KLIMUD REHBERLERİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için



STERİL VÜCUT SIVILARI LABORATUVAR İNCELEME REHBERİ

2. Baskı, 2020 / ANKARA
KLİMUD-SVS.REH.10/20.Ver02

Bu Rehber Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD) tarafından hazırlatılmış olup Rehberin her türlü yayın, basım ve dağıtım hakkı KLİMUD'a aittir. KLİMUD'un yazılı izni olmadan Rehberin tümü ya da bir bölümü herhangi bir ortamda yayınlanamaz ve/veya çoğaltılamaz. Ancak kaynak gösterilerek kısa alıntılar yapılabilir. Rehber ilgili kişi ve kurum/kuruluş için hazırlanmış olup ücretsizdir ve para ile satılamaz.

Ağustos 2020, Ankara

ISBN: 978-605-84108-3-1

KLİMUD Kaynak No: 5

Düzeltilmiş 2. Baskı

KLİMUD-SVS.REH.10/20.Ver02

Kapak deseni: Trans-Isolate medium*

* *Kaynak:* World Health Organization and Center for Diseases Control and Prevention (2011). Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2nd ed. WHO/IBV.11.09



REHBER KOORDİNASYON KURULU (RKK)

Efsun AKBAŞ (Başkan)
Duygu FINDIK
Aydan ÖZKÜTÜK
Serap SÜZÜK YILDIZ
Ayşın ZEYTİNOĞLU

STERİL VÜCUT SIVILARI ÖRNEKLERİNİN LABORATUVAR İNCELEMESİ REHBERİ ÇALIŞMA GRUBU*

Başkan
Duygu FINDIK

Yazıcı Üyeler
Gülçin BAYRAMOĞLU
Berna GÜLTEKİN KORKMAZGİL
Nilgün KAŞİFOĞLU
İpek MUMCUOĞLU
Hatice TÜRK DAĞI

Uygulayıcı Üyeler
Ekin ERYILMAZ

Klinisyen Üyeler
Şerefnur ÖZTÜRK
Şebnem ERDİNÇ

KLİMUD REHBERLERİ GÖZDEN GEÇİRME KURULU (GGK)

Gülay AKARSU
Şöhret AYDEMİR
Neriman AYDIN
Gülendam BOZDAYI
Gülden ÇELİK
Feriha ÇİLLİ
Melek DEMİR
Neşe GÖL
Demet HACISEYİTOĞLU
Süleyha HİLMİOĞLU POLAT
Nedret KOÇ
Dilek METİN
Özlem MİMAN
Betigül ÖNGEN
Tuncer ÖZEKİNCİ
Arzu SAYINER
Cemile SÖNMEZ
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU
Burçin ŞENER

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

Teşekkür…

KLIMUD Rehberleri doğası gereği güncellemeler yapılan dokümanlardır ve her güncelleme önceki baskılara katkıları geliştirmekte, genişletmektedir. İlk baskıların yayınlanmasından bu yana alanımızdan birçok bilim insanı bu çok önemli çalışmaya katkıda bulunmuştur.

RKK olarak, aşağıda adı geçen değerli uzmanlara, 'Steril Vücut Sıvıları Laboratuvar İnceleme Rehberi'nin önceki baskılarının koordinasyonunda, okunmasında, değerlendirilmesinde ve laboratuvarda uygulamanın test edilmesinde verdikleri katkılardan dolayı şükranlarımızı sunuyoruz.

Hakan ABACIOĞLU, Ali ADİLOĞLU, Sebahat AKSARAY, Mehmet BAYSALLAR, Selda ERENSOY, Berrin ESEN, Pınar ZARAKOLU KÖŞKER, Belkıs LEVENT, Cüneyt ÖZAKIN, Ayşe Rüveyda UĞUR, Sevinç ŞEN

İçindekiler

Bu Rehberi nasıl kullanacaksınız? viii
Kısaltmalar ve tanımlar ix
Anahtar kelimeler / Key words ix
Biyogüvenlik uygulamaları x

BÖLÜM 1 - BEYİN-OMURİLİK SIVISI 1

Giriş 1
Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi 1
Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri 3
Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi 3
- Makroskopik inceleme 4
- Hücre sayımı 4
- Santrifüj 5
- Gram boyama 5
- Çini mürekkebi yöntemi 5
- Aside dirençli boyama 5
- Kültür 5
- Antijen tarama testi 6
- Antikor tarama testi 6
- Moleküler yöntemler 8

Ara raporlar ve panik değerler 9
Sonuçların raporlanması 9
Referans laboratuvara başvurulması önerilen durumlar 9
İş akış şeması 10
Kaynaklar 10

BÖLÜM 2 - EKLEM SIVISI 13

Giriş 13
Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi 13
Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri 13
Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi 16
- Makroskopik inceleme 16
- Hücre sayımı 16
- Gram boyama 16
- Kültür 17
- Serolojik testler 17
- Moleküler testler 17

Ara raporlar ve panik değerler 18
Sonuçların yorumlanması 18
Sonuçların raporlanması 19
İş akış şeması 20
Kaynaklar 21

BÖLÜM 3 - PERİKARD SIVISI 23

Giriş 23
Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi 23
Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri 24

Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi ... 24
Makroskopik inceleme ... 24
Hücre sayımı ... 24
Santrifüj ... 24
Gram boyama ... 25
Diğer boyama teknikleri ... 25
Kültür ... 26
Diğer yöntemler ... 27

Ara raporlar ve panik değerler ... 28
Sonuçların raporlanması ... 28
İş akış şeması ... 29
Kaynaklar ... 29

BÖLÜM 4 - PLEVRA SIVISI ... 31

Giriş ... 31
Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi ... 32
Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ ret ölçütleri ... 32
Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi ... 33
Makroskopik inceleme ... 33
Hücre sayımı ... 33
Santrifüj ... 33
Gram boyama ... 34
Diğer boyama teknikleri ... 34
Kültür ... 34
Diğer yöntemler ... 35

Ara raporlar ve panik değerler ... 37
Sonuçların raporlanması ... 37
İş akış şeması ... 38
Kaynaklar ... 39

BÖLÜM 5 - PERİTON VE PERİTON DİYALİZİ SIVISI ... 41

Giriş ... 41
Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi ... 43
Primer (spontan bakteriyel) peritonit ... 43
Sekonder peritonit ... 43
Tersiyer peritonit ... 43
Periton diyalizi ilişkili peritonit ... 43

Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri ... 43
Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi ... 44
Makroskopik inceleme ... 44
Gram boyama ... 44
Hücre sayımı ... 45
Diğer mikroskobik incelemeler ... 45
Periton sıvısının kültürü ... 46
Periton diyaliz sıvısının bakteri kültürü ... 46
Periton diyaliz sıvısının mikobakteri ve mantar kültürü ... 48
Moleküler yöntemler ... 48

Sonuçların yorumlanması ... 48
Ara raporlar ve panik değerler ... 49
Sonuçların raporlanması ... 50
İş akış şeması ... 50
Kaynaklar ... 51

BÖLÜM 6 - AMNİYON SIVISI 53

Giriş 53
Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi 53
Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri 53
Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi 53
Makroskopik inceleme 53
Santrifüj 53
Gram boyama 54
Kültür 54
Moleküler yöntemler 55

Ara raporlar ve panik değerler 55
Sonuçların raporlanması 55
İş akışı şeması 55
Kaynaklar 56

