

İNFEKSİYON HASTALIKLARINDA LABORATUVAR TANI

Recep ÖZTÜRK*

İnfeksiyon hastalıkları insanlığı en sık etkileyen hastalıklardan olup, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde morbidite ve mortalitenin ana nedenlerindedir. Yüzyıllar boyunca tarihin gelişiminde, şekillenmesinde rolleri olmuştur (veba, kolera salgınları) ve son yıllarda etkenler değişse de önemli konumları halen devam etmektedir. Tüm dünyada yaygın olması, yeni değişik etkenler bulunması ve etkenleri bilinmeyen bazı hastalıkların mikrobik etkenli olduklarının saptanması nedeniyle infeksiyon hastalıkları halk sağlığı açısından güncel önemini devam ettirmektedir. Bu arada moleküler biyolojide gelişmeler nedeniyle infeksiyonların kanser, diğer kronik hastalıklarla ilişkileri daha da fazla anlaşılmaya başlanmıştır. Ayrıca yeni etkenler de moleküler biyolojinin katkılarıyla (TTV, HCV,...) tanımlanmışlardır.

Tıbbın hemen her klinik dalını ilgilendiren infeksiyon hastalıklarının tanımı için iyi bir klinik değerlendirme yanında laboratuvar tanısı gereklidir. İnfeksiyon hastalıklarının tanımında laboratuvar incelemeler çok önemli bir yer tutar. İnfeksiyon hastalıklarının sadece tanımı değil, giderek artan direnç (metisiline hatta vankomisine dirençli stafilokoklar, vankomisine dirençli enterokoklar, çok ilaca dirençli gram negatif çomaklar, çok ilaca dirençli Mycobacterium tuberculosis, antiviral ajanlara direnç kazanan virüsler) nedeniyle tedavide kullanılacak antimikrobiklerin direnç testleri yardımıyla seçimi, infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojik araştırılması noktasında da laboratuvar araştırmaları büyük işlev görür. Örneğin bir salgını tanımlamanın en önemli boyutu yapılacak uygun mikrobiyolojik incelemelere dayanır.

Ayrıca klinik belirti oluşturan veya belirti vermeden geçirilen bazı infeksiyon hastalıkları hastada taşıyıcılık (portörlük) oluşturabilir; taşıyıcılar hiç bir klinik belirti oluşturmada başkalarına etkenin bulaşmasına kaynaklık edebilir; portörler ancak laboratuvar metotlarıyla saptanabilir.

İnfeksiyon hastalıkları tanısında kullanılan laboratuvar incelemeler, 1)özgül olmayan yardımcı testler: mikrobiyoloji dışındaki araştırmalar, 2)etkeni doğrudan veya dolaylı olarak belirleyen klinik mikrobiyolojik incelemelerdir (tablo 1).

Tablo1. İnfeksiyon Hastalıklarında Laboratuvar Tanısı

1-Mikrobiyoloji dışı laboratuvar araştırmaları

- Hematolojik incelemeler
- Biokimya incelemeleri (AST, ALT, CRP, Prokalsitonin)
- Radyolojik incelemeler(düz grafiler, USG, BT, MR)
- Nükleer tıp incelemeleri(galyum ve teknesyum sintigrafisi, işaretli lökosit sintigrafisi)
- Histopatolojik incelemeler

2-Mikrobiyolojik incelemeler

- Mikroskopik incelemeler(Işık mikroskopu, karanlık alan mikroskopu, fluoresans mikroskopu , elektron mikroskopu)
 - Yaş preparatlar (dışkıda parazit, deri kazıntısında mantar)
 - Boyalı preparat (Gram, EZN, Giemsa, Trikróm boyama)
- Mikroorganizmaların üretilmesi(kültür), tanınması(cins ve tür tayini) ve duyarlılık durumlarının belirlenmesi
- İmmunolojik incelemeler:antikör arama, antijen arama, deri testleri
- Moleküler metotlar: Özgül DNA veya RNA dizelerinin saptanması (nükleik asit problemleri, polimeraz zincir reaksiyonu(PZR), gerçek zamanlı PZR, ligaz zincir reaksiyonu, dallanmış problemler, Q-beta replikaz yöntemi)

1-Mikrobiyoloji dışındaki klinik laboratuvar incelemeleri: İnfeksiyon hastalıkları değişik sistemler üzerine etkiyle bazı değişikliklere yol açar. Bunları değerlendirip tanıyla ilgili bazı dolaylı bilgiler edinilir. Bu testler etkeni belirlemek açısından özgül testler değildir; tanıda yardımcı olurlar.

1.1)Hematolojik incelemeler

- Lökosit sayımı ve formülü:

Lökositoz (bakteri infeksiyonlarının çoğu- bazı bakteri infeksiyonlarında lökositoz olmaksızın nötrofili görülebilir: Leptospira ve Rickettsia infeksiyonları-, bazı virüs infeksiyonları, infeksiyon dışı değişik nedenler),

lökopeni (tifo, bruselloz gibi bazı bakteri infeksiyonları, virüs infeksiyonlarının çoğu) lenfositoz (infeksiyöz mononükleoz, cytomegalovirus infeksiyonu, virüs hepatitleri, kızamık, su çiçeği, kabakulak, adenovirus infeksiyonları ve di-

* İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

ğer virüs infeksiyonları, boğmaca, bruselloz, tüberküloz, sifiliz, toksoplazmoz),

lenfopeni (ciddi pnömokok veya Klebsiella pnömonisi gibi ağır seyirli bakteri infeksiyonları; ciddi endotoksemi; miliyer tüberküloz; lenfositik koriomenenjit, Colorado kene ateşi, deng gibi bazı virus infeksiyonları; yaygın histoplazmoz, yaygın kalaazar),

Lenfo-monositöz (tüberküloz, diğer granulatöz infeksiyonlar, subakut bakteri endokarditi ve sifiliz, cytomegalovirus ve varicella zoster virus infeksiyonları), Toksoplazma, viral hepatit, EBV

eoziyofili (trişinoz, kist hidatik, viseral larva migrans, askariyaz, toksokariyaz, strongyloidaz; bazı kronik infeksiyonlarda ve akut bakteri infeksiyonlarının iyileşme devrinde; Chlamydia pnömonileri, kızılın geç devresi, toksik şok sendromu (%50), bronkopulmoner aspergilloz) saptanması,

-Anemi: Kanama veya yıkım sonucu akut anemi gelişebilir. Clostridium perfringens sepsisi, malaria, babesioz, bartonelloz, Mycoplasma pneumoniae pnömonisi, infeksiyöz mononukleoz ve sifilizde hemoliz etkisiyle; Parvovirus B19 infeksiyonunda eritrosit öncü hücrelerinin tutulması sonucunda anemi gelişir. Kronik infeksiyonlarda kronik hastalık anemisi gelişir; burada retiküloendotelial sistemde demir depoları normal veya artmış, plazma demiri ve total demir bağlama kapasitesi azalmıştır.

-Yaygın damar içi pıhtılaşma (DİK-dissemine intravasküler koagülasyon): Ciddi infeksiyonların seyrinde (özellikle gram negatif bakterilerin etken olduğu sepsisler, meningokoksemi, kayalık dağlar lekeli ateşi) gelişen bir tablodur. Asplenik hastalarda DİK daha sık gelişir. DİK tablosunda trombositopeni, artmış fibrin yıkım ürünleri, azalmış fibrinojen ve protrombin zamanı saptanır. Hastada kanama ve trombozlar gelişebilir.

-Trombositopeni: Sepsise izole trombositopeni de eşlik edebilir. Rubella trombositopeni gelişen diğer bir infeksiyondur.

-Trombositöz: Akut infeksiyonların iyileşme dönemi, tüberküloz, bazı kronik infeksiyonlar, özellikle yavaş iyileşen pnömonilerde görülür.

1.2) Akut faz reaktanları

İnfeksiyonların seyrinde oluşan sistemik immun yanıtın bir basamağı sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF) oluşumudur. Sitokinlerin bir kısmının uyarısıyla karaciğerde akut faz reaktanları (miktarları artanlar: C-reaktif protein: CRP, serum amyloid-A, alfa1 antitripsin, haptoglobulin, ferritin, fibrinojen, komplement 3 ve 4; miktarı azalanlar: albumin, prealbumin, transferrin) denen bazı protein maddeler sentezlenir; bu maddelere akut faz reaktanları denir.

Günümüzde sitokin araştırmaları ile erken tanı (IL-6, IL-8 ile lökosit yanıtını erken saptamak gibi) gündeme gelse bile değişik akut faz reaktanlarından günlük pratikte en sık CRP ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) kullanılır.

CRP: Karaciğerde sentez edilen globulin yapısındaki bu akut faz reaktanı inflamasyon ve doku yıkımı halinde kısa

sürede artıp, durum düzelince hızla azalır. Pratikte en sık kullanılan akut faz reaktanıdır. Kalitatif ölçümler(-, +, ++, +++) klinisyenin işine yaramaz, kantitatif sonuçlar değerlidir. CRP, inflamasyon başlamasından dört-altı saat sonra yükselmeye başlar, 36-50 saatte zirve yapar, yarılanma ömrü 19 saattir. CRP, yüksekse irdelenecek bir sorun var demektir. CRP, genel olarak invazif bakteriyel infeksiyonlarda normale göre 15-40 kat artabilmektedir; viral infeksiyonlarda genel olarak 3-5 kat artar, ama grip, CMV gibi viral infeksiyonlarda, miyokardit gibi doku tutulumlarında da 10 kattan fazla artış olabilmektedir. İnfeksiyon hastalıkları dışında sistemik vaskülitlerde 10-20 kat, malignitelere 5-10 kat (bazı lenfomalarda daha fazla) artmaktadır. CRP normal, ESH yüksek bir durumda SLE'den şüphelenilir.

Genelde çok yüksek CRP değerlerinde aşağıdaki hastalıklar akla gelir: invazif bakteri infeksiyonları, akut romatizmal ateş, romatoid artrit, juvenil romatoid artrit (Still hastalığı), rejijonal ileit, ailevi Akdeniz ateşi, reaktif artritler, vaskülitler, bazı lenfomalar, sekonder amiloidoz ve miyokard infarktüsü.

ESH: Duyarlı bir test olup özgül değildir. Erişkinde 20 mm/saat üzeri patolojiktir. Yaşlılarda, kadınlarda, şişmanlarda 10 mm daha yüksektir. ESH, >100 mm/saat halinde infeksiyon (miliyer tüberküloz, subakut bakteri endokarditi, karın içi abse, osteomyelit), kollajenozlar/artrit(erişkin Still hastalığı, dev hücreli arterit), malignitelere(karsinom, lenfoma, multipl myeloma) olasılığı vardır.

1.3)Diğer Testler

Prokalsitonin: Son yıllarda kullanım alanı bulan testlerden biridir. Kalsitoninin ön maddesi olan prokalsitonin sistemik bakteri infeksiyonlarında anlamlı miktarda artmaktadır. Normalde 0.01 ng/ml düzeyinde olan prokalsitonin viral infeksiyonlarda veya inflamatuvar hastalıklarda 0.5-1 ng/ml, sistemik bakteri infeksiyonlarında 20-200 ng/ml değerlerine ulaşmaktadır. Prokalsitonin, özellikle yoğun bakım birimlerinde sepsis tanısında ve prognoz tayininde yardımcı bir test olarak kullanılabilir.

Rutin biokimya incelemeleri: İnfeksiyon hastalıklarında etkilenen veya fonksiyonu bozulan organları belirlemek, hasta takibini sağlamak, prognoz hakkında fikir edinmek amacıyla değişik serum, plazma, BOS, pevra sıvısı, asit, eklem sıvısı gibi örneklerde biokimya incelemelerine başvurulur: AST, ALT, alkalen fosfataz, Á-GT, protrombin zamanı, bilirubinler, üre, kreatinin, LDH (serum ve BOS'ta), CPK(leptospiroz, diğer kas hasarlarında), glukoz (sepsise hipoglisemi eşlik edebilir; diabetik bir hastada hiperglisemi gelişmesi ve kan glukozunun ayarlanmasının zorlaşması infeksiyonun ilk bulgusu olabilir), kan gazları gibi testler yapılır.

Tam idrar incelenmesi: Proteinüri, bilirubinüri, urobilinogenüri, piyüri(çevrilmemiş idrarın mm³de 8-10 lökosit varlığı), hematüri, sedimentte değişik silendirlerin varlığı araştırılıp tanı hakkında fikir edinilir.

1.4) Biopsi-histopatoloji

Gerek primer tanımda gerekse hepatitler gibi hastalığın evresini değerlendirmede baş vurulan değerli bir yöntemdir. Lenf bezi, karaciğer, deri, kemik infeksiyonlar açısından sık biopsi yapılan yerlerdir. Febril nötropenide bir deri döküntüsünden yapılan "punch" biopsi tanıma ciddi katkı sağlar; örneğin febril nötropenik bir hastada bir mikotik infeksiyonun erken tanımını mümkün kılar. Alınan biopsilerde mikrobiyolojik incelemeler ihmal edilmemeli; kuşku halinde kesitlerde Gram, EZN, mantar boyaları (metenamin gümüş boyama), kültürler yapılmalıdır. Kültüre gönderilecek örneğin formalin içine alınmaması özel transport besiyeri ya da serum fizyolojik içinde laboratuvara ulaştırılması önerilir. Gereğinde immunhistokimya ve in situ hibridizasyonla etken gösterilebilir.

1.5) Görüntüleme teknikleri

Düz grafiler, USG, BT, MR gibi incelemeler infeksiyon hastalıklarının tanısında ciddi katkılar sağlar. Özellikle MR gibi incelemeler klinik değerlendirmenin önüne geçmemelidir.

