

Kan Kültürlerinde Mikroskopik İncelemenin Önemi

Çiğdem KUZUCU(*), Melek AYAN(*), Bengül DURMAZ(*)

ÖZET

Kanda bulunan mikroorganizmaların hızlı bir şekilde saptanması klinik mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevlerinden birisidir. Bu çalışmada BacT/Alert otomatize kan kültür sisteminde, tüm kültür şişelerinden Gram ve metilen mavisi boyama yöntemleri kullanılarak yapılan mikroskopik incelemenin önemi araştırılmıştır. Çalışmaya 142'si pozitif alarm veren, 608'si negatif toplam 750 kan kültürü alınmıştır. Pozitif alarm veren 142 kan kültürünün 115'inde bakteri görülmüş ve bunların 110'unda aerob, 5'inde anaerob bakteri üremiştir. Pozitif alarm veren 27 örnekte her iki boyama yöntemi ile bakteri görülmemesine rağmen, bunların 2'sinde inkübasyonun sekizinci gününde *Brucella* cinsi bakteri üremiş, diğerlerinin kültürlerinde de aerob ve anaerob üreme olmamıştır (Yalancı pozitiflik oranı % 18). Üreme alarmı vermeyen 608 örneğin 606'sında bakteri görülmemiş ve bunların kültürlerinde de üreme olmamıştır, iki örnekte Gram negatif bakteri görülmüş ve kültürde *Pseudomonas aeruginosa* üremiştir (yalancı negatiflik oranı % 0.3). BacT/Alert FAN şişelerden yapılan mikroskopilerde besiyerindeki kömür tozu partikülleri nedeniyle Gram boyamanın değerlendirilmesinde güçlük yaşanırken, metilen mavisi ile yapılan boyamada bu sorun olmamıştır. Bu nedenle her iki boyama yönteminin birlikte değerlendirilmesinin uygun olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Kan kültürü, Gram boyama, metilen mavisi boyama

SUMMARY

The Importance of the Microscopic Examination of Blood Cultures

Rapid, reliable determination of microorganisms from blood is one of the most important functions of clinical microbiology laboratory. In this study, the importance of Gram stain and methylene blue stain were investigated for all of the blood culture bottles monitored by the BacT/Alert system. A total of 750 blood cultures were examined. Of these 142 were positive signaling bottles and 608 had no signal. Microorganisms were observed in 115 out of 142 positive blood culture bottles. Of these 110 were aerobic and five were anaerobic microorganisms. No microorganisms were detected in 27 blood culture bottles despite positive signaling, *Brucella* spp. were isolated from two blood cultures on the eighth day of incubation (The false positive rate was 18 %). No microorganisms were detected in 606 out of 608 negative signaling bottles. Gram negative microorganisms were observed in two bottles and *P.aeruginosa* were isolated from both of these cultures (The false negative rate was 0.3 %). Although the evaluation of Gram stained smears were more difficult for BacT/Alert FAN media due to the charcoal particles in the media, there were no problems associated with methylene blue stain. Therefore, both staining methods can be used simultaneously for microscopic examination.

Key words: Blood culture, Gram stain, methylene blue stain.

GİRİŞ

Septisemiye neden olan mikroorganizmaların saptanması, izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıkların saptanması klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının en önemli fonksiyonlarından birisidir (1). Bakteriyemili hastaların tedavilerinin başlamasında kan kültür raporlarının önemi büyüktür (2). Bu nedenle mikrobiyologlar etkenin hızlı bir şekilde saptanması ve izolasyonunda optimal yöntemleri seçmelidirler (1). Bu çalışmada ampirik tedaviyi yönlendirmede yol göstermek amacıyla kan kültürlerinde mikroskopik incelemenin öneminin vurgulan-

ması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya üç aylık period sırasında BacT/Alert otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal veren ve negatif olan toplam 750 kan kültürü alınmıştır. Kan kültür şişesi olarak hem standart BacT/Alert aerobik şişeler hem de BacT/Alert FAN şişeleri kullanılmıştır. Şişelerdeki besiyerlerinden hazırlanan preparatlar hem Gram hem de metilen mavisi boyama yöntemleriyle boyanmış, ayrıca kanlı triptik soy agar, eosin methylene blue (EMB) ve çikolatamsı besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kanlı ve EMB besiyerleri aerob ortamda, çikolata besiyerleri % 5 CO₂'li ortamda 48