TABLOLAR

Tablo 1. BOS'ta bulunabilecek olası etken mikroorganizmalar 2
Tablo 2. BOS'ta bulunabilecek bazı etkenlerin yaş gruplarına göre dağılımı 2
Tablo 3. BOS incelemeleri için örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri 2
Tablo 4. BOS ile ilişkili etkenlerin biyogüvenlik risk gruplarına göre sınıflandırılması 4
Tablo 5. BOS normal değerleri ve çeşitli menenjit tiplerinde izlenen değişimler 4
Tablo 6. Etken türüne göre BOS örnekleri için kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları 6
Tablo 7. BOS'ta bulunan olası etkenler için önerilen tanı yöntemleri 7
Tablo 8. Bakteriyel menenjit tanısında kullanılan bazı yöntemlerin duyarlılık değerleri 8
Tablo 9. BOS'ta bazı viral etkenlerin tanısında PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllük değerleri 8
Tablo 10. Eklem enfeksiyonlarında klinik örnek tipleri ve olası etken mikroorganizmalar 14
Tablo 11. Belirli yaş gruplarında daha sık görülen septik artrit etkenleri. 14
Tablo 12. Belirli durumlarda daha sık görülen enfeksiyöz artrit etkenleri. 15
Tablo 13. Eklem sıvısı örneklerinin alınması, taşınması ve kabul/ret ölçütleri. 15
Tablo 14. Eklem sıvısının makroskopik, mikroskobik ve biyokimyasal özellikleri 15
Tablo 15. Eklem sıvısı örneklerinin mikroskobik incelemeler ve kültür için işlenmesi 18
Tablo 16. Septik artrit tanısında Gram boyamanın ve kültürün duyarlılığı 19
Tablo 17. Perikardit ve miyokarditte sık görülen etkenler* 23
Tablo 18. Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri 25
Tablo 19. Perikard sıvısı örneklerinin ekildiği besiyerleri ve inkübasyon koşulları 26
Tablo 20. Perikardit ve miyokardit etkenleri için önerilen tanı yöntemleri 27
Tablo 21. Plevra sıvısında bulunabilecek olası etkenler 31
Tablo 22. Plevra sıvısı örneklerinin alınması, taşınması, kabul/ ret ölçütleri 33
Tablo 23. Plevra sıvısı örneklerinin ekildiği besiyerleri ve inkübasyon koşulları 35
Tablo 24. Plevra sıvısında bulunan etkenler için önerilen tanı yöntemleri 36
Tablo 25. Periton ve periton diyaliz sıvısında bulunabilecek olası etkenler 42
Tablo 26. Periton sıvısı örneklerinin alınması, taşınması ve ret ölçütleri 44
Tablo 27. Asit sıvısının ayırıcı tanısı 45
Tablo 28. Periton ve periton diyaliz sıvısı örneklerinin işlenmesi 47
Tablo 29. Periton sıvılarında bulunan olası etkenler için önerilen tanı yöntemleri 48
Tablo 30. Amniyon sıvısında bulunabilecek olası etkenler 54
Tablo 31. Amniyon sıvısı örneklerinin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri 54
Tablo 32. Amniyon sıvısı için kültür besiyerleri ve inkübasyon koşulları 54

Bu Rehberi nasıl kullanacaksınız?

KLIMUD Rehberleri'nin amacı Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlarımıza, örnek alınmasından raporlama aşamasına kadarki tüm süreçlerin yönetilmesinde yardımcı kaynak olmaktır.

Bu Rehber tanı amacıyla laboratuvara gönderilen 'steril vücut sıvıları' incelemeleri için Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarlarının günlük uygulamalarında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Rehberin; örneklerin alınması, laboratuvara gönderilmesi, laboratuvarda işlenmesi, kültürlerin değerlendirilmesi, sonuçların yorumlanması ve raporlanması konularında Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlarına yol gösterici olması hedeflenmiştir. Metinler okuyucunun kolayca bilgiye ulaşmasını gözeten tablolar ve algoritmalar ile desteklenmiştir. Rehberin; uzmanın doğru ve hızlı sonuç verebilecek, sağlık hizmeti kalitesini artıracak ve maliyet etkin uygulamaları gözetecek bir yaklaşımı geliştirmesine destek olacağı da umut edilmektedir.

Bölümler içerisinde yer alan "**bilgi notları**" konu ile ilgili olarak bilinmesi gereken en önemli noktalara, "**uyarı**" kutucukları ise özellikle uygulamada dikkatli olunması gereken süreçlere vurgu yapmakta olup, bu amaçla tüm Rehberde aşağıda yer alan simgeler kullanılmaktadır.

Rehberde "Biyogüvenlik Uygulamaları"na ise kısaca -steril vücut sıvıları ile çalışan bir laboratuvar için öncelikli güvenlik önlemlerini hatırlatıcı düzeyde- yer verilmiştir. Laboratuvarlar yürüttükleri çalışmaların tüm kapsamı için *risk analizi temelinde* uygun biyogüvenlik önlemlerini almak üzere daha fazla bilgiye "UMS(2014)-Laboratuvar Güvenliği Rehberi" ve konuya özel diğer kaynaklardan ayrıca ulaşmalıdır.



Bilgi simgesi
İlgili örnek ve/veya enfeksiyon hakkında mutlaka bilinmesi gereken bilgi



Uyarı-dikkat çekme simgesi
Önemli mesajlar/uygulamalar



Raporlama simgesi
İlgili örneğin raporlanmasında kullanılan farklı şablonlar

Kısaltmalar ve tanımlar

ADT	antimikrobiyal duyarlılık testi
APD	aralıklı periton diyalizi
ARB	aside dirençli basil/boyama (aside-rezistan basil/boyama) (acid-fast stain)
BGD	biyogüvenlik düzeyi
BGK	biyogüvenlik kabini
BOS	beyin omurilik sıvısı
cfu	colony forming unit (koloni oluşturan birim)
CMV	cytomegalovirus
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DFA	direkt floresan antikor
DNA	deoksiribonükleik asit
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	etilen diamin tetra asetik asit
EMB	eosin methylene blue
EZN	Ehrlich-Ziehl-Neelsen (boyama)
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HIV	human immune deficiency virus
HHV6	human hespes virus 6
HSV	herpes simplex virus 1 ve 2 (HSV1, HSV2)
KNS	koagülaz negatif stafilokok
KOH	potasyum hidroksit
LJ	Löwenstein-Jensen (besiyeri)
LP	lomber ponksiyon
mL	mililitre
MNL	mononükleer lökosit
MRSA	metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
MSS	merkezi sinir sistemi
NAAT	nükleik asit amplifikasyon testi
PCR	polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PNL	polimorfonükleer lökosit
RNA	ribonükleik asit
RT-PCR	revers transkriptaz PCR
SAPD	sürekli ayaktan periton diyalizi
STA	standart tüp aglütinasyonu (testi)
SBP	spontan bakteriyel peritonit
SPS	sodyum polianetol sülfonat (sodium polyanethole sulfonate)
SSPD	sürekli siklik periton diyalizi
TB	tüberküloz
UMS	Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (2014) – Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (şimdiki adı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü) tarafından yayınlanmış olan, bulaşıcı hastalıkların tanısı için uygulama prosedürleri, laboratuvar güvenliği, enfeksiyöz madde transportu vb konularda standart yöntemleri ve algoritmaları içeren kaynak rehber doküman.
VLM	visceral larva migrans
VRE	vankomisine dirençli enterokok
VZV	varicella zoster virus

Anahtar kelimeler / Key words

amnyon sıvısı, beyin-omurilik sıvısı (BOS), eklem sıvısı, kateterizasyon, laboratuvar tanı, perikard sıvısı, periton sıvısı, periton diyaliz sıvısı, plevra sıvısı

amniotic fluid, cerebrospinal fluid (CSF), synovial fluid, catheterization, laboratory diagnosis, pericardial fluid, peritoneal fluid, peritoneal dialysis fluid, pleural fluid

Biyogüvenlik uygulamaları

Tanı amaçlı incelemeler için steril vücut sıvıları ile çalışırken laboratuvar personelinin karşı karşıya olduğu **en ciddi risk** kan ve benzeri diğer vücut sıvıları ile bulaşabilen patojenlerin (HIV, hepatit B…) bulaşma riskidir. İşlemler asgari **biyogüvenlik düzeyi 2** (BGD2) laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmeli, eldiven, önlük -ve SARS CoV salgını gibi durumlarda ilave olarak maske ve göz korumasını da- içeren evrensel önlemler alınmalıdır.