1.6) Nükleer tıp araştırma metotları

Değişik nükleer tıp incelemeleri, özellikle işaretli lökositlerle yapılan sintigrafiler, diğer infeksiyonların, özellikle nedeni belli olmayan ateş olgularında infeksiyon yerini saptamada değerlidir.

2-Mikrobiyolojik araştırmalar

İnfeksiyon hastalıklarının etkenini açığa çıkarmak, tedaviyi düzenleyip izlemek (direnç durumu, mikrop yükü) ve taşıyıcılık varlığını belirlemek amacıyla mikrobiyolojik incelemeler yapılır. Mikrobiyolojik araştırmalar doğrudan etken hakkında bilgi verir ve kesin tanıya ulaştırır. Mikrobiyolojik tanı spektrumu teknolojinin yardımıyla giderek daha hızlı, otomatize, duyarlı ve özgül sonuçlar veren metotların geliştirilmesiyle zenginleşmiştir.

İnfeksiyon hastalıklarında laboratuvar tanısı konağın doku, vücut sıvı ve çıkartılarında, bakteri, mantar, virus veya parazit etkenlerini ya doğrudan yada dolaylı yolla göstermeğe dayanır.

Tablo 1'de görüldüğü gibi mikroskopik incelemeler (yaş preparat, boyalı preparat), kültür (üretim, ayırım), direnç araştırmaları (antibiogram, moleküler teknikler), immunolojik testler (antijen veya antikor aramak), moleküler çalışmalar (tanım, epidemiyolojik analiz, direnç araştırması) günümüzde uygulanan klinik mikrobiyolojik araştırmalardır.

Klinisyen; laboratuvarı kullanırken ve sonuçları yorumlarken istediği tanı testlerinin gücünü bilmelidir. Bu amaçla testin duyarlılığı, özgüllüğü, tahmin gücü bilinip istek ve yorumda bu özellikler dikkate alınmalıdır:

Duyarlılık: Hastalığı olduğu bilinen kişilere (gerçek pozitif) uygulanan testin pozitif sonuç verme oranı (100 hastadan 92 kişide pozitif sonuç alınan testin duyarlılığı %92'dir (yalancı negatiflik %8).

Testin analitik duyarlılığı ise aranan maddenin ne kadarının miktarının saptanabildiğinin ölçüsüdür (ng/ml, viral yük/ml).

Özgüllük: Hastalığı olmayan kişilere (gerçek negatif) uygulanan testin negatif sonuç verme oranı (sağlıklı 100 kişide 11 "yalancı" pozitif sonuç alınan testin özgüllüğü %89'dur). Pratikte kullanılan hiç bir test %100 duyarlı ve özgül olmadığından yani yalancı pozitiflik ve negatiflik sorunları olduğundan test sonuçları bazı durumlarda doğrulayıcı testlerle denetlenmelidir.

Bir testin sonucu yorumlanırken, bir diğer önemli bilgi o hastalığın toplumda ne kadar yaygın olduğudur. O yüzden epidemiyolojik veriler aynı zamanda testlerin yorumunun doğru bir şekilde yapılmasını da sağlamaktadır. İnfeksiyon hastalıkları tanısında kullanılan klinik mikrobiyolojik metotlar ve klinik mikrobiyolojik örneklerin incelenmesi konusundaki temel bilgiler aşağıda özetlenmektedir.

2.1-Mikroskopik incelemeler

Işık mikroskopu, karanlık alan mikroskopu, faz kontrast mikroskopu, floresans mikroskopu, elektron mikroskopu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan mikroskop çeşitleridir. Genelde rutin incelemeler ışık mikroskopuyla yapılır.

İlk olarak 1683 yılında Antony Van Leeuwenhoek tarafından mikroskop kullanılmıştır. Bu uygulama mikrobiyolojinin temel taşlarından biri kabul edilmektedir. İnsan çıplak gözle ancak 0.1 - 0.2 mm (100-200 mikron : μ) büyüklüğü ayırabilmektedir. Mikroskopta yanyana duran iki noktayı ayırabilme yeteneğine rezolüsyon sınırı denilmektedir. Bir mikroskopun rezolüsyon (ayırma yeteneği) sınırı kullanılan ışığın dalga uzunluğuna, merceğin açıklık sayısına (merceğin yarıçapı/ odak boyu) bağlıdır. Işık mikroskoplarında ayırma yeteneği 200 nm dolaylarındadır (0.2 mikron).

Mikroskopun büyütme gücü objektif ve oküler büyütme miktarlarının çarpımı ile belirlenir. Örneğin 100 büyütmeli bir objektifle bakılıyor ve okülerin büyütme gücü 15 ise o mikroorganizma 100x15: 1500 kez büyütülmüş demektir. Mikroskop alanında bulunan mikroorganizmaların boyutları oküler ve objektiflere yerleştirilen özel aletlerle (mikrometreler) ile ölçülebilirler.

Karanlık alan incelemesi özellikle sifiliz düşünülen lezyonlardan alınan örnekte Treponema pallidum, kanda Borrelia ve Leptospira, idrarda Leptospira aranması için uygundur.

Füloresans mikroskobu, değişik mikroorganizma antijenlerini hızlı ve duyarlı bir şekilde belirlemede ve değişik mikroorganizmalara karşı oluşan özgül antikorları araştırmak amacıyla kullanılır.

Elektron mikroskobu(transmisyon EM, scanning EM), ancak araştırma laboratuvarlarında veya büyük merkezlerde kullanım için uygundur. Özellikle ishal etkeni virüslerin (rotavirus, calicivirusler) tanınmasında ciddi katkı sağlar.

Işık mikroskobu incelemeleri

Klinik örnekler veya besiyerinde üreyen mikroorganizmalar doğrudan yaş preparat olarak veya değişik boyalarla boyandıktan sonra incelenirse mikroorganizmalar kısa sürede görülüp tanınabilir. Bakteriler, mantarlar, parazitler(erişkin şekil, larva, yumurta, trofozoit, kist) , virus inküzyon cisimcikleri ışık mikroskopuyla tanımlanabilir.

Yaş/natif preparat

Mikroskopik değerlendirme için en basit yol yaş preparat incelemesidir. Alınan klinik örnek doğrudan veya bir sıvıda süspansiyon haline getirilip lam-lamel arasında mikroskopta incelenir. Serum fizyolojik, lugol, metilen mavisi, %10-30 KOH, laktofenol pamuk mavisi, çini mürekkebi yaş preparat hazırlanmasında sık kullanılan maddelerdir. Yaş preparat şu incelemeler için uygundur: dışkıda helmint yumurtası, protozoon kist ve trofozoti; beyin omurilik sıvısında Cryptococcus neoformans varlığı(çini mürekkebiyle siyah zeminde büyük kapsüllü mayalar); vaginal/uretral akıntıda veya idrar sedimentinde Trichomonas, Candida ; idrarda Schistosoma yumurtaları; deri kazıntısı ve saç örneğinde %10-30 KOH'de mantar elemanları; üremiş mantar kültüründen alınan örneklerin laktofenol pamuk mavisi boyanmasıyla morfolojik identifikasyon. Amipli dizanteri tanısında erken (sıcak) dışkı incelemeleri özellikle önemlidir. Eritrosit fagosite etmiş trofozoitlerin görülmesi anlamlı bir bulgu olarak kabul edilmektedir.

Ayrıca yaş preparat olarak sayım kameralarında(Fusch-Rosenthal, Thoma lamı vb) değişik vücut sıvılarında (BOS, plevra sıvısı, asit sıvısı) inflamasyon hücrelerinin varlığı ve sayısı saptanır.

Boyalı İnceleme

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında değişik boyamalar uygulama alanı bulmasına rağmen en sık Gram boyası, Erlich-Ziehl-Neelsen(EZN) veya Kinyoun'un aside dirençli bakteri boyaması, metilen mavisi, Giemsa, trikrom boyama (parazit incelenmesi), floresans boyama kullanılır.

Gram boyama

Klinik mikrobiyolojinin en yararlı yöntemlerinden biri olup 100 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Kalın bir peptidoglikan hücre duvarı olan bakteriler, hücre dış membranı ve ince peptidoglikan hücre duvarı olan bakterilere göre

Gram yöntemiyle farklı boyanır. Kalın peptidoglikanlı bakteriler aldıkları ilk boyayı(kristal mor/jansiyan moru) alkol veya diğer renk gidericilerle(alkol/aseton) geri vermezler ve boya giderme işleminden sonrada mor renkte görülürler(Gram pozitifler). Hücre dış membranı ve ince peptidoglikanı olanlar aldıkları ilk boyayı renk giderme aşamasında verirler ve ikinci adım boyanın renginde(pembe) görülürler:Gram negatifler. Bazı bakteriler (mikoplazmalar, riketsiya, klamidyalara, mikobakteriler,...) Gram yöntemiyle boyanmazlar.

Gram boyama, incelenen klinik örnekte(balgam, cerahat, BOS, plevra sıvısı, eklem sıvısı) bakteri, maya gibi mikroorganizmaların ve inflamatuvar hücrelerin varlığının saptanmasını sağlar. Mikroorganizmaların varlığı yanında idrar gibi klinik örneklerde olası bakteri sayısı hakkında da fikir edinilir (her immersiye alanında bir veya daha fazla bakteri bulunması ml'de 10^5 veya daha fazla bakteriye işaret eder). Bir klinik örnekte 10^4 /ml veya daha fazla bakteri varsa Gram ile pozitif sonuç alınır. Örnek, boyamadan önce santrifüjlenirse bakteriler sedimentte yoğunlaşacağından daha az sayıdaki bakteriyi görmek mümkün olur.

Hemen her klinik örnek Gram boyama ile incelenebilir. Fiyat etkinlik çalışmaları dikkate alındığında bazı örneklerde rutinde Gram boyama önerilmez; örneğin boğaz sürüntülerinde rutinde Gram boya yapılması önerilmemektedir; ama Vincent anjini kuşkusunda sadece Gram incelemeyle fuzospiroketlerin görülmesinin tanıdaki katkısı gereğinde hatırlanmalıdır. Balgam, cerahat, BOS, genital kanal sürüntüsü, idrardan rutin ; dışkı, boğaz sürüntüsünde gereğinde Gram yapılır.

Gram boyalı preparat incelenirken ilgili materyelin uygun şekilde alınıp alınmadığına karar verilebilir. Örneğin balgamda küçük büyütmede(x10) her alanda 25 veya daha fazla polimorf nüveli lökosit ve 10^4 'dan az skuamoz epitel hücresi olması klinik olarak yararlı bilgi sağlar; yani örnek uygun şekilde alınmıştır kararına varılır. Balgamda küçük büyütme 10^4 'dan fazla epitel hücresi ve değişik morfolojili bakterilerin varlığı ağız florasıyla kontaminasyona işaret eder.

Bazı bakterilerin olası tanısı Gram incelemeyle belirlenebilir; örneğin balgamda kapsüllü lanset şeklinde gram pozitif diploklar pnömokokları, bir yara örneğinde kapsüllü gram pozitif çomaklar Bacillus anthracis'i, BOS'da hücre içi ve dışında gram negatif koklar meningokok ön tanısını koydurur. Uretral akıntıda hücre içi ve dışında gram negatif kokların varlığı erkek hastada gonokok olasılığını yüksek oranda belirler. Kronik obstruktif bir akciğer hastasının balgamında soluk boyanan gram negatif kokobasiller Haemophilus influenzae'yi düşündürürken, gram labil boyanan koklar aynı grup hastada Moraxella catarrhalis varlığını düşündürür.

Gram boyama özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda balgam, endotrakeal aspirat ve diğer solunum yolu örneklerinde baskın bakteri hakkında fikir vererek empirik tedaviyi yönlendirmede katkıda bulunur.

Gram boyama antibiyotik kullanımı sonucu kültürde üremenin engellendiği durumlar da klinik örnekte görülen bakteri sayesinde tanıya destek sağlar.

Gram boyama ile klinik örneklerde mayalar ve inflamatuvar hücreler de görülür.

Aside dirençli mikroorganizmaların boyanması

Karbolfüksinle boyanan bazı mikroorganizmalar, asit ve/veya asit+alkolle muamele sonrasında duvar yapısının özelliklerinden dolayı aldıkları boyayı vermediklerinden metilen mavisıyla ters boyama işleminden sonra mavi zeminde kırmızı görüntü verirler ve aside dirençli olarak vasıflandırılırlar. Sık kullanılan boyama EZN metodudur; bunun Kinyoun modifikasyonu veya renk gidermenin zayıf asitlerle(%1 sulfuruik asid) yapıldığı modifiye EZN vardır. Mikroskopla aside dirençli basillerin EZN ile görülmesi için 1 ml'de en az 5000 basil bulunmalıdır.

Aside dirençli boyama balgam, mide yıkantı suyu, abse, BOS, plevra sıvısı, dışkı , doku ve diğer şüpheli örneklerde kullanılabilir. Mycobacterium, Nocardia, Legionella micdadei, Rhodococcus equi gibi bakteriler ve Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora gibi ishal etkeni protozoonlar aside dirençlidir. Bu özelliklerini açığa çıkarmak üzere EZN, modifiye EZN veya Kinyoun boyama yapılı ve preparat ışık mikroskobunda incelenir. Bu boyamada mikobakteriler mavi zemin üzerinde kırmızıya boyanan çomakçıklar olarak görülür Bu amaçla fluoresans mikroskopta incelenmek üzere auramin-rodamin boyama da yapılabilir. Auramin-rodamin boyalı preparat fluoresans mikroskobunda incelenirse aside dirençli basiller elma yeşili fluoresans verir olarak görülürler; bu metot daha hızlı ve duyarlıdır.