(*) İnönü üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Malatya.

saat inkübe edilmiştir. Pozitif alarm veren şişelerden yapılan kültürlerde üreme olmadığı durumlarda vitamin K ve hemin ilaveli kanlı Brucella besiyerine ekim yapılarak beş gün inkübe edilmiştir. Pozitif alarm verip aerop ve anaerop üreme olmayan şişeler yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tüm yalancı pozitif olarak saptanan şişelerden yedinci günün sonunda yeniden ekimler yapılmıştır. Mikroorganizmaların identifikasyonu klasik yöntemlerle yapılmış, gerektiği durumlarda doğrulamak amacıyla API 20 E ve BBL Crystal Anaerobe ID sistemleri kullanılmıştır.

BULGULAR

Toplam 750 kan kültür şişesinin 142'si pozitif alarm vermiş 608'i negatif olarak sistemden çıkarılmıştır. Pozitif alarm veren 142 kan kültüründen 115'inde mikroorganizma görülmüş ve bunların 110'unda aerop beşinde anaerop bakteri üremiştir. Üreyen mikroorganizmaların listesi Tablo 1'de gösterilmiştir. Pozitif alarm veren 27 kan kültürünün Gram ve metilen boyamasında mikroorganizma görülmemiş, bunların 25'inde aerop ve anaerop ekim sonucu üreme olmamış ve yalancı pozitif olarak değerlendirilmiştir (Yalancı pozitiflik oranı %18). Diğer iki kan kültürü bruselloz ön tanısı ile infeksiyon hastalıkları kliniğinde yatmakta olan bir hastaya ait olup inkübasyonun yedinci gününde aynı zamanda pozitif alarm vermiştir. Yapılan boyamalar sonucu mikroorganizma görülmemiş ve inkübasyonun 48. saatinde üreme olmaması nedeniyle plakların inkübasyonu uzatılmıştır. İnkübasyonun sekizinci gününde Brucella cinsi bakteri üremiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda negatif çıkan 608 kan kültürünün 606'sında her iki boyama yöntemi ile mikroorganizma görülmemiş ve kültürlerinde de üreme olmamıştır. Negatif çıkarılan iki şişede ise boyama sonucu Gram negatif bakteri görülmüş ve her iki kültürde de *Pseudomonas aeruginosa* üremiştir (Yalancı negatiflik oranı % 0.3). Tablo 2'de tüm kültürlerde Gram ve metilen boyamasıyla üreme sonuçları değerlendirilmiştir. Gram boyama ve metilen boyaması ile mikroorganizmaların % 98 'i saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kanda mikroorganizmaların bulunması önemli morbidite ve mortalite nedeni olduğundan klinik mikro-

Tablo 1. İzole edilen mikroorganizmaların dağılımı:

Mikroorganizma	Sayı
Candida spp	7
Candida albicans	5
Klebsiella oxytoca	16
Salmonella spp.	8
Enterobacter cloacae	4
Escherichia coli	2
Brucella spp.	2
Pseudomonas aeruginosa	5
Non fermentatif Gr(-) çomak	3
Koagülaz (-) stafilokok	32
Staphylococcus aureus	10
Enterokok	3
D grubu streptokok	1
G grubu streptokok	1
C grubu streptokok	1
S.aureus + Enterokok	2
Propionibacterium acnes	4
Anaerop bakteri (tanımlanamadı)	1
Kontaminasyon	11
Toplam	119