Mikroaerosoller üretme potansiyeli ya da sıçrama/saçılma riski olan herhangi bir prosedür (*örn.,* örnekleri vorteksleme, örnek kapaklarının açılması, katalaz testi vb.) bir biyogüvenlik kabini içinde (BGK) gerçekleştirilmelidir. Özellikle aerosollerle bulaş potansiyeli yüksek olan mikroorganizmalar *Neisseria meningitidis* ve *Mycobacterium tuberculosis* şüpheli örneklerle ve bunların kültürleri ile ilgili tüm çalışmalar (yaymaların hazırlanması, santrifüj tüplerinin açılması, sonikasyon, besiyerlerine ekim, biyokimyasal ve moleküler testler…) BGK içinde yapılmalıdır.

Bütün örnekler, eğer **santrifüj** edileceklerse, kapaklı santrifüj rotorları veya örnek kapları kullanılmalı; rotorlar ve kaplar *ideal olarak* bir BGK içinde yüklenmeli ve boşaltılmalıdır. BGK dışındaki prosedürler kazara örnek saçılmasına maruz kalma riskini en aza indirecek şekilde gerçekleştirilmelidir. Örnekler işlendikten sonra her zaman çalışma yüzeyleri ve ekipman uygun bir dezenfektan ile dekontamine edilmelidir.

Mikroskopi için kullanılmış lamlar, çeşitli aktarma amaçları için kullanılmış pipet uçları ile kültürler için kullanılmış tek kullanımlık özeler **kesici-delici atık** kabul edilirler ve **kesici-delici atık kutusu**na atılırlar! Bu kutular delinmeye dayanıklı rijid çeperli, kapağı asla açılamaz, boşaltılamaz ve tekrar kullanılamaz özellikte (tek kullanımlık) olmalıdır. Gerçekte pipet uçları ve tek kullanımlık özeler insan cildi için kesici-delici nitelikte olmamakla birlikte, diğer biyolojik kirlilerin konduğu torbalara atılmaları halinde torbayı delerek ciddi enfeksiyöz risk doğurabilirler; bu nedenle kesici-delici atık kabına atılmalıdırlar!

Laboratuvarlar, BGD2 laboratuvar şartlarını sağlamak, çalışmalarının bütünü için *risk analizi temelinde* uygun önlemleri almak ve güvenli laboratuvar uygulamalarını her yönü ile hayata geçirebilmek için ayrıca "UMS(2014)-Laboratuvar Güvenliği Rehberi"ne başvurmalıdır!

BÖLÜM 1

BEYİN-OMURİLİK SIVISI

Giriş

Beyin-omurilik sıvısı (BOS) koroid pleksuslardan salgılanan, subaraknoid aralık ve ventriküllerde bulunan, araknoid villuslardan ve lomber bölgedeki damarlardan kana geri dönen plazma ultrafiltratıdır. Berrak ve renksiz bir sıvıdır. BOS'un analizi, santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tanı, ayırıcı tanı ve tedavilerinin izlenmesinde büyük öneme sahiptir.

Menenjit, beyni çevreleyen meninks zarlarının enflamasyonudur. Bu süreç akut, kronik; enfektif veya non-enfektif olabilir. Bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler menenjit etkeni olabilir. Ateş ve halsizlik gibi genel enfeksiyon belirtilerinin yanı sıra, şiddetli baş ağrısı, bulantı-kusma, ense sertliği ve diğer meningeal irritasyon bulguları (Kernig, Brudzinski bulguları) ortaya çıkar.

Akut bakteriyel menenjit acil bir tıbbi durumdur. Menenjitin belirti ve bulguları birkaç gün içinde gelişir ya da birkaç saat içinde hızlı bir başlangıç ve fulminan seyir gösterir. Tedavi edilmezse mortalitesi yüksektir. Viral (aseptik) menenjit genellikle iyi huyludur ve komplikasyonlar nadirdir.

Subakut bakteriyel menenjitte klinik seyir iki ya da üç gün içinde, subakut gelişir. Kronik menenjit meningeal enflamasyon belirti ve bulgularının bir ay veya daha uzun sürmesiyle karakterizedir. *Mycobacterium tuberculosis,* mantarlar ve spiroketler genellikle kronik menenjite neden olur.

Ensefalit beyin parankiminin enflamasyonudur ve sıklıkla menenjit ile birliktedir (meningo-ensefalit). Fokal nörolojik bulgular, davranış değişikliği, epileptik nöbetler ve giderek artan uyku hali sıktır. Yüksek ateş, baş ağrısı, bulantı-kusma olabilirse de ense sertliği ve diğer meningeal irritasyon bulguları yoktur ya da geri plandadır.

Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi

BOS normalde steril bir sıvıdır ve mikroorganizma bulunmaz, örnek alınırken kontamine olmamışsa saptanan bütün mikroorganizmalar etken kabul edilir. BOS'ta bulunabilecek olası etkenler ve yaş grubuna göre görülüş dağılımları **Tablo 1** ve **Tablo 2**'de verilmektedir.

Bakteriyel menenjitlerde olguların %80'inden *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* sorumludur ve BOS'u ilgilendiren enfeksiyonların kayda değer bir kısmını oluştururlar. Bu üçlü "bakteriyel invaziv hastalık etkenleri" şeklinde de sınıflanır ve Sağlık Bakanlığı'nın, potansiyel halk sağlığı sorunu olarak ele alıp 2016 yılında başlattığı sürveyans programı[1] dolayısı ile tanının güvenilirliği ayrıca önem kazanmıştır.

[1] *bkz.* Sağlık Bakanlığı "Aşı ile Önlenebilir İnvaziv Bakteriyel Hastalıklar Sürveyansı Genelgesi 2016/23"

Tablo 1. BOS'ta bulunabilecek olası etken mikroorganizmalar

Bakteri	Virüs	Mantar	Parazit
Neisseria meningitidis *Streptococcus pneumoniae* *Haemophilus influenzae* tip b *Escherichia coli* *Streptococcus agalactiae* *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus* Gram negatif basiller *Mycobacterium tuberculosis* *Treponema pallidum* *Brucella* spp. *Elizabethkingia meningoseptica* Anaerop bakteriler	Herpes simplex virus Enterovirüsler HHV6 HIV Dengue virus Influenza virus EBV JC polyomavirus Parvovirus B19 Kuduz virüsü Kızamık virüsü Kabakulak virüsü VZV Batı Nil ateşi virüsü CMV Adenovirus Rotavirus Lenfositik koryomenenjit virüsü Parechovirus	*Cryptococcus neoformans* *Candida* spp. Esmer mantarlar *Aspergillus* spp *Histoplasma capsulatum* *Coccidioides immitis*	*Acanthamoeba* spp. *Balamuthia mandrillaris* *Sappinia diploidea* *Naegleria fowleri* *Microsporidia* *Toxoplasma gondii* *Angiostrongylus cantonensis* *Taenia solium* *Echinococcus* spp. VLM etkenleri