Nocardia (renk gidermede %3 hidrolorik asit-alkol yerine %1 sulfurik asitli su kullanılır) ve protozoonların aside dirençliliğini belirlemek için EZN boyamada bazı değişiklikler yapılır(modifiye EZN).

Metilen mavis boyaması

Özellikle hücre içi bakterilerin (Neisseria) daha iyi görülmesine, dolayısıyla gonokoksik uretritte kısa sürede tanı konmasına imkan sağlar. Corynebacterium diphtheriae enfeksiyonu kuşkusuna varsa metakromatik granülleri iyi gösterdiğinden tercih edilir. Dışkı, BOS vb örnekler metilen mavisıyla boyanırsa lökositler kolayca tanınır.

Giemsa

Lökosit formülü, kan parazitleri (Plasmodium, Babesia, Leishmania), viral inklüzyon cisimciklerinin(Herpes simplex, varicella zoster veziküler deri lezyonları tabanından yapılan sürüntü: Tzanck yayma), doku değdirme(imprint)

yöntemiyle hazırlanan preparatlarda mayalar, Toxoplasma gondii, Pneumocystis carini/jiroveci, Histoplasma capsulatum ve bakterilerin boyanmasında kullanılabilir. Gümüş boyaları (Gomori methenamine gümüş, Warthin-Starry, Dieterle) Treponema pallidum, mantarlar, P.carinii/jiroveci, Legionella spp, riketsiyalar ve Rochalimae henselae boyanmasında tercih edilir.

Fluorokrom Boyalar

Akridin oranj, vücut sıvılarındaki bakteri, maya, Trichomonas ve lökositleri boyamak amacıyla kullanılır; fluorensans mikroskopta daha küçük büyütmeyle inceleme olanakları olduğu için Gram boyadan daha duyarlıdır.

Auramin-rodamin boyaması ile mikobakteriler elma yeşili boyanır ve tüberküloz laboratuvarında EZN boyasına göre daha duyarlı ve hızlı sonuç alınır.

Kalkoflor beyazı, deri kazıntısı ve saç örneklerinde mantar elemanlarını fluoresans mikroskopta göstermek amacıyla kullanılır.

Ayrıca monoklonal veya poliklonal özgül antikorlar veya özgül antijenler fluoresans veren maddelerle (fluoresceine isothiocyanate) boyanıp klinik örneklerden özgül antijen yada özgül antikor aranabilir. İşaretli antiglobulinler yardımıyla özgül antikorların fluoresans mikroskopta araştırılması mümkündür (aşığıya bkz)

Diğer boyalar

Bu boyalar dışında parazitleri incelemek üzere trikrom boyama, demir-hematoksilen boyası; toluidin mavis ve methenamine gümüş boyası (P.carinii) ve mantarlar için PAS vb boyalar vardır.

2.2) Kültür yöntemiyle mikroorganizmaların saptanması

Bakteri, mantar, virus ve parazitler besiyeri veya hücre kültürü gibi ortamlarda üretilerek çoğaltılabilirler. Günümüzde kültürde üretim genellikle bakteri ve mantar enfeksiyonlarının tanısında kullanılmaktadır. Bakterilerden hücre içi üreme gösteren Chlamydia ve Rickettsia; virus ve parazit kültürü genellikle gelişmiş veya referans laboratuvarlarda yapılabilmektedir.

Bakteriler, laboratuvarlarda değişik maddelerden oluşan cansız besiyerlerinde üretilmektedir. Treponema pallidum, Mycobacterium leprae, Spirillum minus gibi henüz rutinde besiyerlerinde üretilmeyen bakteriler gibi istisnalar vardır. Chlamydia, Rickettsia gibi bakteriler ve virusler ise ancak canlı ortamlarda yani hücre kültürlerinde üretilmektedir. Mikroorganizmanın üretiminde önemli basamaklar, doğru yerden, doğru zamanda, doğru bir şekilde klinik örneğin alınarak, uygun koşullarda laboratuvara

nakledilerek standart yöntemlerle işlenip besiyeri ortamlarına ekimine ve uygun şekilde inkübe edilmesine bağlıdır (aşağıya bakınız).

Patojen Bakterilerin İzolasyonu

Klinik örneklerden şüpheli patojen(ler)in izolasyonu bakterilerin in vitro üremesine imkan veren besiyerleriyle sağlanır. Besiyerleri sıvı veya katı şekildedir. Besiyerlerinin katılığı bakteriler tarafından metabolize edilemeyen agar ile sağlanmaktadır. İlgili mikroorganizma(lar)ın üremesine imkan veren değişik temel besiyerleri (et suyu, kalp/beyin infüzyonu, maya ekstresi gibi temel vasatlar) üreme ortamlarının ana yapısını oluşturur ve üremeyi artırıcı özellikte zenginleştirici maddeler (kan, serum, asit, hemin, K vitamini) eklenerek üretici güçleri artırılır. Koyun kanlı agar, çukulatamsı agar bu nitelikteki genel üretim besiyerleridir. Flora içeren örneklerde (boğaz, balgam, genital örnekler, dışkı) sadece patojen(ler)in üremesini sağlamak için flora bakterilerini baskılayıp, patojenlerin üremesine engel olmayan maddeler (antibiyotikler, bazı boyalar ve inhibitör maddeler) katılarak seçici besiyerleri hazırlanır (dışkı ekiminde GN, SS besiyeri; genital örneklerde Neisseria gonorrhoeae üremesine imkan veren Thayer-Martin besiyeri).

Klinik örnekte mikroorganizma azsa sıvı besiyerlerine (buyyon) ekilmelidir. Genel olarak periton sıvısı, plevra sıvısı, eklem sıvısı, BOS sıvı besiyerine ve zenginleştirilmiş genel üretim besiyerlerine ekilmelidir.

Abse örnekleri, ampiyem örneği, sinus aspiratı, transtraheal aspirat, suprapubik idrar, derin yara aspiratları, doku biopsileri anaerop bakteri içerebilir; örnek alımı, nakledilme (anaerop taşıma ortamına alınıp gönderilir) ve laboratuvar ekimlerinde bu özellik dikkate alınmalıdır.

Günümüzde geliştirilmiş otomatize hemokültür sistemleri yardımıyla kandan bakteri üretilme oranı artmış ve üreme süresi kısalmıştır. Örneğin daha önce 20-30 günde üretilen Brucella cinsi bakteriler, yeni hemokültür sistemlerinde 3-7 günde üretilmektedir. Bu hemokültür sistemleri BOS, periton sıvısı, plevra sıvısı, eklem sıvısı vb örneklerin kültürü için de uygundur.

Klasik sistemlerle 20-30 günde üretimleri sağlanabilen mikobakteriler, radyoizotop ve fluoresans temelli sıvı besiyerlerinde ortalama 12 günlük bir sürede üretilmektedir.

İdentifikasyon

Bakteri üretilip saf halde elde edilince, tanımı için en sık başvurulan yol fenotipik özelliklerini araştırmaktır. Fenotipik özellikler besiyerinde üreme özellikleri (koloni şekli ve boyutu, rengi, hemolitik aktivitesi); bakterinin mikroskopik görüntü ve hareket durumu, biotip özellikleri: bakterinin protein (indol yapımı, H₂S yapımı), karbonhidrat (fermentasyon özellikleri, asetoin yapımı) ve yağlar (tributirin hidrolizi) üzerindeki etkileri araştırılır.

Biotipleme laboratuvarlarının kendi olanaklarıyla yapılabi-

leği gibi, bir kısmı otomatize ve komputerize edilmiş sistemlerde kullanılan ticari ayırım panelleriyle de yapılabilmektedir. Ticari paneller, üremiş bir bakteri kültüründen saatler içinde (önceden oluşmuş enzimleri saptayan yöntemlerde 2-3saat içinde) veya 24 saatte bakterinin tanınmasına imkan verir; ama klasik yöntemleri iyi kullanamayan ve belli standartları oturtamamış bir laboratuvar da sadece ticari sistemler kullanılırsa yanlış sonuçlar verme olasılığı yüksektir.

Kromatografik teknikler

Gaz-likit kromatografisi, bakteri fermentasyonun metabolik son ürünlerini saptamak amacıyla kullanılır. Bu tekniğin sık kullanıldığı bir alan, glukoz fermentasyonu esnasında zorunlu anaerop bakteriler tarafından oluşturulan kısa zincirli yağ asitlerinin identifikasyonudur. Değişik bakteriler arasında oluşan uçucu asitlerin çeşitleri ve miktarca değişimleri bakterilerin bir açıdan metabolik parmak izini açığa çıkartarak tanınmalarına imkan verir. Yüksek performanslı likit kromatografi (HPLC), bakterilerin ve mantarların dış membranları ve hücre duvarlarındaki uzun zincirli yağ asitleri analiz edilerek ileri düzeyde fenotipik özellikler açığa çıkarılabilmekte ve çok yakın ilişkili türlerin bile ayrımı mümkün olabilmektedir; HPLC özellikle mikobakterilerin tür ayırımına imkan verir.

Duyarlılık testleri

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı sadece etkeni görüp üretmekle kalmaz, aynı zamanda özellikle bakterilerin, gereğinde mantar, virus ve parazitlerin antimikrobiklere duyarlılık/direnç durumunu da belirler. Günümüzde özellikle akılcı antibiyotik kullanımına uyulmaması ve diğer nedenlerle artan mikroorganizma direnci sebebiyle duyarlılık deneylerinin yapılması özellikle hastanelerde yatan hastalardan üretilen etkenler için zorunlu hale gelmiştir.

Duyarlılık deneylerinde genelde iki yaklaşım mevcuttur: a) duyarlılık durumunun kalitatif değerlendirilmesi (hassas, orta derecede hassas/dirençli, dirençli), b) kantitatif değerlendirme: minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) belirlenmesi. Kalitatif değerlendirme esas olarak iki metotla saptanır:

i) Kirby-Bauer disk/agar difüzyon yöntemi: kağıt diske emdirilmiş değişik antibiyotiklerin agarlı besiyeri üzerine yayılmış bakterinin üremesini inhibe etip etmediğine bakılır; disk etrafındaki bakteri ürememe/inhibe olma alanlarındaki zon çapları ölçülerek değerlendirilir;

ii) Antibiyotiklerin belirlenmiş bir yoğunluğunu içeren tüpte üreme olup olmamasına (break point) dayalı yöntem. Her iki yöntemin belirlenmiş standartlarına uyulmalıdır. Ülkemizde en sık CLSI/NCCLS kurallarına uygun olarak disk difüzyon metodu uygulanmaktadır. Klinikte sık etkenler olan Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter spp, stafilokoklar, streptokoklar, enterokoklar N. gonorrhoeae vb için yöntem standardize edilmiştir. Yöntem anaerop bakteriler, P. aeruginosa dışındaki pse-

udomonaslar, Campylobacter, Helicobacter pylori vb için standardize edilmemiştir. Standartize edilmemiş etkenlerde minimal inhibitör konsantrasyon değerleri tedavide yönlendirici olabilmektedir.

Kantitatif değerlendirmede, bakterinin MİK (belirlenen bakterinin üremesini inhibe eden en düşük antimikrobik konsantrasyonu) ve istendiğinde MBK(deney ortamındaki bakterilerin %99.9unu öldüren en düşük antimikrobik konsantrasyonu) değerleri saptanmış olur. Özellikle endokardit, sepsis, menenjit, osteomyelit durumlarında bakterinin MİK'inin belirlenmesi klinikte tedavi açısından yararlıdır. MBK/MİK oranı 32den yüksekse toleransdan bahsedilir. Bu takdirde tedavi yetersizliği oluşabilir; streptokok,

Tablo:2) İmmunolojik testlerin analitik duyarlılığı

Test	Yaklaşık olarak saptanabilen miktar (İg/ml)	
	Antikor	Antijen
Presipitasyon	20	1
İmmunoelektroforez	20
Agarda çift yayılma	1
Kompleman birleşmesi	0.5
Radial immunodifüzyon	0.05	0.5
Bakteri aglütinasyonu	0.01
Pasif hemaglütinasyon	0.01
Hemaglütinasyon inhibisyon	0.001
Antitoksin nötralizasyonu	0.01
RIA	0.0005	0.000005
ELISA	0.0005	0.000005
Virus nötralizasyonu	0.00005

stafilokok vb' lerinin tedavisinde bu konu önemli olabilir. Kantitatif ölçümler tüpte sıvı besiyerinde (makro buyyon dilüsyon) veya agarda dilüsyon şekline yapılabilir. Ayrıca antibiyotikli küçük kuyular içeren plaklarda deneyler otomatize şekilde yapılabilir (mikrobuyyon dilüsyon). Son yıllarda kullanıma giren E test, difüzyon gradyenti esasına göre çalışır; antibiyotiklerin farklı miktarları plastik striplere bilinen bir gradyentlere absorbe edilmiştir. E testle bakterilerin MİK değeri, inhibisyon alanının stripe kesiştiği yerdeki rakam okunarak kolayca belirlenebilir, ama yöntem pahalıdır. Mikobakteriler, mayalar, virüsler ve parazitler için de direnç durumu belirlenebilir. Moleküler tekniklerle direnç genlerinin (PCR sonrası restriksiyon enzimleriyle kesim, DNA dizeleme, SSCP) araştırılması günümüzün ilgi çeken alanlarından biridir.