Tablo 2. Gram/metilen mavisi ile boyama ve üreme sonuçları

Alarm	Gram/metilen boyama sonucu mikroorganizma		Üreme	
	+	-	+	-
Pozitif (142)	115	27	117	25
Negatif (608)	2	606	2	606
Toplam (750)	117	633	119	631

biyoloji laboratuvarlarında kan kültürlerinin incelenmesi kritik bir öneme sahiptir (3). Çoğu laboratuvar da bu amaçla otomatize kan kültür sistemleri kullanılmaktadır. Antimikrobiyal tedavinin seçiminde yol gösterici olacağından pozitif kan kültürleri, Gram boyama ile boyanarak klinisyene rapor edilmelidir (4). Kan kültür sistemlerinin değerlendirildiği çalışmaların tümünde pozitif alarm veren örneklerden Gram boyama yapılmıştır (2,5,6,7,8). Çalışmamızda hem pozitif hem de negatif toplam 750 kan kültürü Gram ve metilen mavisi boyama yöntemi ile incelenmiştir. Pozitif alarm veren 142 kan kültürünün 115'inde mikroorganizma görülmüş ve bunların subkültürlerinde de üreme olmuştur. Pozitif alarm veren 27 kültürde boyama ile mikroorganizma görülmemiş ve bunların 25'inde aerop ve anaerop üreme saptanmamıştır (Yalancı pozitiflik oranı % 18), ancak iki

kültürde *Brucella* türü bakteri üremiştir. BacT/Alert otomatize kan kültür sistemleriyle yapılan çalışmalarda genellikle yalancı pozitiflik oranı % 0.4-8.4 arasında değişmektedir (5,9,10). Çalışmamızda bu oran % 18 olarak bulunmuştur.

Zor üreyen bir bakteri olan *Brucella* üremesi için özel besiyerleri ve uzun bir inkübasyon dönemi gerektirir. BACTEC besiyerlerinde yaklaşık 3-30 günde üremektedir (3). Özyurt ve ark (11) BacT/Alert sisteminde bruselloz türlerini 23 günde saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda infeksiyon hastalıkları kliniğinden *Brucelloz* ön tanısıyla gönderilen aynı hastaya ait iki kan örneği inkübasyonun yedinci gününde pozitif alarm vermiş, Gram ve metilen mavisi boyamalarında mikroorganizma görülmemiş, 48 saatlik kültürlerinde de üreme olmamıştır. Bruselloz ön tanısı olması nedeniyle ekim besiyerlerinin inkübasyonları uzatılmış ve inkübasyonun sekizinci gününde *Brucella* cinsi bakteri üremiştir. Geç üreyebilmesi nedeniyle bruselloz ön tanılı hastalarda hem kan kültür şişelerinin inkübasyonunun, hem de besiyerlerinin inkübasyonunun uzatılması gereklidir.

Negatif 608 kan kültürünün 606'sında boyamada mikroorganizma görülmemiş ve bunların kültürlerinde üreme olmamıştır, 2 kültürde Gram negatif bakteri görülmüş ve her ikisinde de *Pseudomonas aeruginosa* üremiştir (Yalancı negatiflik oranı % 0.3). Yapılan çalışmalarda yalancı negatiflik oranı % 0.3-6 arasında değişmektedir (7,9,12). Her laboratuvar hasta popülasyonu ve izole edilen mikroorganizmaları göz önünde bulundurarak yalancı negatifliği değerlendirmeli ve subkültürlerin yapılıp yapılmamasına karar vermelidir.

Toplam 527 kan kültürünün incelendiği bir araştırmada mikroorganizmaların saptanma oranı metilen mavisi boyama yöntemi ile % 99, acridin oranj boyama ile % 94 ve Gram boyama ile % 93 bulunmuştur. Bu çalışmada floresan mikroskop gerektirmediği ve laboratuvarlarda kolaylıkla yapılabilmesi için kan kültürlerinde mikroorganizmaların varlığını doğrulamada metilen mavisi boyama yöntemi önerilmekte ve mikroorganizma görüldüğünde Gram boyama yapılması önerilmektedir (13). Çalışmamızda her iki boyama yöntemi birlikte yapılmış ve ikisi birlikte değerlendirilmiş olup mikroorganizma saptama ora-