Tablo 2. BOS'ta bulunabilecek bazı etkenlerin yaş gruplarına göre dağılımı

	Yaş grubu			
	Yenidoğan (<2 ay)	**2 ay-genç erişkin**	**Erişkin**	**60 yaş üstü**
Etkenler	*S. agalactiae* *E. coli* *L. monocytogenes* *N. meningitidis* Herpes simplex virus *Candida* spp	*N. meningitidis* *S. pneumoniae* *H. influenzae tip b* Virüsler (özellikle enterovirüsler)	*S. pneumoniae* *N. meningitidis* *H. influenzae* (tip b dışı) *Virüsler*	*S. pneumoniae* *L. monocytogenes* *Gram negatif basiller*

Tablo 3. BOS incelemeleri için örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Örnek alma yöntemi	Örnek kabı	Örnek miktarı	Taşıma süresi / sıcaklık*	Saklama süresi/sıcaklık	Ret ölçütleri
Usulüne uygun LP	Steril tüp	Konvansiyonel bakteriler için >1 mL	<15 dk, oda ısısı	<24 sa, oda ısısı	Yok
		Mantarlar için >2 mL			
		Mikobakteriler için >5 mL			
		Virüsler için >1 mL	<24 sa, +4°C	>24 sa, -80°C	
		Parazitler için >1 mL	<2 sa, oda ısısı	Yok	

* *H. capsulatum, C. immitis, B. dermatitidis* ve *A. fumigatus*'un soğuk ortamda canlılıklarını yitirdiklerine ilişkin az sayıda çalışma mevcuttur. *N. meningitidis* de soğuktan etkilenen bir mikroorganizmadır. Taşıma esnasında örneklerin aşırı atmosfer değerlerine (<18°C veya >37°C) veya güneş ışığına maruz kalmasına kesinlikle izin verilmemelidir. *Pratik olarak* BOS toplanır toplanmaz, mümkün olan en kısa sürede laboratuvara iletilmelidir.

Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

BOS örneklerinin alınması, taşınması ve kabul/ret ölçütleri **Tablo 3**'te özetlenmiştir.

Klinik örnek mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır.

BOS'un alınacağı bölge antisepsi kurallarına uygun olarak hazırlandıktan sonra örnek alınır. Bunun için bölge %70 etanol ile ve iyot çözeltisi (%1-2 iyot tentürü veya %10 povidon iyot) ile silinmelidir. İyot tentürü kullanılırsa işlem sonrasında %70 etanol ile tekrar silinmelidir.

Antisepsi sonrasında BOS örneği, omurganın L3-L4, L4-L5 veya L5-S1 aralığından LP yapılarak **üç adet** steril, sızdırmaz kapaklı tüpün her birine en az 1-2 mL olacak şekilde alınmalıdır. Alınabilen BOS örneği miktarı sonraki işlemleri belirler. Eğer BOS örneği tek tüp alındıysa, **önce** mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmelidir. Eğer birden fazla tüp örnek alınabilmiş ise **ikinci tüp** mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmelidir. BOS örnekleri kan kültür şişelerine de alınabilir.

Genel olarak -invaziv hastalık olasılığı nedeniyle- BOS kültürleri ile eşzamanlı olarak kan kültürü alınması da önerilir.

BOS 15 dk içerisinde oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örneğin alınması ile işlenmesi arasındaki süre en fazla 4 saat olabilir. Hastalığın nedeni olarak *N. meningitidis*'den şüpheleniliyorsa ve örneklerin işlenmesinde birkaç saatlik bir gecikme bekleniyorsa, BOS içeren tüplerin (vidalı kapaklar gevşetilmiş halde) %5 CO_2 atmosferinde (*örn.*, CO_2 gaz paketli jar veya bir mumlu jar) taşınması bakteri sağkalımını artırabilir.

BOS (virolojik incelemeler dışında) **asla** buzdolabına konmamalıdır!

BOS örneklerinden yüksek bir performans ile izolasyon ve identifikasyon yapılabilmesinde Trans-Isolate (T-I) besiyeri özel bir öneme sahiptir. T-I besiyeri hem BOS örneklerinin *uzak mesafeye taşınmasında* hem de *primer izolasyonda* kullanılan bifazik (yatık agar ve sıvı olmak üzere iki fazlı) bir besiyeridir ve bakteriyel menenjit sürveyansında DSÖ tarafından önerilmektedir.[1,2,3] Aynı gün laboratuvara nakil mümkün değilse, ~1mL BOS aseptik olarak bir T-I besiyeri şişesine (*yoksa* bir pediyatrik kan kültür şişesine) inoküle edilmeli; daha sonra gece boyunca 35°C'de tutulmalı ve/veya 24 saat içinde oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırılmalıdır. *Haemophilus influenzae* tip b (Hib) şüphesi varsa şişelere Isovitalex veya Vitox eklenmelidir.[1,3]

BOS örnekleri -virolojik çalışmalar dışında- **asla** buzdolabına konmamalı, örnek saklanacaksa oda ısısında tutulmalıdır. Virolojik çalışmalar yapılacaksa +4°C'de 24 saat, daha uzun süreler için -80°C'nin altında saklanabilir.

Taşıma sırasında sızdırmış kaplardaki örnekler işlenmeli, ancak bulaş olasılığı açısından klinisyen hekim uyarılmalıdır.[4] Sızdırmış örnek kaplarından çalışan personele enfeksiyöz bulaş riski akılda tutulmalı, daima uygun KKD kullanılıyor olmalıdır!

Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi

Tüm BOS örnekleri BGK içinde işlenmelidir. BOS incelemeleri için genel olarak BGD2 şartlarını karşılayan bir laboratuvar yeterli olmakla birlikte; ön tanıda M. tuberculosis gibi risk grubu 3'te yer alan etkenlerden şüpheleniliyorsa ve özellikle bunların kültürlerde üremiş izolatları ile çalışma yürütmek gerekiyorsa asgari BGD2+ laboratuvar şartları sağlanmalıdır (**Tablo 4**).

---

[2] T-I besiyeri yapılışı için *bkz.* UMS(2014) Cilt I, *Neisseria meningitidis, s.* 24.

[3] World Health Organization and Center for Diseases Control and Prevention (2011). Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, 2nd ed. WHO/IBV.11.09.

[4] *bkz.* UMS(2014) - Laboratuvar Güvenliği Rehberi s.15.

Tablo 4. BOS ile ilişkili etkenlerin biyogüvenlik risk gruplarına göre sınıflandırılması

Mikroorganizma	Risk grubu 2	Risk grubu 3	Risk grubu 4
Bakteri	*Borrelia burgdorferi* *Escherichia coli* *Haemophilus influenzae* *Leptospira interrogans* *Listeria monocytogenes* *Neisseria meningitidis* *Streptococcus pneumoniae* *Streptococcus agalactiae* *Treponema pallidum*	*Brucella* spp. *Mycobacterium tuberculosis*	
Mantar	*Candida* spp. *Cryptococcus neoformans*	*Coccidioides immitis* *Histoplasma capsulatum*	
Virüs	Enterovirüsler Herpes virüsler Kabakulak virüsü Parechovirus	Lenfositik koryomenenjit virüsü Dengue virus Batı Nil ateşi virüsü Japon ensefaliti virüsü Herpes simiae virus HIV Kuduz virüsü	Nipah virüsü Rus bahar-yaz ensefaliti virüsü Omsk kanamalı ateşi virüsü
Parazit	*Acanthamoeba* spp. *Balamuthia mandrillaris* *Sappinia diploidea* *Microsporidia* *Angiostrongylus cantonensis* *Taenia solium* *Echinococcus spp.* VLM etkenleri	*Naegleria fowleri*	

Tablo 5. BOS normal değerleri ve çeşitli menenjit tiplerinde izlenen değişimler

	Total protein (g/L)	Glikoz oranı (mg/dL)	Hücre sayısı (mm^3)	Hücre tipi
Normal değerler	<0.45	50-80	< 5	MNL
Bakteri menenjiti	Artar	Azalır	> 1000	PNL
Virüs menenjiti	Normal-Artar	Normal-Azalır	10-1000	MNL/PNL
Tüberküloz menenjiti	Artar	Azalır	< 1000	MNL
Mantar menenjiti	Artar	Normal-Azalır	1000-5000	MNL

Makroskopik inceleme

BOS'un rengi, bulanıklığı, kan veya pıhtı içerip içermediği kontrol edilip kaydedilmelidir. Bazı tüberküloz menenjit olgularında tipik bir 'örümcek ağı' görünümü olabilir, nadir görüldüğü için not edilmelidir.