Viral etkenlerin izolasyonu

Virus infeksiyonlarında pratikte genelde özgül antikorlar(IgM/IgG) aranarak tanı konur veya PZR gibi moleküler metotlar kullanılır. Serumdaki antikorlar aktif infeksiyon için bir gösterge olmadığı durumlarda veya infeksiyon esnasında antikorlarına artmadığı hallerde viruslerin kültürüne izole edilmesi tanıda kullanılan bir diğer yöntemdir. Değişik teknikler olmakla beraber, en sık kullanılan yön-

tem aranan virusle infekte olmağa hassas memeli hücrelerinin kültüründe(pirmer maymun böbrek hücreleri, insan fetal diploid fibroblastları) virusler üretilerek tanıya gidilir. Hücre kültüründe gözlenen sitopatik etkiler veya immunfluoresens yöntemiyle özgül virus antijenleri gösterilerek tanı konur. Santrifuj-lam yöntemi (shell-vial) ile CMV kısa sürede üretilip tanınmaktadır. Herpes simplex viruslerinin üretimi de tanıda kullanılmaktadır. Viral çalışma için aranan viruse bağlı olmak üzere dışkı, boğaz yıkantı suyu, nazofarenks aspiratı, BOS, idrar, kan, vezikül sıvısı, biopsi örnekleri kullanılır.

2.3) İmmunolojik testler

Değişik klinik örneklerde mikroorganizmaya özgül antijen veya antikor arama esaslı testlerdir. İlgili testler antijen ve antikor birleşmesi esasına dayanmaktadır. Bu birleşme duyarlılık ve özgüllüğü farklı metotlarla in vitro olarak gösterilmektedir(tablo 2). Antijenik uyarıya karşı vücutta oluşan cevap deri testleriyle de gösterilebilir.

İmmunolojik testler şu alanlarda özellikle yeğlenmektedir:

- 1) etkenin üretiminin olanaksız, güç veya zaman gerektirdiği durumlar(sifiliz, bruselloz, tularemi, viral infeksiyonlar);
- 2) derin yerleşimli bir infeksiyonda örneği elde etmek veya etkeni üretmedeki zorluk(gebelikte toksoplazmoz);
- 3) geçirilmiş bir infeksiyonu veya taşıyıcılık durumunu belirlemek(akut romatizmal ateş veya streptokoksik glomerulonefritte ASO; tifoda anti-Vi, HbsAg, Anti-HCV).

Antijen araştırılan testlerde duyarlılık erken ve tedavi edilmeyen durumlarda daha yüksektir. Antikor araştırılan testlerde primer immun cevabın 7-14 gün içinde gelişmesi nedeniyle çok erken evrede yalancı negatiflik sorunu vardır; ayrıca erken tedavi edilen ve bağışıklık yetmezliği olan olgularda antikor yanıtı gelişmeyebilir.

İmmunolojik testlerden günlük pratikte en sık aglütinasyon testleri, ELISA ve fluoresanslı yöntemler kullanılır.

Presipitasyon: Partikül halde olmayıp çözünmüş durumda ki antijenin özgül antikor ile birleşme sonrasında çökmesi-ne presipitasyon denir.

Aglütinasyon: Antikor ve şekilli antijenin birleşerek gözle görülür kümeler yapması esasına dayanır.

Komplement birleşmesi reaksiyonu(KBR): Hasta serumu antijenle muamele edilir. Ortama titre edilmiş komplement konur. Antijen ve antikor birleşmişse komplement bu komplekse bağlanacak ve daha sonra test ortamına konacak gösterge sistemi olan hemolitik sistemde (antikorla kaplanmış koyun eritrositleri) hemoliz görülmeyecek(sonuç pozitif); aksi halde sistemde hemoliz gözlenecektir(test negatif). KBR, günümüzde referans laboratuvarlarında kullanılmaktadır. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay): Antijen veya antikor plastik plaklara veya boncuk-

lara bağlanıp özgül antikor/antijen aranması esasına dayanır. Değişik antikor ve antijenlerin otomatizasyonla ve gereğinde kantitatif olarak aranmasına imkan verdiği için günümüzde laboratuvarlarda en yaygın kullanılan metotlardan biridir. Duyarlılığı yüksek bir metot olup, kullanılan antijenlerin saflık derecesine göre özgüllükte yüksektir.

Fluoresans antikor tekniği

Fuoresans işaretli özgül antikor varlığında klinik örnekte özgül antijen araştırılabilir (Direkt floresans antikor-DFA). Balgam, BOS, uretral akıntı gibi etken aranacak klinik örnek lam üzerine konup fikse edilir. Ortama konan işaretli özgül antikor antijenle birleşince yıkama ile uzaklaşmaz ve floresans mikroskopide pozitiflik görülür. DFA, antijen arama için uygundur. Uretral akıntı ve konjunktiva sürüntüsünde C.trachomatis; solunum yolu örneklerinde Legionella, Bordetella pertussis ve virusler (RSV, Adenovirus, Parainfluenza virus ve İnfluenza virusleri), dışkıda Cryptosporidium bu yöntemle görülebilmektedir. Hücre kültüründe üremiş Cytomegalovirus, Herpes virus de DFA yöntemiyle erken devrede gösterilebilir.

ELISA'da olduğu gibi, antijen ve antikor birleşmesi olduktan sonra bunu açığa çıkarmak üzere komplekse bağlanacak fluoreansla işaretli konjugat/antiglobulin yardımıyla da deney yapılabilir (indirekt fluerasans antikor test, IFAT). IFAT, antijen ve antikor araştırmak için uygundur. Bu yöntemle değişik mikroorganizmalara karşı oluşmuş özgül antikorlar (IgM, IgG) araştırılabilir: kist hidatik, Toxoplasma gondii, Legionella, kızamıkçık vb.

Antijen Saptanması

Değişik immunolojik metotlar (lateks aglütinasyon-LA, karşıt gidimli immun elektroforez-CIE, ELISA, DFA, radyoaktifli immun deney-RIA) ile mikroorganizmaları ve onların değişik parçalarını (ekzotoksin, protein veya polisakkarit antijenler) saptayabilmektedir. İlgili testlerin duyarlılığı %50-95 arasında değişmektedir; infeksiyon ilk günlerinde duyarlılık daha yüksektir:

İnfeksiyon hastalıklarının klinik mikrobiyolojik tanısında antijen aramaya ilgili sık kullanılan örnekler, aranan antijenler ve yöntemler şunlardır:

Boğaz salgısında grup A streptokok antijeni (LA, ELISA), solunum yolu virusleri (RSV, influenza A/B, parainfluenza virusleri, adenovirus: DFA, ELISA); balgamda Legionella pneumophila (DFA), solunum yolu virusleri, P.carinii (DFA); BOS'ta E. coli K1, B grubu streptokok, pnömokok, N. meningitidis antijeni (ELISA, çapraz immunoelktroforez, LA), Cryptococcus neoformans antijeni (LA, ELISA); serumda HbsAg (LA, ELISA), HbeAg (ELISA), HIV p24 (ELISA), CMV pp65 (DFA), pnömokok, Aspergillus ve Candida antijenleri (LA, ELISA); uretral akıntıda veya idrar sedimentinde Chlamydia trachomatis antijeni ve Neisseria gonorrhoeae antijeni (ELISA, DFA); idrarda Legionella pneumophila (serogrup 1) antijeni (DFA, ELISA, LA), pnömokok antijeni (LA, ELISA); dışkıda Clostridium

difficile toksin A/B (LA, ELISA), S.aureus enterotoksin (ELISA), toksijenik E.coli enterotoksini (ELISA), Helicobacter pylori (ELISA), Cryptosporidium (DFA; ELISA), Giardia (DFA), Entamoeba histolytica (ELISA), rotavirus (LA, ELISA), enterik adenovirusler (LA, ELISA).

Özgül antikorları saptamak (serolojik incelemeler)

Serolojik inceleme amacıyla 5-10 ml kan temiz deney tüplerine alınıp serumu ayrılır (serum hemolizsiz olmalıdır). Serumda özgül antikorlar (IgM, IgG, IgA) aranarak bir mikroorganizma ile oluşmuş yeni (IgM veya artan IgG titrlerini göstermek) veya geçirilmiş bir infeksiyonun (IgG gibi koruyucu antikorları göstermek) tanısı konabilir. Özellikle hastalık etkeninin üretim ve diğer tanı metotlarında zorluk veya pahalılık olduğu durumlarda veya geçirilmiş bir hastalığı belirlemede serolojik deneylerden yararlanır.

İnfeksiyon hastalıklarında etkene özgül immun yanıt birinci hafta sonuna doğru belirmeğe başlar ve karşılaşılan etkene karşı ilk olarak IgM cevabı, ardından IgG cevabı oluşur. IgM cevabı çoğunlukla 2-6 ay; IgG daha uzun, bazen ömür boyu devam eder.

Genel olarak IgM yanıtının gösterilmesi akut infeksiyona işaret eder. Bununla birlikte total antikor yanıtında 4 kat artış (iki hafta arayla alınan serum örneklerinde belirgin titre artışı) da akut infeksiyonu gösterir. Primer infeksiyon sonunda oluşmağa başlayan IgG'lerin aviditeleri (fonksiyonel afinite) zaman içinde artmaktadır. Reaktivasyon veya reinfeksiyon durumlarında da yüksek afiniteli IgG'ler oluşur. Buna göre IgM nin kaybolduğu veya uzun kalıp tanıyı zorlaştırdığı durumlarda avidite testleri primer ve sekonder infeksiyon ayırımında katkı sağlamaktadır. CMV, HSV, kızamıkçık, toksoplazmoz gibi serolojik sonuçların yorumunda zorluklar yaşanan infeksiyonlarda avidite testleri tanıda katkı sağlayabilir. Serolojik sonuçları değerlendirirken daha önceki aşılama, testin duyarlılık ve özgüllüğü her zaman hatırd tutulmalıdır. Bu nedenle HIV infeksiyonunda olduğu gibi tarama testlerinden sonra doğrulama testlerine (Western blot) baş vurmak gerekir.

Son yıllarda önemi anlaşılan bir olgu hastalığın sıklığının bilinmesidir. Bir testin ya da bulgunun hastalık için özgüllük veya duyarlılığı o hastaya tanı koymak için yeterli değildir. Hastaya doğru tanı koyabilmek için o testin veya bulgunun o toplumdaki sıklığını bilmek gereklidir.

Deri testleri

Daha önce karşılaşılmış olan mikroplar vücutta erken veya geç tip aşırı duyarlılık cevabı oluşturur. Uygun antijenlerle yapılan deri testi yanıtının pozitif olması ilgili mikroorganizma veya antijenleriyle yeni veya eski bir karşılaşma durumunu yansıtır. Duyarlı bir kişide deri içine antijenin uygulanmasından 24-72 saat sonra eritem ve endürasyon

oluşur. Tüberküloz, lepra, kabakulak, bruselloz, tularemi, ruam, yumuşak şankr, lenfograduloma venorum (Frei testi), kedi tırmalaması hastalığı, toksoplazmoz, leishmanyoz, histoplazmoz ve başka enfeksiyon hastalıkları ile ilgili antijenler vardır; bu amaçla en sık PPD deri testi kullanılmaktadır.

2.4.) Moleküler Yöntemler

Son 10-15 yıl içinde klinik örneklerde mikroorganizmaların özgül nükleik asit(DNA/RNA) dizeleri saptanarak bakteri, virus, parazit ve mantar hastalıklarının tanımında büyük gelişmeler sağlanmıştır.

Esas olarak iki moleküler yöntem söz konusudur: 1)nükleik asitlerin hibridizasyonu, 2)nükleik asitlerin (hedef, prob, sinyal) çoğaltılması (tablo 3).

Nükleik asit hibridizasyon ve amplifikasyon yöntemleri değişik amaçlarla kullanıma uygundur (tablo 4).

Hemen her klinik örnekte moleküler yöntemleri çalışmak mümkündür. Çalışma öncesinde laboratuvarla temas kurulmalıdır. Gerekliğinde antikoagulan olarak EDTA tercih edilir (heparin PZR'de inhibisyon yapar). Alüminyum içeren eküvyonlar da inhibisyon yaptığından örnek alımında kullanılmaz.

Hibridizasyon yöntemleri

Metodun temel ilkesi, belirli bir maddeyle (alkalen fosfat, yaban turbu peroksidadı, izoluminol, digoksinin, biotin, radyoaktif izotop) işaretli ve hedef nükleik asit bölgesine komplementer, sentetik veya klonlanmış oligonuk-

leotid DNA veya RNA parçacıkları yani proplar kullanılarak aranan örnekte etkeni deney ortamında saptamaktır. Bakteriyal patojenlerin doğrudan tayini için kullanılan proplar, sıklıkla çok iyi korunmuş 16S ribozomal RNA dizilerine yöneltilir; çünkü bakteride tek bir genomik DNA dizisinin varlığından ziyade, ribozomal RNA dizisinin bir çok kopyası mevcuttur. Bir mikroorganizmanın nükleik asit probuyla saptanabilmesi onun canlı olmasını gerektirmediğinden kültürü zor veya uzun zaman alan patojenlerin aranmasında metod avantaj sağlar. Nükleik asit prob yönteminin saptama duyarlılığı 10^4 - 10^6 kopyadır.

Hedefin yani aranan mikroorganizmanın DNA veya RNA'sı ekstrakte edilir ve tek telli duruma getirmek amacıyla ısıtılır. Bu hedef diziler, işaretlenmiş proba solüsyonda veya katı bir yüzeyde hibridize olur (direkt saptama); in situ hibridizasyon ile dokulardaki nükleik asitler prob kullanılarak araştırılabilir. Prob, hedefiyle hibridize olduğunda oluşan biyolojik sinyalı amacıyla değişik yöntemler vardır. Hibridizasyonla bağlanan probun miktarına orantılanarak hedef nükleik asidin kantitasyonunu yapmak mümkündür;örneğin hibridizasyon yöntemiyle HBV DNA kantitasyonu.