nı % 98 olarak bulunmuştur. BacT/Alert standart şişelerde her iki boyama yöntemi ile değerlendirme sorunu yaşanmamıştır. BacT/Alert FAN şişelerden yapılan mikroskopilerde ise besiyerindeki kömür tozu partikülleri nedeniyle Gram boyamanın değerlendirilmesinde güçlük yaşanırken, metilen mavisi ile yapılan boyamada bu sorun olmamıştır. Bu nedenle her iki boyama yönteminin birlikte değerlendirilmesinin uygun olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda da kömür tozu partikülleri içeren FAN besiyerlerinden yapılan Gram boyama sonucu, kömür tozu partikülleriyle benzer büyüklükteki bakteri ve maya hücrelerini değerlendirmenin güçlüğünden ve zaman alıcılığından bahsedilmektedir (7,9).

Sonuç olarak klinisyene tedaviyi planlamada yardımcı olmak için tüm pozitif kan kültürlerinde hem Gram boyama hem de metilen mavisi boyama yöntemi ile mikroskopik inceleme yapılmalı, yine negatif örneklerde de subkültür yapılmayacaksa mikroskopik inceleme yapılarak sonuç rapor edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. **Washington JA:** Blood cultures: An overview, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 8: 803 (1989).
2. **Cunney RJ, McNamara EB, Alansari N, Loo B, Smyth EG:** The impact of blood culture reporting and clinical liaison on the empiric treatment of bacteraemia, J Clin Pathol 50: 1010 (1997).
3. **Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP:** Update on detection of bacteremia and fungemia, Clin Microbiol Rev 10: 444 (1997).
4. **Hindler JA, Dunne WM, Nolte FS, Wilson ML:** Blood cultures III, Cumitech series, American Society for Microbiology, Cumitech 1B, Washington DC. 1997.
5. **Smith JA, Bryce EA, Nguyen JH, Roberts FJ:** Comparison of BACTEC 9240 and BacT/Alert blood culture systems in an adult hospital, J Clin Microbiol 23:1905 (1995).
6. **Murray PR, Hollick GE, Jerris RC, Wilson ML:** Multicenter comparison of BACTEC 9050 and BACTEC 9240 blood culture systems, J Clin Microbiol 36:1601 (1998).
7. **Ziegler R, Johnscher I, Martus P, Lenhardt D, Just HM:** Controlled clinical laboratory comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture systems to detect bloodstream infections, J Clin Microbiol 36:657 (1998).
8. **Pohlman JK, Kirkley BA, Easley KA, Basille BA, Washington JA:** Controlled clinical evaluation of BACTEC Plus Aerobic/F and BacT/Alert Aerobic FAN bottles for detection of bloodstream infections, J Clin Microbiol 33: 2856 (1995).

9.Jorgensen JH, Mirrett S, McDonald LC, Murray PR, Weinstein MP, Fune J, Trippy CW, Masterson M, Relier B: Controlled clinical laboratory comparison of BACTEC Plus Aerobic/F resin medium with BacT/Alert Aerobic FAN medium for detection of bacteremia and fungemia, J Clin Microbiol 35:53 (1997).

10.Saniç A, Günaydın M, Özdemir Ş, Altıntop L, İşlek İ: Kan kültürlerinde hızlı tanı sisteminin etkinliğinin araştırılması, Klimik Derg 8:135 (1995).

11.Özyurt M, Albay A, Yıldırım ŞT, Başustaoglu A,

Gün H: BacT/Alert otomatize kan kültür sistemi ile iki yıllık dönemde alınan sonuçlar: Retrospektif bir çalışma, İnfek Derg. 12: 323 (1998).

12.Shigei JT, Shimabukuro, Pezzlo MT, De La Maza LM, Peterson EM: Value of terminal subcultures for blood cultures monitored by BACTEC 9240, J Clin Microbiol 33:1385 (1995).

13.Scolea LJ, Baldigo SM: The detection of positive blood cultures in children using the acridine orange, gram, and methylene blue stains, Can J Microbiol 29: 729 (1983).

ÜYELERİMİZİN
DİKKATİNE
LÜTFEN E. POSTA
ADRESLERİNİZİ
BİZE BİLDİRİNİZ.

Dr. Oya BALKANLI
e.posta: obalkan@istanbul.edu.tr