Hücre sayımı

Lökosit ve eritrosit sayımı santrifüj edil**me**miş örneklerden, sayma lamı veya bu sayımı yapmaya uygun hemogram cihazları kullanılarak yapılır. Pıhtı içeren örneklerden sayım yapılmamalıdır. Çok kanlı örneklerde dilüsyon uygulanarak sayım yapılabilir. Hesaplamada dilüsyon oranı göz önüne alınmalıdır. Kanlı örneklerde BOS'ta lökosit artışı olup olmadığını anlayabilmek amacıyla hastanın BOS lökosit/eritrosit oranıyla, kan lökosit/eritrosit oranı karşılaştırılabilir. Hücre sayımı ile birlikte yapılan biyokimyasal değerlendirme menenjit etkenlerinin ön tanısına yardımcı olur (**Tablo 5**).

Santrifüj

BOS <1mL ise santrifüj edil**me**melidir. Biri yedek olmak üzere iki preparat hazırlanmalı ve kültür vasatlarına ekim yapılmalıdır (*bkz.* **Tablo 6**). Eğer örnek >1mL ise boyama ve kültür işlemleri için 1500×*g*'de 5-10 dk santrifüj edilir. BOS örneğinden 2-3 damla alınarak sitosantrifüj de yapılabilir. Mikobakteri tanısı için inceleme istenmişse, santrifüj 3000×*g*'de 15-20 dk yapılmalıdır. Üst sıvı, istek varsa biyokimyasal, viral ve serolojik çalışmalar için kullanılabilir. Dipteki çökelti çalkalanarak boyama ve kültür işlemleri yapılmalıdır. Parazit incelemesi için santrifüj edilmiş ve edilmemiş örneklerin ikisinden de direkt mikroskobik inceleme yapılmalıdır. Santrifüj edilmemiş örnekten bir damla 10× büyütme ile incelenir. Daha sonra örnek 100×*g*'de 10 dk çevrilir ve bir damla lam-lamel arasına konarak ameboid trofozoitler açısından incelenir.

Eğer santrifüj ya da sitosantrifüj olanağı yoksa lam üzerine bir damla örnek damlatılıp kuruduktan sonra **tekrar** damlatılarak ve böylece incelenecek örnek yoğunlaştırılarak Gram boyama yapılabilir!

Gram boyama

İki adet preparat hazırlanıp biri Gram yöntemi ile boyanmalı, diğeri saklanmalıdır. Lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi değerlendirilmelidir. Bakteriyel menenjit tanısı için Gram boyamanın duyarlılığı antimikrobiyal tedavi almamış hastalarda %60-80 ve tedavi alan hastalarda %40-60 arasındadır.

TB menenjitte kültürde üreme oranları %25-70 arasında bildirilmiştir. TB menenjit tanısı için PCR en duyarlı yöntemdir!

Çini mürekkebi yöntemi

C. neoformans menenjitinden şüphe ediliyorsa çini mürekkebi yöntemiyle kapsüllü, yuvarlak ve tomurcuklanan maya mantarı varlığı araştırılmalıdır. Yöntemin duyarlılığı yaklaşık %50'dir.

Aside dirençli boyama

Duyarlılığı düşük olmasına rağmen klinisyen tüberküloz menenjitten şüpheleniyorsa yapılmalıdır. Sonuç negatif ise ertesi gün yeni örnekle tekrarlanmalıdır.

Kültür

BOS örneklerinin işlenmesinde olası etkene göre seçilebilecek kültür besiyerleri **Tablo 6**'da, yapılabilecek diğer inceleme ve ek tanı yöntemleri de **Tablo 7**'de özetlenmektedir. Tanıda kullanılan bazı yöntemlerin duyarlılık değerleri **Tablo 8** ve **Tablo 9**'da görülebilir.

Bakteriyolojik ve mikolojik kültür için steril bir pipet ile çökeltiden önerilen besiyerlerine 2-3 damla inoküle edilmelidir (besiyerleri için *bkz.* **Tablo 6**). Tek koloni düşürmek için, inokulum steril bir öze ile yayılmalıdır. Yeterli inkübasyon süreleri sonunda incelenen kültür plaklarında üreme varsa üreyen bütün izolatlar tanımlanmalı ve ADT[5] uygulanmalıdır.

Pek çok virüs için hücre kültürü altın standart tanı yöntemi olmakla birlikte uygulamadaki zorluklar nedeniyle tercih edilmemektedir.

Parazit kültürü için BOS'un 100×*g*'de 10 dk santrifüj edilmesini takiben çökeltiden alınan 2 damla örnek, önceden yüzeyine bakteri (*E. coli, Klebsiella* spp. veya *E. aerogenes*) ekilmiş agar plağına damlatılır; inkübe edilip izlenir.

[5] ADT uygulamaları için *bkz.* UMS(2014) Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi **Cilt II**; Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antijen tarama testi

Bakteri menenjiti olgularında BOS'ta hızlı antijen tarama testlerinin rutin olarak yapılması önerilmez. Ancak immün yetmezliği olan nötropenik hastalar, BOS analizi öncesi antibiyotik tedavisi alanlar ile Gram boyama ve kültür sonucu negatif olan hastalarda yararlı olabilir.

Kriptokok antijen testi, şüpheli kriptokoksik menenjit olgularında ve immün sistemi baskılanmış menenjitli hastalarda yapılmalıdır. Testin duyarlılığı tedavi almamış hastalarda serumda %100, BOS'ta %98 civarındadır.

Antikor tarama testi

Nörobruselloz tanısında BOS'tan etkeni izole etmek zor olduğu için tanıda antikor testleri (Rose Bengal, STA, Coombs'lu Brusella) kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda BOS'da geleneksel kültürün duyarlılığı %14-15, otomatize kan kültürü şişesine ekim yapıldığında %25, Rose Bengal testinin %31-71, STA'nın %71-79 ve Coombs testinin %94 olarak saptanmıştır. MSS'nin etkilenmediği bruselloz olgularında BOS'ta antikor saptanmaz.

Mantarların *(C. neoformans, C. immitis ve H. capsulatum)* etken olduğu menenjitlerin tanısında, BOS dışı örneklerde kültür ve serolojik testler önerilir. Kültürde siklohekzimit-içer**me**yen SDA kullanılmalıdır.

H. capsulatum tanısında kan, kemik iliği ve idrar örnekleri kullanılırken kriptokokkoz tanısında kan ve prostat masajı ile alınan prostat sıvısı kullanılır!

Nörosifiliz tanısında BOS'ta non-treponemal testler (VDRL), *B. burgdorferi, L. interrogans, H. capsulatum, C. immitis* enfeksiyonlarında BOS'ta antikor testleri önerilmektedir.