Proplarla klinik örneklerde patojenleri saptamak

Nükleik asit propları ile değişik mikroorganizmaların klinik örneklerde doğrudan saptanması mümkündür. Örnekte az sayıda mikroorganizma varsa duyarlılık düşüktür: L. pneumophila, C.trachomatis, N.gonorrhoeae, grup A Streptococcus ve G.vaginalis bakterileri için ticari proplar mevcuttur. Bunun dışında human papillomavirus, Candida

Tablo. 3) Nükleik asit çoğaltılması(amplifikasyon) metotları

Hedef nükleik asidin çoğaltılması	Prob çoğaltma Sistemleri	Sinyalin çoğaltılması
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) - Transkripsiyon aracılıklı amplifikasyon (Transcription-mediated amplification-TMA) - Nükleik asit dizisi temelli amplifikasyon (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) - Zincir Ayırtma Çoğaltması (Strand Displacement amplification-SDA)	- Ligaz Zincir Reaksiyonu (LZR) (Ligase Chain reaction) - Q beta-replikaz - "Cycling" prob teknolojisi	- Dallanmış prob yöntemleri (b-DNA) - HPA(hybridization protection assay)

Tablo 4.) Moleküler metotların enfeksiyon hastalıklarında kullanım alanları

Etkenin saptanması(üretimleri zor veya olanaksız , pahalı, zaman alıcı etkenler)
Etkenin tiplendirilmesi
Kültür konfirmasyonu
Mikroorganizmaların subtiplemesiyle prognoz tayini
Kantitasyonla hastalığı takip(viral yük)
Epidemiyolojik inceleme
İlaç direnci saptanması:INH, rifampicin,ethambutol, methicillin, antiviraller

spp ve *T. vaginalis* için de problemlerle tanı mümkündür. Günümüzde direnç genlerini araştırmak (mikobakterilerde rifampicin direnci gibi) ve üremeyen ve üremesi zor etkenler (*Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Babesia*, *Borrelia* ve *Rochalimaea*) içinde problemler geliştirilmeğe devam etmektedir.

Kültürde üremiş patojenin cins ve türünü belirlemek amacıyla prob sistemi geliştirilmiştir: *Mycobacterium* ve *Salmonella* spp gibi. Özellikle değişik atipik mikobakterilerin tanımı için geliştirilmiş problemler sayesinde günlerce süren tür tayini çalışmaları kolaylaşmış ve bir gün içinde yapılabile hale gelmiştir.

Hedef nükleik asidin, probun ve sinyalin çoğaltılma yöntemleri

Tek bir nükleik asit dizisi saptanacak bir düzeye kadar çoğaltılabilir. Bu amaçla hedef, prob veya sinyal çoğaltılması (amplifikasyonu) yapılır: polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), ligaz zincir reaksiyonu (LZR), zincir ayırma çoğaltması (ZAÇ; strand displacement amplification) gibi (tablo 3). Belirtilen yöntemlerden en sık kullanılan PZR'dir.

PZR'de önce nükleik asit ekstre edilir; RNA elde edilmişse ters transkriptaz enzimiyle cDNA'ya çevrilir. DNA'nın çift telli yapısı ısıyla denature edilip tek telli hale getirilir. Deney ortamına konan nükleik asit bazları (dNTP), hedef diziyi spesifik olarak birleşebilen kısa DNA dizileri (primerler) ve ortama eklenen Taq polimeraz enzimi sayesinde, otomatik bir alet (DNA cycler) yardımıyla her bir siklusta belirlenen hedef çoğaltılır. Çoğaltılma tekrarlanan üç ardışık döngü ile sağlanır: 1) hedef DNA denatürasyonu, 2) tek telli DNA'ya primerlerin bağlanması (annealing), 3) hedef kopyanın yeniden sentezi; bu üç basamak ard arda tekrarlanıp yaklaşık 30 siklus sonunda milyon kadar hedefin kopyası elde edilir. Bu ürünler ya elektroforez sistemleriyle (DNA bantları etidyum bromidle boyanır) veya işaretli problemler yardımıyla (dot blot, southern blot, kemiluminesans metotlar, ELISA) görünür hale getirilir.

Bu tip metotların duyarlılığı yüksektir. Kültürden daha kısa sürede sonuç alınmasına imkan verirler. Duyarlılıklarının yüksek oluşu avantaj olmakla birlikte, gerek örnek alımı esnasında gerekse laboratuvardaki işlemler esnasında kontaminasyon nedeniyle yalancı pozitif sonuçlar nedeniyle sorunlar oluşturabilir. Bu sebeple bu tip testler, örnek alımı ve işlemi süresince kontrollü ve çok titiz çalışmayı gerektirir. Pratik olarak her etkeni PZR veya LZR gibi diğer moleküler yöntemlerle belirlemek mümkündür. Bununla beraber kontaminasyon, inhibisyon, standardizasyon sorunları nedeniyle testlerin tekrarlanabilirlikleri, güvenilirlikleri laboratuvarlar arasında değişebilir. Bu nedenle standardize edilmiş ticari kitler üzerinde çalışılmaktadır. Günümüzde *Mycobacterium tuberculosis* C. trachomatis, Hepatit B, Hepatit C, CMV vb için ticari PCR kitleri geliş-

tirilmiş durumdadır. Diğer yöntemlerden biri olan dallanmış DNA temelli amplifikasyon (branched-chain DNA) şu şekilde çalışır: orijinal probun hedef bağlayıcı dizisinden farklı bir yere bDNA bağlanır. Enzimle işaretli oligonukleotidler daha sonra bDNA üzerindeki multipl tekrarlanan dizelere bağlanabilir. Amplifiye edilmiş olan bDNA sinyali kemiluminesans ile saptanabilir. Bu metodun PZR'ye üstünlüğü, hedef dizeye probu hibridize etmek için sadece tek basamaklı işlemin gerekmesidir.

Değişik moleküler çoğaltma yöntemleri yanında PZR'nin de geliştirilmesine devam edilmekte ve özellikle sorunları aşmak üzere otomasyon konusunda önemli gelişmeler olmaktadır. Bu gelişmelerden en önemlilerinden biri gerçek zamanlı (real time) PZR'dir; nükleik asit dizilerinin eş zamanlı olarak çoğaltılmasına dayanan bu yöntemle 20-30 dakikada deney tamamlanmakta, floresans sinyal sayesinde her bir siklusta ne olduğu takip edilebilmekte ve değişik mikrobik etkenlerin kolayca belirlenebilmesi, tiplendirilmesi (DNA erime eğrisinin incelenmesi ile saptanır) ve kantitasyonu (çift iplikçikli DNA'ya özgül SYBR Green I floresans boyası çoğaltma anında daha fazla miktarda DNA moleküllerine bağlanıp daha fazla floresans oluşmakta ve oluşan floresans miktarı ölçülebilmektedir) mümkündür; sistemin bazı sakıncalarını kaldıran daha geliştirilmiş yöntemleri de (TaqMan) mevcuttur.

Son yıllarda üzerinde çalışılan başka bir yöntem birbirine oldukça yaklaşmış ve elektronları uyarılmış iki floresans boya molekülü arasında enerji transferi esasına dayalı FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) metodu floresans artışını izleyerek DNA artışını saptayabilmektedir; FRET metodu nokta mutasyonların saptanması için de uygundur; bu yöntemle *M. tuberculosis*'de ethambutol ve rifampicin direnci, HIV'in ters transkriptaz enzim inhibitörü ilaçlara karşı direnci bir kaç saat içinde saptanabilmektedir. Son yıllarda çok önemli bir gelişme "DNA chip" (microarray) teknolojisidir ve bu birbirine komplementer dizilerin hibridizasyonu esasına dayanır: 1) hedef gen dizisine komplementer DNA cam, silikon veya naylon gibi yüzeylere spotlama veya litografi gibi tekniklerle yerleştirilir, 2) incelenecek hedef nükleik asit işaretlenip katı yüzeydeki DNA parçacıkları ile hibridize edilir, 3) bağlanma varlığı floresans sinyal ile belirlenir. Microarray teknolojisi tanı, patogenezi, genotiplendirme, farmakogenetik gibi alanlarda daha şimdiden ciddi katkılar sağlamaya başlamıştır.

Yeni teknikler

Flow sitometri: İmmunoloji laboratuvarının en önemli sistemlerinden biri olmaya birlikte vücut sıvılarında infekte hücreleri saptamak, kantite etmek, ayrıca mikroorganizmaya özgül antikorları belirlemek mümkündür. Ümit vadeden biosensörler konusunda çalışmalar devam etmektedir.

Klinik örneklerin alınması, işlenmesi ve tanıyla ilgili yapılan girişimler

Bu bölümde klinik pratikte sık olarak incelenen örneklerin alınması, saklanması ve incelenmesiyle ilgili temel prensipler özetlenecektir.

Uygun klinik örneğin alınması enfeksiyon hastalıklarında mikrobiyolojik tanının anahtarıdır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının etkinliği doğru zamanda, doğru yerden ve uygun miktarda alınan örneklerle artırılır. Ayrıca klinik tanının ve ne aranması istendiğinin laboratuvara açıkça bildirilmesi, bazı özel durumlarda önceden laboratuvarın haberdar edilip çalışma çerçevesinin klinisyen ve laboratuvar sorumlusu tarafından birlikte çizilmesi en iyi sonuçlara ulaşılmasını sağlar. Klinisyen istediği laboratuvar testinin duyarlılık (hastalıklı bireyler, arasında hastaları saptayabilme), özgüllük (hastalısız bireyleri sağlam gösterebilme), pozitif ve negatif sonucu tahmin değerlerini bilmeli ve sonuçları buna göre yorumlamalıdır.

Görüldüğü gibi klinik örnek alımı konunun en önemli ayağını oluşturmaktadır. Klinisyen hangi örnekleri ne zaman, nasıl alıp göndereceğine titizlikle karar vermeli ve alınan örneğin uygun şartlarda ve zamanında, hasta hakkında açıklayıcı bilgi notunu içeren istem kağıdıyla laboratuvara ulaştığını denetlemelidir.

Uygun zamanda (erken dönem ve antimikrobik kullanmaya başlamadan önce; tifoda 1. haftada kan, 2-3. haftada dışkı, idrar kültürü) ve uygun yerden (pnömoni: balgam ve kan kültürü; yara: doku biopsisi; anaerop çalışma için aspirasyon veya biopsi örnekleri) alınmayan örnek doğru bir sonuç vermeyecektir. Örneğin sinüzit tanısı için alınan burun sürüntüsü, idrar yolları enfeksiyonu için sabah idrarı yerine günün her hangi bir saatinde mesanede hiç beklememiş idrar örneği, mesane sondası ucu, tükürüğün hakim olduğu bir balgam örneği, yara enfeksiyonunda yara yüzeyinden yapılan sürüntü sadece yeterli sonuç vermemekle kalmaz, yanlış kaniya neden olup, gereksiz tedavilerin uygulanmasına ve gerçek etkenin gözden kaçmasına neden olur. Örnek almada en önemli noktalardan biri, deri ve mukoza zarlarındaki florayla örneğin kontamine olmasını önlemektir. Bunun için aspirasyon veya biopsi öncesi ilgili vücut yüzeyinin antiseptiklerle silinmesi, seçici kültür ortamlarının kullanılması veya kantitatif kültür yapılması ile sorunlar çözülmeye çalışılır. Deri yüzeyini silmek için kullanılan antiseptik madde en az 30 saniye uygulanmalıdır. Mukozal yüzeylere antiseptik madde uygulanmaz Flora bölgesinin atlanarak geçilmesi flora kirlenmesini önler veya azaltır: suprapubik aspirasyon, transtrakeal aspirasyon gibi. Flora içeren ortamlardan alınan örneklerde mikobakteri aranırken laboratuvarında önce dekontamine edilir, ardından seçici besiyelerine ekim yapılır. Mantar, virus, Chlamydia ve Mycoplasma içinde selektif teknikler uygulanır. Flora ve patojenler arasında ayırım yapmanın bir yolu

kantitatif kültür uygulamaktır; örneğin idrar, bronkoalveolar lavaj örneklerinde, cerrahi, travmatik, yanık yaralarında kantitatif kültür teknikleri uygulanır. Belli sayının üstündeki koloni sayısı enfeksiyon hastalığını gösterir.

Hasta hakkındaki bilgi formu bizzat hastanın hekimi tarafından dikkatle ve titizlikle doldurulmalıdır. Formlarda hastaya ait kimlik bilgileri (ad, soyad, yaş, cinsiyet), örneğin ne olduğu ve alındığı bölge, klinik ön tanı veya tanı; altta yatan hastalıklar (DM, bağışıklık yetmezliği, malignite, transplantasyon hastası), örneği gönderen poliklinik veya servis adı, gönderen hekimin adı-soyadı (kaşesi) ve serviste yatan hastaya ve ilgili hekime ulaşılacak telefon numarası, örneğin alındığı tarih (saat belirtilerek), hastanın kullandığı antimikrobikler, hangi özel işlemlerin istendiği (anaerop, Legionella, Leptospira, Mycoplasma, Chlamydia, mikobakteri, mantar, virüs incelemesi) bulunmalıdır.

Rutin olarak yapılmayan istemler için laboratuvarın bir ön hazırlık yapmasına imkan sağlayan ön bilgilendirme gerekir: Leishmania için NNN besiyeri, Leptospira besiyeri, Legionella besiyeri, Bordetella pertussis besiyeri hazırlanmasına imkan verilmelidir. Laboratuvarında gerekli ön hazırlıklar yapıldıktan sonra örnek alınıp laboratuvara gönderilmelidir.

