalara uygun antimikrobiyal tedavinin tüm organizmaları kapsayacak şekilde verilebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda üç *C.albicans* ve bir *C.parapsilosis* kan kültürü ile tanımlanırken, SF testi ile iki *C.albicans*, iki *C.parapsilosis* ve birer *C.crusei*, *C.glabrata* ve *Aspergillus* tanımlanmıştır. Çalışmamızda literatüre benzer şekilde SF testiyle kan kültürüne göre daha fazla mantar enfeksiyonu saptanmıştır^{20,29,30}.

Çalışmamızda SF testi kan kültürü ile karşılaştırıldığında duyarlılık %91, özgüllük %98.3, pozitif prediktif değer %97, negatif prediktif değer %96.7, tanısal performans ise %96.2 olarak belirlenmiş olup, çocuk olgularda güvenle kullanılabilir bir test olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca çalışmamız PCR temelli testlerin kan akımı enfeksiyonu tanısında yüksek duyarlılığını da göstermiştir.

Çalışmamızın sınırlamalarından birisi, SF ve kan kültürü sonuçları ile antibiyotik tedavisi, tedaviye yanıt ve klinik sonuca etki arasındaki ilişkinin bakılmamış olmasıdır.

Sonuç olarak; PCR temelli testler çocuklarda ve NA ataklarında kullanılması tercih edilebilecek testler arasında yer almaktadır. Her ne kadar antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesi için halen kan kültürüne gereksinim olsa da, SF testi hastaların erken tanısı ve etkene yönelik uygun tedavilerine başlanması açısından duyarlı bir test gibi gözükmektedir. Ayrıca; SF testinin kanser tedavisi uygulanan merkezlerde takip edilen olgularda gelişen NA dönemlerindeki sepsis etkenlerinin belirlenmesinde faydalı bir yöntem olabileceğini düşünmekteyiz. Kan kültürü halen sepsis tanı ve tedavisinde önemli ve altın standart test olma özelliğini sürdürmektedir. Bu nedenle, özellikle çocuk ve NA'lı olgularda SF testinin standardizasyonu için geniş ölçekli çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Marchetti O, Calandra T. Infections in neutropenic cancer patients. *Lancet* 2002; 359(9308): 723-5.
2. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(6): 513-20.
3. Glerant JC, Hellmuth D, Schmit JL, Ducroix JP, Jounieaux V. Utility of blood cultures in community-acquired pneumonia requiring hospitalization: influence of antibiotic treatment before admission. *Respir Med* 1999; 93(3): 208-12.
4. Bauer M, Reinhart K. Molecular diagnostics of sepsis-where are we today? *Int J Med Microbiol* 2010; 300(6): 411-3.
5. Sancho-Tello S, Bravo D, Borrás R, Costa E, Muñoz-Cobo B, Navarro D. Performance of the LightCycler SeptiFast test Mgrade in detecting microbial pathogens in purulent fluids. *J Clin Microbiol* 2011; 49(8): 2988-91.
6. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197(3): 313-24.
7. Walle F, Nseir S, Baumann L, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(6): 774-9.
8. Dierkes C, Ehrenstein B, Siebig S, Linde HJ, Reischl U, Salzberger B. Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 126.
9. Chang SS, Hsieh WH, Liu TS, et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis-a systemic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(5): e62323.
10. Dark P, Blackwood B, Gates S, et al. Accuracy of LightCycler® SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2015; 41(1): 21-33.

11. Kebudi R, Devocioğlu O, Gürler N. Çocukluk Çağı Nötropenik Ateşinde Tanımlar ve Tanı Yöntemleri. *Flora* 2004; 9(2): 75-80.
12. Suberviola B, Márquez-López A, Castellanos-Ortega A, Fernández-Mazarrasa C, Santibáñez M, Martínez LM. Microbiological diagnosis of sepsis: polymerase chain reaction system versus blood culture. *Am J Crit Care* 2016; 25(1): 68-75.
13. Cunha BA. Sepsis and septic shock: selection of empiric antimicrobial therapy. *Crit Care Clin* 2008; 24(2): 313-4.
14. Barton CD, Waugh LK, Nielsen MJ, Paulus S. Febrile neutropenia in children treated for malignancy. *J Infect* 2015; 71(Suppl 1): S27-35.
15. Teranishi H, Ohzono N, Inamura N, et al. Detection of bacteria and fungi in blood of patients with febrile neutropenia by real-time PCR with universal primers and probes. *J Infect Chemother* 2015; 21(3): 189-93.
16. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, et al. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30(4): 580-8.
17. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34(2): 344-53.
18. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, et al. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect* 2009; 58(5): 346-51.
19. Josefson P, Strålin K, Ohlin A, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30(9): 1127-34.
20. Mancini N, Sambri V, Corti C, et al. Cost-effectiveness of blood culture and a multiplex real-time PCR in hematological patients with suspected sepsis: an observational propensity score-matched study. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; 14(5): 623-32.
21. Mancini N, Clerici D, Diotti R, et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt5): 601-4.
22. von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raads AD et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2009; 47(8): 2405-10.
23. Lamoth F, Jatón K, Prod'homme G, et al. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2010; 48(10): 3510-6.
24. Bravo D, Blanquer J, Tormo M, et al. Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *Int J Infect Dis* 2011; 15(5): e326-31.
25. Guido M, Quattrocchi M, Zizza A, et al. Molecular approaches in the diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Prev Med Hyg* 2012; 53(2): 104-8.
26. Reers Y, Idevich EA, Patkau H, et al. Multiplex PCR assay underreports true bloodstream infections with coagulase-negative staphylococci in hematological patients with febrile neutropenia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 85(4): 413-5.
27. Paolucci M, Stanzani M, Melchionda F, et al. Routine use of a real-time polymerase chain reaction method for detection of bloodstream infections in neutropenic patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75(2): 130-4.
28. Sontoloya ME, Farfan MJ, De La Maza V, Cocina M, Santelices F, Alvarez AM. Diagnosis of bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with cancer. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(11): 957-61.
29. Dinç F, Akalin H, Ozakin C, et al. Comparison blood culture and multiplex real-time PCR for the diagnosis of nosocomial sepsis. *Minerva Anestesiol* 2016; 82(3): 301-9.
30. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, et al. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care* 2010; 14(4): R159.