Viral menenjitlerde serolojik testler tanıda yardımcıdır, artan titreler veya serumda IgM saptanması özgül tanıyı destekler. **BOS antikor indeksinin** belirlenmesi de kızamık, kızamıkçık, HSV, VZV, CMV, HIV, *Toxoplasma* ve *Borrelia*'nın etken olduğu menenjitlerde tanıda yardımcıdır. BOS antikor indeksi, BOS'taki spesifik antikor miktarının kandaki spesifik antikor miktarına bölünmesi ile hesaplanır. Bu değerin 0.7-1.4 arasında olması normal olarak kabul edilirken; 1.5 ve üzerinde olması merkezi sinir sisteminde lokal spesifik bir antikor sentezini gösterir.

Tablo 6. Etken türüne göre BOS örnekleri için kullanılan besiyerleri ve inkübasyon koşulları

Etken mikroorganizmalar	Besiyerleri	İnkübasyon			Değerlendirme sıklığı
		Sıcaklık	Ortam	Süre	
Bakteriler	Koyun kanlı agar	35-37°C	%5-10 CO_2	72 saat	Günlük
	Çikolata agar				
	Kan kültürü şişesi (otomatize sistem)		Aerop ortam	5-7 gün	Otomatik sistem tarafından yapılır
	LJ besiyeri			6 hafta	Günlük
Mikobakteriler	Sıvı besiyeri (otomatize sistem)				Otomatik sistem tarafından yapılır
Mantarlar	Sabouraud-dekstroz agar	26-30°C		3-4 hafta*	Günlük
	Beyin-kalp infüzyon agar	35-37°C			

* Bazı dimorfik mantarlarda bu süre 6 haftaya kadar uzayabilir.

Tablo 7. BOS'ta bulunan olası etkenler için önerilen tanı yöntemleri

Etken	BOS örnekleri için önerilen tanı yöntemi	Ek tanı yöntemi
*N. meningitidis**	Mikroskopi, kültür, PCR	Kan kültürü
*S. pneumoniae**		
*H. influenzae**		
S. agalactiae		
E. coli		
*L. monocytogenes**		
E. meningoseptica		
Anaerop bakteriler		
*M. tuberculosis***	ARB, kültür, PCR	Balgamda ARB, kültür, PCR
*T. pallidum**	VDRL, FTA-ABS, PCR	Serumda antikor arama testi
B. burgdorferi	Antikor arama testi, PCR	
Brucella spp.*	Rose Bengal, STA, Coombs'lu Brusella, kültür	Kan kültürü, serumda Rose Bengal, STA, Coombs'lu Brusella testleri
*L. interrogans**	Antikor arama testi, kültür, PCR	Serumda antikor arama testi, kültür
C. neoformans	Antijen testi, çini mürekkebi, kültür	Kan ve *C. neoformans* için gerektiğinde prostat sıvısı kültürü
Candida spp.	Mikroskopi, kültür	
C. immitis	Mikroskopi, kültür, antikor arama testi	
H. capsulatum		Kan, kemik iliği, idrar kültürü
Adenovirus	PCR/RT-PCR	PCR, virüs kültürü (plazma, boğaz sürüntüsü)
CMV		IgM (serum), virüs kültürü (kan, idrar, boğaz sür.)
Dengue virus		Virüs kültürü
Enterovirus		Virüs kültürü, RT-PCR (dışkı, boğaz sürüntüsü)
Parechovirus		
EBV		
Herpes simplex virus		
HIV*		Serumda antikor arama testi
HHV6		HHV6 IgM (BOS), PCR ve HHV6 IgM (serum)
Influenza virus*		Virüs kültürü (solunum yolu örneklerinde)
JC polyomavirus		
Kızamık virüsü*		IgM (BOS, serum), PCR (nazofarinks sür., idrar)
Kabakulak virüsü*		IgM, IgG (serum), virüs kültürü (tükürük, boğaz)
Parvovirus B19		IgM (BOS, serum)
Kuduz virüsü		Antikor (BOS, serum), RT-PCR ve DFA (tükürük ve deri biyopsisi)
VZV		IgM (BOS, serum)
Rotavirus		Antikor arama (serum), RT-PCR ve antijen (dışkı)
Batı Nil virüsü*	IgM, RT-PCR	IgM (serum), RT-PCR (kan ve idrar)
Acanthamoeba spp.	Direkt mikroskopi, kültür	
Balamuthia mandrillaris	Direkt mikroskobik inceleme	
Microsporidia	Modifiye trikrom, modifiye EZN, Kalkoflor beyazı ile boyama, PCR	
N. fowleri	Direkt mikroskobik inceleme	Modifiye trikrom boyama, modifiye EZN, Kalkoflor beyazı ile boyama, Uvitex 2B ile boyama, PCR
Sappinia diploidea	Direkt mikroskobik inceleme	
*T. gondii**	Direkt mikroskopi, PCR	Serumda IgG ve IgM arama

* Bunlar ülkemizde sürveyans programı kapsamında olan bildirimi zorunlu hastalık etkenlerdir. Bu hastalıkların/etkenlerin tanısı için standart prosedürler UMS (2014) **Cilt I**, **Cilt II** ve **Cilt III**'de yer almaktadır.

** *M. tuberculosis* tanısı için standart prosedürler UMS(2014) **Ulusal TB Tanı Rehberi**'nde yer almaktadır.

Tablo 8. Bakteriyel menenjit tanısında kullanılan bazı yöntemlerin duyarlılık değerleri

Etken	Duyarlılık %			
	Kan kültürü	BOS Gram boyama	Lateks aglütinasyon	PCR
N. meningitidis	40-60	30-89	22-93	88-94
S. pneumoniae	60-90	69-93	59-100	61-100
H. influenzae tip b	25-90	25-65	78-100	72-92
S. agalactiae	80-85	80-90		
L. monocytogenes	15-75	15-35		
S. aureus	75-100	20-44		

Tablo 9. BOS'ta bazı viral etkenlerin tanısında PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllük değerleri

Etken	PCR	
	Duyarlılık %	Özgüllük %
Cytomegalovirus	82-100	86-100
Enterovirus ve Parechovirus	> 95	> 95
Epstein-Barr virus	> 98.5	100
Herpes simplex virus	> 95	>95
HIV	> 95	>95
Human herpes virus 6	> 95	>94.1
JC Polyamavirus	50-75	98-100
Kuduz virüsü	100	100
Varicella zoster virus	80-95	>95

Moleküler yöntemler

Bakteri menenjitinden şüphelenilen hastaların BOS örneklerinde PCR'ın rutin kullanımı önerilir. Ancak mikroskopi ve kültür merkezi sinir sisteminin (MSS) bakteri enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısında hâlâ altın standarttır ve PCR onların yerine geçemez.

MSS'nin mantar enfeksiyonları tanısında; kriptokokkoz şüphesinde rutin yöntemlere ek olarak PCR yapılabilir, ancak *Histoplasma, Coccidioides* ve *Candida* türleri için rutin kullanımı öneril**me**mektedir.

Virüs menenjitlerinde PCR en sık tercih edilen tanı yöntemidir. HSV1 ve HSV2, enterovirus ve parechovirus, VZV, EBV, HHV6 ve CMV için PCR tekli ya da multipleks PCR şeklinde uygulanabilir. Multipleks PCR özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde ve BOS miktarının az olduğu durumlarda tercih edilebilir. Kullanılan PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü hakkında bilgi sahibi olunmalıdır. EBV, HHV-6 gibi virüsler için BOS'da PCR testinin kantitatif sonuç verecek şekilde yapılması, aktif ile latent enfeksiyonu ayırt etmede yardımcı olabilir.