Örnek almada eküvyonla (pamuk uçlu veya kalsiyum aljinate) sürüntü almak, aspirasyon, biopsi en sık kullanılan işlemlerdir. Eküvyonla yeterince örnek alınamadığından deri ve mukoza membranları dışı bölgeden örnek alımında tercih edilen bir yol değildir. Bir vücut bölgesinden sıvı veya pü almak için eküvyon değil, aspirasyon kullanılmalıdır. Bir enjektörle alınan aspirasyon örneği anaerop koruma da sağlayan taşıma besiyelerine konup laboratuvara gönderilmelidir. Lezyondaki sıvı veya pü azsa, az miktarda steril serum fizyolojik veya laktatlı ringerle irrigasyondan sonra alınan örnek taşıma besiyerine konup laboratuvara gönderilmelidir. İnvazif işlemlerle alınan örnekler, yeniden örnek eldesinin zorluğu nedeniyle çok dikkatle toplanmalıdır. Cerrahi ile alınan doku örneği, ilgili cerrah tarafından steril şekilde küçük parçalara ayrılıp steril taşıma kaplarına konmalı mikrobiyoloji ve patolojiye gönderilmelidir. Kronik enfeksiyonda ilgili bölgede zamanla mikroorganizmalar azalacağından bu tip olaylarda daha büyük miktarda örnek alınmalıdır.

Her klinik örnek konuyla ilgili yeterli düzeyde eğitilmiş kişi tarafından alınmalıdır. Her serviste klinik materyel alımı ve naklinden sorumlu bir kişinin görevlendirilmesi işlerin uygun yürütmesi açısından önemlidir. Materyel alımından sorumlu olan hastalara örneği nasıl vereceklerini iyice anlatmalı, gerekirse hasta için yazılı klavuzlar hazırlanmalıdır. Gereğinde Enfeksiyon Hastalıkları Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarıyla işbirliğine gidilip meningokok menenjit gibi durumlarla kültür ekimleri hasta yatağı başında sağlanmalıdır.

Klinikçe bilinmesi gereken bir diğer konu istenen testlerin sonuçlandırılma süresidir. Direkt mikroskopik incelemeler ve hızlı tanı teknikleri bir yana bırakılırsa genelde sonuç alınması 2-4 gün sürer. Hemokültür klasik sistemlerde 30 gün, otomatize sistemlerde 7 gün içinde sonuçlandırılır. Aranana etkene bağlı olarak sonuç verme süresi bazen 4-6 haftaya uzayabilir(mikobakterilerde olduğu gibi) .

Ayrıca klinisyen istem yaptığı laboratuvarın spektrumunu bilmelidir. Örneğin mikobakteri ayrımı ve duyarlılık testi, anaerob bakteri tanınması ve duyarlılık testi, Legionella üretimi, küf mantarlarının izolasyon ve ayrımı, virolojik çalışmalar vb her laboratuvarda yapılamaz. Örnek alınır alınmaz uygun steril kaplara konup hemen laboratuvara gönderilir; hemen laboratuvara gönderilemeyen örnekler taşıma besiyerine(Cary-Blair, Amies, Stuart) konup gönderilmelidir.

İnfeksiyon hastalıkları laboratuvar tanısında başarı iyi işleyen bir klinik ve laboratuvar iş birliğinden geçmektedir; klinisyenin laboratuvar tanımı noktasında her türlü sorundan (örneklerin alınması, taşınması, değerlendirilmesi) ve hasta ile ilgili klinik bilgilerden laboratuvarı haberdar etmesi zorunludur. Nitekim laboratuvarın hasta yararına etkin kullanım yolunun iyi seçilip, toplanmış ve uygun şekilde taşınıp laboratuvarda zamanında işlenmiş örnek olduğu bilinen bir gerçektir. Laboratuvardan uygun sonuç alınamayışının ana nedeni laboratuvarın yetersizliği değil, klinik ve laboratuvar arasına yetersiz iletişime bağlı olduğu bilinmelidir.

Alınan klinik örnek öncelikle çıplak gözle incelenmelidir (BOS'un görünüşü, bekletilen BOS'da örümcek ağı oluşması; balgamın tükrük içermemesi; absede mavi-yeşil renk, sülfür granülleri ; dışkıda pirinç suyu görüntü, çilek jölesi tarzında dışkı, sümüklü kanlı dışkı, erişkin parazit, bulanık idrar)

Laboratuvarda gönderilen bölge ve örnek dikkate alınarak öncelikli patojenler dikkate alınarak aranır. Hastanın antimikrobik kullanan, alkolik veya bağıışıklık yetmezlikli biri olduğu bilinirse daha geniş spektrumlu bir etkenler tablosu dikkate alınır. Taşıma besiyerlerinde mikroorganizmaların dayanabileceği süre dikkate alınmalı, bu süreyi aşma durumunda Chlamydia ve virus çalışmalarında olduğu gibi örnekler derin dondurucuda(-70°C) veya bir azot tankında dondurulmalıdır. Uygun şekilde alınmamış klinik örnekler (tablo 4) klinik mikrobiyoloji laboratuvarında çalışılmaz ve durum kliniğe acilen bildirilip yeni materyel istenir.

Üst solunum yolu örnekleri

Boğaz sürüntüsü

Tonsillofarenjit çocukta %25, erişkinde %15 A grubu streptokoklar etkindir; grup C ve G streptokoklar, N.

Tablo.4) Klinik örneklerin reddedilme durumları

1. Klinik örnekle ilgili yetersiz bilgi (materyelin üzerinde kimlik bilgilerini içeren etiketin olmayışı, çalışmayı ak-satacak düzeyde istem formunun doldurulmamış olması)
2. Steril olmayan kaplarla gönderilen örnekler veya kabın sızdıracak tarzda hasarlanmış olması
3. Saklanmaması ve nakli uygun olmayan örnekler
4. Formaldehit içinde gönderilen örnekler
5. İstenen çalışma için yetersiz örnekler
6. Anaerob kültür için floralı bölgerden (boğaz sürüntüsü, balgam, endotrakeal aspirat, vagina sürüntüsü, işemeye alınan idrar, yüzeysel yara sürüntüleri, dışkı: *C. difficile* hariç) alınan klinik materyeller

gonorrhoeae, Arcanobacterium haemolyticum, Corynebacterium diptheriae, anaeroplara(Fusobacterium, Borrelia vincenti) etken olabilir.

Tonsillofarenjit hastasından bir dil basacağı ile dil aşağı doğru bastırılır, pamuklu eküvyon dil ve yanaklara değdirilmeden her iki tonsil üzerine ve farenks arka duvarına, varsa ülserli ve pürülan alanlara döndürülerek bir kaç kez sürülür (C.diptheriae, B.pertussis ve N.gonorrhoeae aranacaksa Dacron veya kalsiyum alginat uçlu eküvyonlar önerilmektedir) . Dil ve yanağa değdirme kültürde flora bakterilerinin baskın üremesine ve sonucun yanlış yorumlanmasına neden olur. Eküvyonla alınan örnek 2 saat içinde laboratuvara gönderilmelidir. Daha uzun sürede laboratuvara ulaşacak örnekler taşıma besiyerine konmalıdır. Grup A streptokok kuruluğa dayanıklı olduğundan sadece bu amaçla yapılacak inceleme için alınan örneğin taşıma besiyerine konmasına gerek yoktur. Boğaz sürüntüsünde rutinde sadece A grubu streptokoklar kültür ve antijen arama yöntemiyle aranır. Diğer etkenlerin aranması isteniyorsa laboratuvar uyarılmalıdır. LA ve ELISA ile GAS antijenleri hızlı şekilde aranabilir. Bu metotların duyarlılığı %60-90, özgüllükleri %90 üzerindedir. C. trachomatis (süt çocuğu pnömonisinde), M. pneumoniae, değişik solunum yolu virüsleri (influenza A, B, Parainfluenza, Respiratory syncytial virus-bu etken için burun yıkantı örneği tercih edilir-, Adenovirus) izolasyonu için boğaz sürüntüleri kullanılabilir. Chlamydia ve Mycoplasma için örnekler sukroz-fosfat taşıma besiyerine, viruslar için alınan örnek özel virus transport besiyerine konur. Boğaz salgısında virus antijenleri (RSV, Parainfluenza1-2-3, adenovirus, influenza A ve B) DFA ve ELISA gibi hızlı tanımla metotlarıyla antijen araştırılabilir

Nazofarenks sürüntüsü

Kalsiyum alginat eküvyonu veya organik kömürlü eküvyon, burundan arka nazofarenkse sokulup 4-5 kez döndürülerek sekresyonların emilmesi sağlanır. Alınan örnek bir taşıma besiyeri içinde laboratuvara gönderilir, olanak varsa hasta başında ekim yapılır. Örnekler, iki saatten kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı ve bu esnada oda ısısında

saklanmalıdır. Nazofarenks sürüntüsü, *S.pyogenes*, *N.meningitidis*, *C.diphtheriae*, *B.pertussis* üretimini sağlamak, solunum yolu virüslerini belirlemek için uygundur.

Burun sürüntüsü

Eküvyon burun deliklerinden sokulur, bir kaç kez döndürülerek örnek alınmış olur. Özellikle hastanelerde methicilline dirençli *S. aureus* taraması amacıyla bu örnek tercih edilir. Burun akıntısı sinüzit etkenlerini göstermez. Sinüzitte örnek, sinus boşluklarına ulaşarak aspirasyonla alınmalıdır; rutinde sık başvurulmaz.

Kulak örnekleri

Otitis eksterna'da dış kulak yolu serum fizyolojikle silinip, varsa kabuklar kaldırılır sonra sürüntü kültürü alınır. Otitis mediada gereğinde timpanosentezle alınan orta kulak materyeli hemen laboratuvara ulaştırılır.

Alt solunum yolu örnekleri

Alt solunum yolu enfeksiyonları bakterisi (*S.pneumoniae*, *K.pneumoniae*, *S.aureus*, *M. tuberculosis* ve diğer mikobakteriler, *M.pneumoniae*, *C. pneumoniae*), virus, mantar ve bazı parazitler tarafından oluşturulur. Olası etkeni tahmin için hastanın yaşı, mesleği, seyahat anamnezi, bağışıklık durumu ve mevsim dikkate alınır. Tanım girişimleri de şüphelenilen etken, altta yatan hastalık, anamnez ve klinik duruma bağlıdır. Tanım için yapılan işlemler kabaca noninvazif ve invazif teknikler olarak sınıflandırılır.

İnvazif olmayan yöntemlerin başında öksürtmekle balgamın elde edilmesi gelir. Gece boyunca solunum yoluna biriken salgıları toplamak amacıyla sabah balgamı işlenmek üzere tercih edilir. Balgam alınmadan önce ağız temiz su ile üç kez çalkalanır. Hasta tükürük değil balgam vermesi için eğitilir. Hastanın verdiği balgamın tükürük değil pürülan materyelden oluştuğu sorumlu kişi tarafından görüldükten sonra 2 saat içinde laboratuvara gönderilmelidir. Tükürükle karışmamış olduğu gözlenmeden gönderilen balgam laboratuvarında yapılan kalite incelemesinde uygun bulunmazsa işlenmeyip hastadan yeniden örnek istenecek, böylece tanıda gecikme oluşacaktır. Balgam laboratuvarında hemen ekilemeyecekse oda ısısında de bekletilir.

Mikobakteri tanımı için ardışık 3 sabah balgamı alınır (24 saatlik balgam toplanması kontaminasyonu artırdığından kullanılan bir materyel toplama yöntemi değildir). Fazla bekletilmeden örnek laboratuvara ulaştırılır. Laboratuvarında mikroskopi, kültür ve gereğinde PZR gibi moleküler metotlarla basilin DNA'sı amplifiye edilir. Balgamın kalitesi değişik şekilde incelenmekle beraber en sık kullanılan kriter, küçük büyütme ile bir her alanda (10-20 alan taranır) 25 veya daha fazla lökosit, 10 dan az sküamoz epitel bulunması gereğidir (lam lamel arası yaş preparat veya Gram boyalı preparat). Nötropenik hastalarda balgamda

lökosit az olabilir; bu durumda sküamoz epitel hücreleri fazla değilse örnek işlenmek üzere kabul edilir. Alınan örnekte silialı epitellerin görülmesi örneğin alt solunum yollarından geldiğinin işaretidir.

Gram boyanan yaymalarda görülen baskın bakteriler (pnömokok benzeri, *Neisseria benzeri*, stafilokok benzeri, *Haemophilus benzeri*...) rapor edilir. Balgamda *Haemophilus* ve *Neisseria benzeri* bakterisi varsa çukulatamsı agara ekim yapmak zorunludur. Florada *Haemophilus*, *Neisseria*, *M.cattarrhalis* bulunduğundan bunların etken olarak kabul edilmesi direkt inceleme baskın olarak gözükmelerine bağlıdır. *C. trachomatis* (süt çocuğu pnömonisinde), *M. pneumoniae*, değişik solunum yolu virüsleri (influenza A, B, Parainfluenza, Respiratory syncytial virus-bu etken için burun yıkantı örneği tercih edilir-, Adenovirus...) izolasyonu için boğaz sürüntüleri kullanılabilir.

Balgam çıkaramayan hastalarda balgam hipertonic tuzlu su bir nebülizerle inhale ettirilerek elde edilmeğe çalışılır. İndüklenmiş balgam, mikobakteri, mantar ve *Pneumocystis carinii* akciğer enfeksiyonları tanısına yardımcı olur. Alt solunum yolu salgılarını elde etmenin diğer yolu invazif yöntemlerdir. Günümüzde bu amaçla sık kullanılan girişimler bronkoalveolar lavaj (BAL) veya korunmuş kateter fırçalama ile birlikte fiberoptik bronkoskopinin kullanımındır. BAL yönteminde akciğerde etkilenmiş bölüme 40-50 ml steril serum fizyolojik (SF) instile edilir, instile edilen sıvı alınabildiği kadar geri alınır; işlem 4-5 kez tekrarlanır; sonuçta toplam 250 ml kadar SF instile edilmiş olur. Aspire edilen lavaj sıvısı santrifuj edilip mikroskopik olarak incelenir (direkt, Gram, EZN, toluodine mavisi-O). Santrifuj edilmemiş örnek koloni sayımı yapacak şekilde ekilir; ml'de 10^6 'dan fazla üreme olması enfeksiyon varlığını gösterir. Mikobakteri, mantar ve virus kültürleri santrifuj edilen örnek sedimentinden çalışılır.

Korunmuş kateter fırçalama (KKF) ile 1 ml laktatlı Ringer solüsyonuna alt solunum yolu örneği alınır ve aerop ve anaerop kültür çalışılır. Ekimler kantitatif olarak yapılır. Koloni sayımı 10^5 /ml veya daha fazla ise ilgili etkenin enfeksiyona sebep olduğu kabul edilir. Kontaminant mikroorganizmalar genellikle daha az sayıda bulunur.

Entübe edilmiş, yoğun bakım hastalarında örneğin BAL veya KKF tekniği ile alınması uygundur; örnek bu şekilde alınamazsa endotrakeal aspirat örneği alınır. Endotrakeal aspirat örneğinde kantitatif kültürde ml'de 10^6 'dan fazla üreme enfeksiyon lehine kabul edilir. Bağışıklık yetmezliği olan hastalarda transbronşial biopsi yapılması önerilir: elde edilen örnekle hem histopatolojik çalışma hemde tam bir mikrobiyolojik analiz yapmak mümkündür.

Diğer invazif metotlar torakosentez, transtrakeal aspirasyon ve transtorasik iğne aspirasyonudur. Torakosentez çocuklar-

da *H. influenzae pnömonisi*, erişkinlerde anaerobik plöropulmoner hastalık tanısında değerlidir. Hasta bağışıklık yetmezlikli ise ve yukarıdaki metotlarla tanı konulmazsa açık akciğer biopsisi ile örnek alınır. Elde edilen kesitten taze olarak sürme preparasyonlar da yapılır. İlgili preparatlar Gram, EZN, Gomori methenamin gümüş ve *Legionella* için DFA ile boyanır. Örnek homojenize edilip mantar (KOH ile eritip calcoflor boya ile direkt inceleme ve mantar kültürü), bakteri ve virus araştırmaları için kullanılır.

Kan

Ateşin eşlik ettiği değişik infeksiyon hastalıklarında, bakteremi/fungemi düşünülen durumlarda kan örneği alınır. Kan kültürleri tercihen antibiyotik tedavi başlamadan önce, ateşlenme öncesinde üşüme ve titreme döneminde periferik venlerden alınır; üşüme titreme olmuyorsa ateş yükselmeye başlar başlamaz kan alınmalıdır. Kan alınacak bölge %70 alkolle bir dakika kadar silinir, daha sonra tencere, polivinil iyot ile 30 saniye kadar merkezden çevreye doğru yeniden silinir, 30-40 saniye beklenir; bu bölgeye çıplak elle değmeden enjektörle damara girilip (eğer steril eldiven giyilirse girilecek damar yeniden palpe edilebilir), çalışılan sisteme ve hastaya göre kan alınır ve alınan kan daha önce temin edilen hemokültür şişelerine aseptik koşullarda boşaltılır. Bir hemokültür için erişkinlerden genelde 8-10 ml, çocuklardan 3-5 ml (yenidoğandan 1-2 ml) kan alınması yeterlidir. Ticari otomatize besiyerlerine ekim yapılmışsa ve şişeler hemen laboratuvara gönderilemiyorsa gece boyunca oda ısısında bekletilir; ekim bir Castenada şişesine yapılmışsa ekim şişesi etüve kaldırılır.

Kan kültürü alırken, mevcut takılı bulunan bir damar içi kateterden değil, periferik venden örnek alınması daha uygundur. Damar içi kateterlerden alınan kan örneğinde koagülaz negatif stafilokok üremesi, ancak eş zamanlı alınan periferik venden aynı bakterinin üremesi durumunda değerlidir. Genellikle iki ayrı hemokültür alınması yeterlidir. Aralıklı bakteremiyi saptamak ve deriden bir kontaminasyon kuşkusunu uzaklaştırmak için bir saat aralarla günde 2-3 kan kültürü alınması gereklidir. Sepsis, menenjit gibi acil hallerde 20-30 dak aralarla kan kültürleri alınıp acilen tedaviye başlanır. Bakteremi kuşkusuna yüksekse ve şahıs önceden antimikrobik madde kullanmışsa 3-4 hemokültür örneği alınır.

Hastada bir anaerobik enfeksiyon odağı düşünülüyorsa anaerob kan şişelerine ilaveten anaerob kan şişelerine de ekim yapılır. Mikobakteriyemi ve fungemi (sistemik mikozlar: *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*) kuşkusunda özel mikobakteri veya mantar hemokültür şişelerine ayrıca ekim yapılır. *Legionella*, *Leptospira* gibi bakterilerin kandan üretimi için özel besiyerlerine ekim yapılır. Kandan virus çalışılması organ transplant alıcılarında CMV enfeksiyonu kuşkusunda "buffy coat" dan yapılmaktadır.

Kandan parazit çalışmaları da yapılır. Ülkemiz için halen önemini devam ettiren sıtma için "her ateşli hastadan sıtma araştırılmalıdır" sözü hatırdta tutulmalıdır. Özellikle seyahatten dönen hastalarda ateş varlığında akla mutlaka sıtma gelmelidir. Sıtma tanısı için parmaktan alınan kandan ince ve kalın yaymalar yapılır. Sıtma için febril atak sırasında veya hemen sonrasında kalın damla ve periferik yaymalar yapıp Giemsa ile boyanır. Sıtma tanısını dışlayabilmek için en az 6-8 farklı örneğin incelenmesi önerilmektedir.

Parazitozlardan *Wuchereria* ve *Brugia* nokturnal periyodiklik gösterir. Bu mikroflaryaların kanda bulunması için en uygun dönem olan geceyarısı örnek alınır; *Loa loa* ise diurnal ritme sahiptir, bu parazit için kan öğlen saatlerinde alınmalıdır. Bu parazitler için antikoagulanlı kan alınıp incelenmelidir.

Damar içi kateterler

Kateter aseptik olarak çıkarılır. Ucundan yaklaşık 10 cm'lik bir kısım kesilip steril bir taşıma ortamına konup laboratuvara gönderilir. Maki yöntemiyle kültür yapılan kateterde 15'den fazla bakteri kolonisi üremesi klinik şüphe durumunda kateter enfeksiyonu tanısını koydurtur. Kateter lümeninden ve aynı anda başka bir periferik venden alınan hemokültürle de kateter enfeksiyonu tanısı konabilir. Bunun için her iki kan örneği kantitatif kültür yöntemiyle ekilir. Olanak varsa ilgili örnekler otomatize hemokültür sistemi şişelerine konup incelemeye alınır. Kateter lümeninden alınan kan örneğinde periferdeki kandan iki saat öncesinde aynı bakteri ürerse kateter enfeksiyonu tanısı konulur. Özel fırçalama tekniği ile kateter lümeninden örnek alınıp mikrobiyolojik inceleme için için kullanılabilir.

Apse

Apse kapalıysa bir enjektörle girilip apse örneği aspire edilir veya drene olmuş apse tabanından derin sürüntü yapılarak örnek alınır. Anaerob taşıma sistemleriyle laboratuvara gönderilir. Bu olanak yoksa püy alınan enjektörün iğne ucu kıvrılıp, gazlı bez içine sarılır; böylece hava alması minimuma indirgenir; bu takdirde örnek en kısa sürede laboratuvara ulaştırılıp ekim işlemleri gerçekleştirilir.

Yara örnekleri

Derin sürüntü veya pürülan materyelin enjektörle aspirasyonu yapıp, gerekli halde anaerob koşullar sağlanarak laboratuvara gönderilir. Yanık yarası enfeksiyonlarında yüzeysel sürüntü, derin dokudan biopsi tercih edilmelidir.

Beyin omurilik sıvısı (BOS)

MSS enfeksiyonları bakteri, virus, mantar ve bazı parazitler tarafından oluşturulur. Etken, hastanın yaş, bağışıklık durumu, mevsim ve diğer değişken şartlara göre farklılık gösterir. Örneğin yenidoğan bir çocukta menenjitin en sık et-

kenleri *Streptococcus agalactiae*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes* iken, 4ay-4 yaş arası çocuklarda *H.influezae* (aşı yapılan ülkelerde sıklığı azalıyor), *N.meningitidis* ve *S.pneumoniae*, erişkinlerde *S.pneumoniae* ve *N.meningitidis*'dir. MSS enfeksiyonlarında kontrendikasyon yoksa BOS alınır, incelenir. Hasta yatar pozisyonunda iken, alkol ve iyotlu bileşiklerle girilecek alan silindikten sonra steril çalışma şartlarına azami dikkat göstererek L3-L4, L4-L5 vertebra aralığından özel ponksiyon iğneleriyle girilir, üç yarı tüpe BOS alınır ve bu esnada bir manometre yardımıyla basınç ölçülür. Bakteri araştırması için 1 ml kadar BOS yeterlidir; ama mantar ve mikobakteri incelemelerinde daha büyük hacimler (her biri için enaz 2 ml, tercihen 5-10 ml) alınır.

Alınan BOS'un görünüşü, rengi, hücre sayısı ve hücre tipi, glukoz, protein, LDH içeriği araştırılır. BOS mümkün olan en kısa sürede mikrobiyolojik olarak incelenir; saklamak için buz dolabına konulmaz. Bekletilecekse etüde bekletilir. Etken spektrumu düşünülünce olanak varsa hasta başında ekim yapılması tercih edilir. BOS'ta virus araştırılacaksa buz içinde +4 °C'de laboratuvara ulaştırılır. Uygun bir santrifujde örnek çevrilip sedimentten çalışılır. Yoğunlaştırma için filtrasyon teknikleri de kullanılabilir.

Gram, EZN boyaması yanında *Cryptococcus neoformans* düşünüldüğünde çini mürekkebi ile ortamı boyayarak inceleme (duyarlılık: <%50) tanımda yararlıdır. Gram boyama ile *H.influezae* menenjitlerinde %80, *N. meningitidis* ve *S.pneumoniae* menenjitlerinde ise biraz daha düşük oranda pozitif olarak etken bakteri görülebilir. BOS'tan aerop (gerektiğinde anaerop: <%1) bakteri kültürleri, mikobakteri ve mantar araştırması yapılır. Beyin apsesinden yapılan aspirasyon bir aerop/anaerop taşıma vasatına konarak laboratuvara gönderilip, aerop ve anaerop kültürler yapılır.

S.agalactiae, *E.coli* K1, *H.influenzae*, *N.meningitidis* ve *S.pneumoniae* antijenleri lateks aglütinasyon veya ELISA ile aranarak kısa sürede tanı koymak mümkündür. Etkene göre değişmek üzere bu hızlı tanımla antijen arama duyarlılığı %50-80 arasındadır. Tedaviye rağmen antijen testleriyle pozitif sonuç elde etmek mümkündür. *Cryptococcus neoformans* düşünüldüğünde duyarlılık ve özgüllüğü çok yüksek LA ile antijen arama da yapılmalıdır.

Virus kültürü pratik olmamakla beraber enterovirusler (boğaz salgısı ve dışkıdan da izole edilir), kabakulak virusu (boğaz salgısı ve idrardan da izole edilir) ve arboviruslerin tanımında etkeni belirlemek noktasında yararlıdır. Herpes simplex virusun (HSV) üretim oranı diğerlerinden düşüktür. HSV tanımında beyin biopsisinden yapılan kültür değerlidir. BOS'tan HSV, PZR ile başarıyla amplifiye edilebilir.

Plevra sıvısı

Plevra sıvısının alınması (torasentez), kör iğne aspirasyonu veya ultrasonografi ile lokalizasyon sonrasında alınır.

Torasentez esnasında %5 kadar olguda pnömotoraks komplikasyonu meydana gelebilir. Alınan plevra sıvısı hücre sayımı ve biokimya incelemeleri, sitolojik ve mikrobiyolojik inceleme için kullanılır.

Plevra sıvısının pH, glukoz, protein ve LDH seviyeleri ölçülerek transüda veya eksüda karakteri belirlenir (plevra sıvısı proteini /serum proteini >0.5, plevra sıvısı LDH/serum LDH>0.6 ise bu örnek eksüdatif karakterdedir).

Parapnömonik efüzyonlar pnömonili hastalarda nispeten sıktır. Solunum yolları salgılarındaki kontamine olma riskini taşımadığından pozitif kültür etkeni gösterir ve tedavi uygun şekilde seçilir (plevra sıvısı alınması esnasında, nadiren deriden koagulaz negatif stafilokoklar, difteroidler ve *Propionibacterium* ile kontamine olabilir)

Plevra sıvısı, pnömokoksik pnömoni dışında, anaerop akciğer enfeksiyonları ve *Legionella* enfeksiyonlarının tanımında da kullanılır. Bazı olgularda, özellikle plevranın tüberküloz tutulumu kuşkusunda (tbc plörezi) paryetal plevradan kapalı biopsi yapılır. Bu biopsi örneği histolojik inceleme ve kültür için uygundur.

Assit sıvısı

Asit sıvısı, karından sol alt taraftan parasentezle alınır. Plevra sıvısındakine benzer işlemler yapılır. Anaerop kültür yapılacaksa anaerop koşullarda laboratuvara gönderilir.