Tek bir negatif PCR sonucu tanıyı her zaman ekarte ettirmez! Klinik bulgular devam ediyorsa yeni örnekle test tekrarlanmalıdır.

Virüs menenjitlerinin ilk 3 gününde veya 10. günden sonra alınan örneklerin yanlış negatif sonuç verebileceği unutulmamalıdır!

Şüphelenilen etken için mikroskopi, kültür ve serolojinin duyarlılığı düşükse, klinik şüpheye rağmen negatif sonuçlar alınıyorsa, hasta bağışıklığı baskılanmış bir birey ise, tanıda PCR yöntemi tercih edilmelidir.

BOS'un **mikroskobik incelemesinde** bir mikroorganizma görüldüğünde kültür sonucunu beklemeden **klinisyene hemen telefon ile** bildirilmelidir!

Ara raporlar ve panik değerler

BOS'ta mikroskobik incelemede herhangi bir mikroorganizma görülmesi, kültürlerde üreme olması ve antijen veya nükleik asit testlerinde pozitiflik saptanması **panik değerlerdir**. Mikroskobik incelemede, antijen veya nükleik asit testlerinde pozitiflik saptanması halinde kültür sonucunu beklemeden hemen kliniğe telefonla bildirilmeli ve hastane/laboratuvar bilgi sistemlerine raporlanmalıdır.

Sonuçların raporlanması

BOS incelemesi için RAPOR örneği – bulunması gereken parametreler

DİREKT İNCELEMELER	
Makroskopik görünüm:	Laboratuvara gelişte kaydedilen örneğe ait ilk makroskopik gözlem bulgusu (berrak, pürülan, hemorajik, vb.) bildirilir.
Hücre sayımı:	Eritrosit ve lökosit sayımı yapılarak mililitredeki (mL) değerleri verilmelidir.
Direkt mikroskopi:	Ameboid/trofozoit varlığı bildirilmelidir.
Gram boyama:	Lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi bildirilmelidir.
Çini mürekkebi yöntemi:	Kapsüllü, tomurcuklanan maya mantarı varlığı bildirilmelidir.
Aside dirençli boyama:	Aside dirençli basil varlığı bildirilmelidir.
KÜLTÜR	
Negatif sonuç:	"Üreme saptanmadı." şeklinde raporlanır.
Pozitif sonuç:	Bütün üremeler ADT sonuçlarıyla beraber bildirilmelidir.
MOLEKÜLER YÖNTEMLER	
Negatif sonuç:	"..... DNA/RNA'sı saptan**ma**dı." şeklinde raporlanır.
Pozitif sonuç:	"..... DNA/RNA'sı saptandı." şeklinde raporlanır.

Referans laboratuvara başvurulması önerilen durumlar

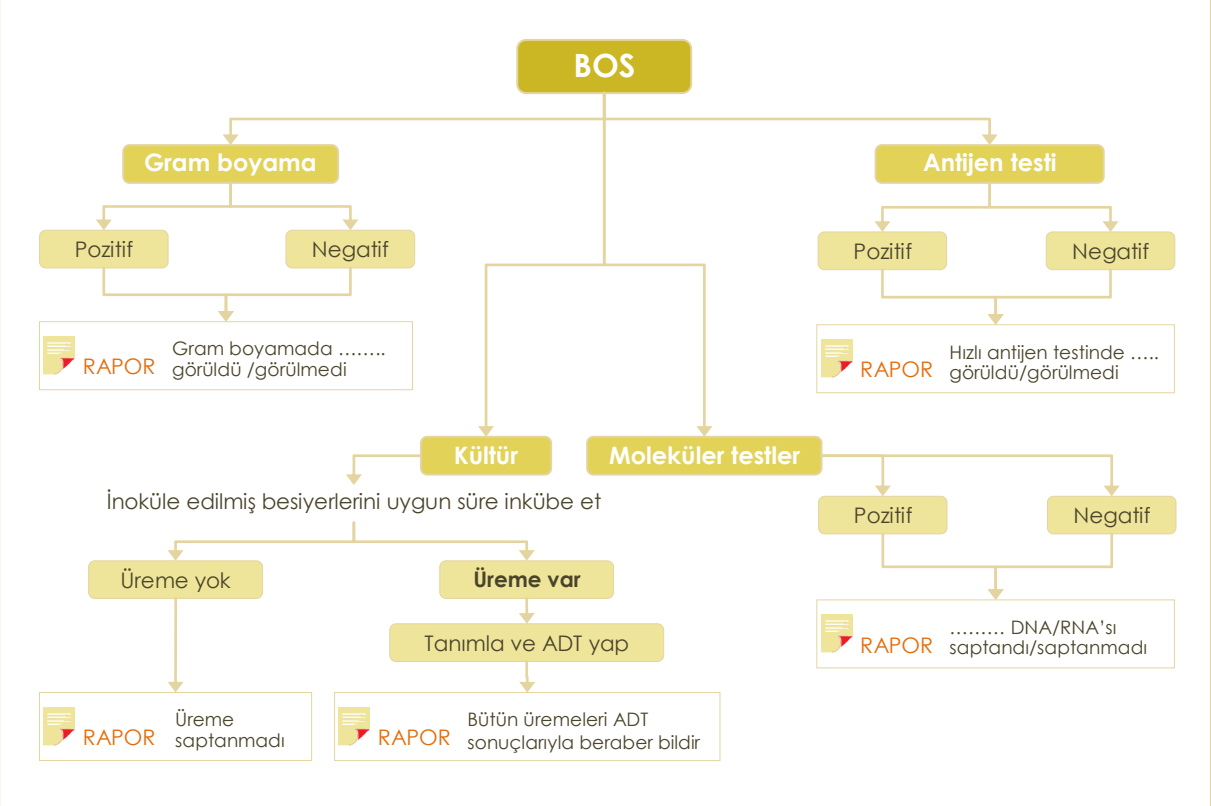
- *N. meningitidis, H. influenzae, S. pneumoniae*[1,6], *Listeria* spp., beta-hemolitik streptokoklar; serotiplendirme amacıyla,
- Kültürde üremenin olmadığı ancak meningokoksik menenjit şüphesi devam eden olgularda BOS, serum ve EDTA'lı plazma örnekleri

[6] Sağlık Bakanlığı *N. meningitidis, H. influenzae, S. pneumoniae* için "Bakteriyel İnvaziv Enfeksiyonlar" sürveyansı yürütmekte olduğundan izolatların antijenik tiplendirme için Referans veya yetkilendirilmiş laboratuvarlara gönderilmesi önemlidir!

- *Mycobacterium* spp. ve mantarlar ileri tanımlama ve ADT için,
- Beklenmedik ya da nadir antimikrobiyal direnç paterni gösteren suşlar doğrulamak için,
- Arbovirus enfeksiyonlarının tanısı için,
- Salgına neden olan suşlar,

Referans laboratuvarlara uygun paketleme yöntemleriyle gönderilmelidir.