İdrar

Pyelonefrit ve sistit üriner sistemin en sık karşılaşılan enfeksiyonlarıdır. Üriner sistem enfeksiyonlarının tanısı için, en sık temiz elde edilmiş orta akım idrarı kullanılır (sabah elde edilmiş veya mesanede en az 4 saat beklemiş idrar). Özellikle kadınlar idrar vermeden önce periuretral ve introital alanı sabunlu bir gazlı bezle bir kaç kez sildikten sonra örnek vermelidir. Erkelere glansın sabunlu suyla temizlenmesi tercih edilir. Antiseptik kullanımı bakteri üremesini olumsuz etkileyebilir. Uretra normal olarak aerop ve anaerop değişik bakterilerle kolonize olduğundan idrar yaparken ilk bir kısmını dışarı atmak flora bulaşını azaltır. Temizlik işleminden sonra hasta bir kısım idrarını dışarı yapar, ardından orta akım idrarı steril, geniş ağızlı, kapaklı bir taşıma kabına alınır.

İdrar yolu sondası kullananlarda belli bir süre sonunda hepsi kolonize olacaktır. Bu tip olgularda idrar kateter torbasından değil, hemen uretra çıkış kısmından, sonda klamp edilerek beklenir ve ardından dezenfektanla sonda silinerek enjektör yardımıyla idrar örneği alınır. Foley sondası uçları kültür amacıyla kullanılmaz. İdrar eldesi için normalde sonda ile örnek almak pek kullanılmaz. Kullanıldığında steril koşullara dikkat ederek mesaneye girip idrar alınıp mikrobiyolojik amaçla incelenir.

Suprapubik aspirasyonla alınan idrar örneğinde aerop ve

anaerop kültür çalışması yapılabilir; üriner sistem yakınımları olan ve orta akım idrarında *G.vaginalis* üretilen hastalarda şikayetlerin bu bakteriye ait olup olmadığı suprapubik idrar örneğiyle çalışılarak değerlendirilir. İdrar akımında az sayıda mayanın tekrarlanan kültürlerde üremesi durumunda aynı yola başvurulur. Toplanan idrar 2 saat içinde mikrobiyolojik açıdan çalışılmalıdır (idrar mükemmel bir besiyeridir; oda ısısında az sayıda bakteri hızla çoğalır); eğer çalışılmayacaksa idrar buzdolabında saklanmalıdır (maksimal 6-8 saat). Transport besiyerine konursa 24 saat sonra çalışmak mümkündür. İdrarda mikobakteri ve mantar araştırması sabah idrarında yapılır; en az üç sabah idrarı (30-50 ml miktarında) incelenir; 24 saatlik sürede toplanmış idrarlar bu amaçla kullanılmaz; 24 saatte toplanarak biriktirilmiş idrar sadece parazitolojik (*Schistosoma*) inceleme için uygundur. İdrar kültürü yapılması gereken durumlar: Üriner sistem infeksiyonu, vaginit ve cinsel temasla bulaşan hastalıklar arasında ayırıcı bir sorun olunca; süt çocuğu, çocuk, erkek hasta ve yaşlı hastalarda bakteriüri şüphesinde; pyelonefrit kuşku edilen hasta; nükseden üriner sistem infeksiyonu halinde (özellikle kısa süreli tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda); gebe kadında gizli bakteriüri kuşkusunda; semptomatik kateter veya enstrümantasyonla ilişkili nozokomiyal enfeksiyon varsa; üriner sistem enstrümantasyonu öncesinde. İdrar kültürü şu durumlarda genellikle gerekli değildir: komplike olmayan idrar yolu infeksiyonu olan kadınlar; kronik, kalıcı uretral kateterli asemptomatik hastalar.

İdrarda bakteriürinin hızlı saptanması:

10 İL idrar lam üzerine konup kurutulur; tespit edilip gram boyama yapılır. Her immersiyon alanında 1-2 bakteri görülmesi 10^5 KOB/ml'e işaret eder (%95 doğrulukla). Aynı seviyede bakteriüriyi lökosit esteraz-nitrit stripleriyle %85 doğrulukla saptayabiliriz. Lökosit esteraz nötrojenik hastalarda, nitrit varlığı nitratı indirgemeyen bakterilerin varlığında testlerin negatif olmasına neden olacaktır. İdrar kültüründe infeksiyonu gösterecek koloni sayısı ayırıcı değeri 10^5 KOB/ml olarak alınırsa üriner sistem infeksiyonu yönünden özgül sonuçlar elde edilir; ama hastanın semptomları varsa ve idrar kültüründen bir üropatojen üretilirse (*E. coli*, *S. saprophyticus*) KOB 10^2 /ml olsa bile üriner sistem infeksiyonu olarak kabul edilir.

Genital örnekler

Gonore, sifiliz, herpes simpleks, yumuşak yara, trikomoniya ve Chlamydia infeksiyonlarının tanısı amacıyla vezikül, püstül, ülseratif lezyonlardan örnek alınır.

Vaginadan bir eküvyonla serviks sürüntüsü yaparak veya 0.5 ml kadar sekresyon alınır. Birden çok patojen aranacaksa (Chlamydia, Ureaplasma urealyticum, Grup B streptokok, *T.vaginalis*) her etken için bir eküvyonla sürüntü alınır. Uretrada kadında uretral orifisten sürüntü, erkekte ince uçlu bir eküvyonla uretraya 2-3 cm girilip örnek eküvyonu döndürerek alınır; 0.5 ml kadar sekresyon da çalışma için

uygundur. Eküvyon taşıma besiyerine konup 2 saat içinde laboratuvara gönderilir. İşlem yapılana kadar oda ısısında bekletilir. Veziküler lezyonlarda Herpes simplex virus Tzanck testi, DFA ve PZR ile araştırılır.

Ülseratif lezyonlardan (ülserli alan serum fizyolojik ile yıkanır, steril gazlı bez kanatmadan sürülür, çıkan seröz sıvı alınıp karanlık alanda incelenir). *T.pallidum* karanlık alan incelenmesi ile görülür; *H. ducreyi*, *Callymmatobacterium granulomatis* için ülserli alandan biopsi yapılır, etkenler Gram boyama ve kültürle araştırılır. Primer püstül ve lenfadenopati varsa lenfogradüloz venorum düşünülüp lenf bezi aspirasyonu yapılır. Etken *C. trachomatis* (L1, L2, L3) DFA, MacCoy hücre kültürü, PZR ile araştırılır.

Vaginit/vaginosiz tanısında, akıntıdan mikroskopi yapılır: üzerlerinde balık sürüsü şeklinde bakteri kümelenmeleri olan epitel hücre toplulukları "clue cells" varlığı ve vaginal akıntı %10 KOH ile muamele edildiğinde balık kokusu açığa çıkması *G.vaginalis*'e işaret eder.

Ayrıca Gram boyamada *Lactobacillus benzeri* ve diğer gram pozitif bakteriler az veya yok, *G. vaginalis benzeri* bakteriler ve Gram değişken kıvrımlı çomaklar varsa (*Mobilincus spp*) bakteriyel vaginosis tanısı konur.

Dışkı

Dışkılama yoluyla alınan 1 g kadar taze dışkı, ağız geniş, kapaklı, sızdırmaz plastik kaplara konur veya eküvyonla iki rektal sürüntü örneği alınır. Örnekler 1 saat içinde laboratuvara gönderilir. Gecikme daha fazla olursa *Shigella* cinsi bakteriler inhibe olacaktır. Gönderme veya ekim gecikecekse dışkı örneği Carry-Blair gibi bir taşıma vasatına konur. Ekim gecikecekse (>1 saat) dışkı buz dolabında beklemeye alınır.

İnceleme amacına göre direkt inceleme (serum fizyolojik, metilen mavisi, lugol), Gram, EZN, trikrom boyama yapılabilir. Rutinde dışkıda parazitler, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* aranmalıdır. *Aeromonas spp*, *Vibrio spp.*, diğer her zaman rutinde aranmayan bir patojen kuşkusunda (*Yersinia enterocolitica*) laboratuvar özellikle uyarılır. *C. difficile* toksin A/B (LA, ELISA); rotavirus ve adenovirus antijenleri (LA, ELISA) dışkıda sık aranan diğer etkenlerdir.

Biopsi örnekleri

Değişik dokulardan körleme veya USG/BT altında biopsi ile doku örnekleri alınır. Alınan örnek anaerop taşıma koşullarına da dikkat edilerek steril bir nakil kabı içinde laboratuvara gönderilip hemen mikrobiyolojik incelemeye alınır. Biopsi ile veya ameliyat anında alınan doku parçaları (1 g kadar örnek) steril bir kaba konup laboratuvara gönderilir.

Alınan biopsi örneklerinden mikrobiyolojik incelemeyle birlikte histopatolojik inceleme de yapılır.

Deri ve yumuşak dokular

Primer deri hastalıklarında etken olarak genellikle virusler, *S. aureus*, *S. pyogenes*; cerrahi/travmatik yarada met-hicilline dirençli *S.aureus*, *Paeruginosa*; hayvan ısırıklarında *Pasteurella multocida*, *Capnocytophaga canimorsus* saptanır. Uygun örnek, aspirasyon sıvısı veya doku biopsisi örneğidir. Sellülitli bölge fizyolojik tuzlu su ile iyice yıkanır. İnflamasyonun belirgin olduğu kısımdan aspirasyonla örnek alınır. Örnek kısa sürede laboratuvara ulaştırılır. Yara sürüntüsü uygun örnek değildir; etken yerine kolonize bakteriler üreyip karışıklık nedeni olabilir. Açık lezyonlardan biopsi ile örnek almak uygundur.

Erizipelde, eritemli alanın sağlam deri kısmıyla birleşme kısmından enjektörle steril serum fizyolojik enjekte edip aspire edilir; üreme oranları yüksek değildir. Yanık enfeksiyonu, diyabetik ayak enfeksiyonunda bir cm³ deri parçası biopsiyle alınıp kantitatif kültür çalışılır; KOB > 10⁵/g ise enfeksiyon olarak yorumlanır. Fistüllerden gelen akıntıdan değil, küretaj veya biopsi örnekleri tercih edilmelidir. Meningokoksemi peteşilerinden kanamaya neden olmaksızın alınan örnekte bakterileri görmek ve üretmek mümkündür. Bakteriyemi veya fungemiye bağlı deri döküntüsünden biopsi yaparak örnek alıp incelemek uygundur.

Kemik

Osteomyelit kuşkusunda subperiosteal veya metafizyel iğne aspirasyonu yapılır; aynı zamanda hemokültür alınır. Kronik osteomyelitte örnek kemiğin debridmanı esnasında alınır.

Ekleme sıvısı

Septik artritte, iğne aspirasyonu ile eklem sıvısı alınıp hücre sayımı yapılır, Gram ve EZN boyanır; bekletmeden aerob, anaerob, gereğinde mikobakteriler veya mantarlar için çalışılır.

KAYNAKLAR

1. Andremont A. The past, present and future of the clinical microbiology laboratory. In: Armstrong D, Cohen J(eds). Infectious Diseases, Vol 1, London: Mosby, 1999: 1.3.1-3.8.
2. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 3.baskı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2002:205-286 ve 309-418.
3. Englund KA, Peterson LR. Laboratory evaluation of infectious diseases. In:Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR(eds). The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997: 527-47.
4. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 12.eds, Mosby Elsevier, Missouri, 2007.
5. Maher M, Glennon M. Nucleic acid-based diagnos-

tics: past, present, and future. Clin Lab Int 2001;25:10-11.

6. Mahony JB, Chernesky MA. Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH(eds), Manual of Clinical Microbiology, 7th ed, American Society for Microbiology, Washington,D.C., 1999:202-214.
7. Mert A, Tabak F, Aktuglu Y. Eosinophilia in toxic shock syndrome: review of 20 cases. Scand J Infect Dis 1998;30:320.
8. Miller JM, Holmes HT. Specimen collection, transport and storage, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH(eds), Manual of Clinical Microbiology, 7th ed, American Society for Microbiology, Washington,D.C., 1999:33-63.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology, Third ed, St. Louis, Mosby, 1998: 136-49 ve 169-74.
10. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9.th eds, ASM Pres, Washington D.C., Vol.1.
11. Öztürk R. Enfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısı. (İN) İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S. (eds) İç Hastalıkları. Cilt 2. Güneş Kitabevi, Ankara 2003; 2931-2949.
12. Reisner BS, Woods GL, Thomson RB Jr, Larone DH, Garcia LS, Shimizu RY. Specimen processing, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH(eds), Manual of Clinical Microbiology, 7th ed, American Society for Microbiology, Washington,D.C., 1999:64-104.
13. Storch GA. Diagnostic virology. Clin Infect Dis 2000, 31:739-751.
14. Unat EK. Temel Mikrobiyoloji. 3.baskı, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayını, İstanbul, 1997:461-497.
15. Tang YW, Persing DH. Molecular detection and identification of microorganisms, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH(eds), Manual of Clinical Microbiology, 7th ed, American Society for Microbiology, Washington,D.C., 1999:215-244.
16. Vernet G. DNA-chip technology and infectious diseases. Virus Res 2002; 82:65-71.
17. Wilson ML. General principles of specimen collection and transport. Clin Infect Dis 1996; 22:766-77.
18. Yazıcı H. Hastalıkların sıklığını bilmek neden önemli? Hamuryudan V, Öztürk R (ed.) Türkiye'de Sık Rastlanan Hastalıklar. I CTF STEE No: 55. 2007
19. Yenen OŞ. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan laboratuvar yöntemleri. Serter D, Ertem E, Gökengin D(eds), Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000: 18-36.