İş akış şeması



Kaynaklar

1. ARUP Consult®. Infectious encephalitis. Erişim t: 18 Mayıs 2020. https://arupconsult.com/content/encephalitis-infectious
2. Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, Hinds J, Al-Ghusein H, Vass K, Butcher PD. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J Clin Microbiol* 2004;42:5811-8.
3. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 2010;23: 467–492.
4. Cinque P, Vago L, Dahl H, Brytting M, Terreni MR, Fornara C, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS* 1996;10:951-8.
5. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization 2006. WHO/CDS/EPR/2006.7. Erişim t: 18 Mayıs 2020. http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf
6. Debiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:903-25

7. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, et al. Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: Gilhus NE, Barnes MP, Brainin M (eds). European Handbook of Neurological Management. 2nd ed. Oxford (UK): Wiley-Blackwell; 2011. p. 5-17.
8. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, Sellebjerg F; EFNS Task Force Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2006;13:913-22.
9. Erdem H, Kilic S, Sener B, Acikel C, Alp E, Karahocagil M, et al. Diagnosis of chronic brucellar meningitis and meningoencephalitis: the results of the Istanbul-2 study. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(2):E80-6.
10. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Meningitis and other infections of the central nervous system. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2007: Chapter 55: 822-31
11. Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2010.
12. Gul HC, Erdem H, Bek S. Overview of neurobrucellosis: a pooled analysis of 187 cases. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(6): e339-43.
13. Guven T, Ugurlu K, Ergonul O, Celikbas AK, Gok SE, Comoglu S, et al. Neurobrucellosis: clinical and diagnostic features. *Clin Infect Dis* 2013;56(10):1407-12.
14. Health Protection Agency (2014). Investigation of viral encephalitis. UK Standards for Microbiology Investigations. V 43, Issue 2.3. Erişim t: 18 Mayıs 2020. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344210/V_43i2.3.pdf
15. Health Protection Agency (2017). Investigation of cerebrospinal fluid. UK Standards for Microbiology Investigations. B 27, Issue 6.1. Erişim t: 10 mayıs 2020. https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-27-investigation-of-cerebrospinal-fluid
16. Health Protection Agency (2017). Investigation of specimens other than blood for parasites. UK Standards for Microbiology Investigations. B 31, Issue 5.1. Erişim t: 18 Mayıs 2020. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/622944/B_31i5.1.pdf
17. Health Protection Agency (2018). Investigation of specimens for *Mycobacterium* species. UK Standards for Microbiology Investigations. B 40, Issue 7.2. Erişim t: 10 mayıs 2020. https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-40-investigation-of-specimens-for-mycobacterium-species
18. Karcher DS, McPherson RA. Cerebrospinal, synovial, serous body fluids, and alternative specimens. In: McPherson RA, Pincus MR (eds). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
19. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Uptade by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis* 2018;67(6):813-816.
20. Mount Sinai Hastanesi Klavuzu. Erişim t: 10 Mayıs 2020. https://eportal.mountsinai.ca/Microbiology/manual/sfld/mi_sfld.pdf
21. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA . Manual of Clinical Microbiology. (Çeviri ed Başustaoğlu A. Klinik Mikrobiyoloji), 9th ed. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009.
22. Sağlık Bakanlığı, Performans Yönetimi Kalite Geliştirme Daire Başkanlığı. Hastane Hizmet Kalite Standartları. Ankara. 2011.
23. Schubert J, Weissbrich B. Detection of virus-specific intrathecally synthesised immunoglobulin G with a fully automated enzyme immunoassay system. *BMC Neurol* 2007 29;7-12.
24. Steiner I, Schmutzhard E, Sellner J, Chaudhuri A, Kennedy PGE. EFNS-ENS guidelines for the use of PCR technology for the diagnosis of infections of the nervous system. *Eur J Neurol* 2012;19:1278-97.
25. Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:386-390.
26. Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. UK: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 92-5.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

BÖLÜM 2

EKLEM SIVISI

Giriş

Eklem sıvısı, eklem boşluğunda bulunan, eklem dokularından salgılanan yüksek molekül ağırlıklı, sakkaritten zengin molekülleri (özellikle hyalüronik asit) içeren plazma ultrafiltratıdır. Normal koşullarda viskozitesi yüksek, açık sarı renkte ve şeffaf görünümdedir.

Eklem sıvısı, olağan şartlarda her eklemde az miktarda (eklem boyutuna göre 0.1-3.5 mL) bulunur, eklem kıkırdaklarının hareketini kolaylaştırır ve beslenmesini sağlar. Eklemi etkileyen non-enflamatuvar, enflamatuvar ya da enfeksiyöz nedenlere bağlı olarak miktarı artabilir.

Enfeksiyöz artritler özellikle altta yatan romatoid artrit ya da eşlik eden diğer hastalıkların varlığında, protez takılan hastalarda, immün yetmezlik durumlarında ve ileri yaştaki hastalarda ciddi seyredebilmekte ve hayatı tehdit edebilmektedir.

Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi

Eklem sıvısı normalde steril bir sıvıdır ve mikroorganizma içermez. Örnek alınırken kontamine olmamışsa, saptanan bütün mikroorganizmalar etken kabul edilmelidir.

Enfeksiyöz artritlerde etken sıklıkla bakteriler, bazen virüsler ve mantarlardır (**Tablo 10**). Bazı bakteriler (*Chlamydia, Salmonella, Shigella, Campylobacter* ve *Yersinia* türleri) ve parazitler (protozoon ve helmintler) enfeksiyon sonrası reaktif artrite yol açabilirler. Bu durumda eklem sıvısında mikroorganizma saptanamaz.

Bakteriyel artritler süpüratif, piyojenik ve septik artrit olarak da adlandırılır. Bu tablo eklemde hızlı gelişen hasara ve geri dönüşü olmayan fonksiyon kaybına yol açabildiğinden tıbbi acil durumlar arasında yer alır. Akut bakteriyel artritlerde %80-90 oranında tek eklem tutulumu vardır ve tutulan çoğunlukla diz eklemidir. Septik artrite yol açan mikroorganizmalar arasında *S. aureus* ilk sırada olmakla beraber belirli yaş gruplarında (**Tablo 11**) ya da eşlik eden durum/hastalıklarda (**Tablo 12**) diğer patojenler de saptanabilmektedir.

Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Eklem sıvısı örneklerinin alınması, taşınması ve kabul/ret ölçütleri **Tablo 13**'de özetlenmektedir. Hastanın demografik bilgileri, örneğin alındığı tarih/saat, anatomik bölge ve hastanın ön tanısı kaydedilmelidir. Travma, önceki cerrahi ya da enfeksiyon öyküsü ya da gonokok, klamidya türleri gibi patojenler düşünüldüğünde belirtilmelidir.

Eklem sıvısı sıklıkla proteinözdür, pıhtı içerebilir. Asetik asit ya da proteinleri yıkabilecek diğer sıvılar hücresel incelemeyi engelleyeceğinden örneğe eklen**me**melidir.

Alınan örnek yeterli miktarda ise hasta başında 10'ar mL aerop ve anaerop kan kültürü şişelerine ekilir. Kalan eklem sıvısı laboratuvara gönderilirken aşağıdakilerden biri seçilebilir.

a. Örnek, koruyucu içermeyen bir steril örnek tüpüne konabilir ancak pıhtılaşma olabileceğinden sodyum heparin ya da SPS içeren tüpe alınması tercih edilir. Bazı mikroorganizmalar uzun süre bekletilirse SPS ile inhibe olabilirler. EDTA ya da sitratın inhibitör etkisi fazla olduğundan kültür istenen örneklerde kullanıl**ma**maları gerekir.

b. Anaerop taşıma tüpleri (az miktardaki örnekler için)

Tablo 10. Eklem enfeksiyonlarında klinik örnek tipleri ve olası etken mikroorganizmalar

Enfeksiyon hastalığının adı	Örnek türü	Olası etkenler		
		Bakteri	Virüs	Mantar
Akut artrit	Eklem sıvısı	*S. aureus* *Staphylococcus lugdunensis* *Streptococcus* spp. *Enterobacterales* *Pseudomonas* spp. *Kingella kingae* *Neisseria gonorrhoeae** *Brucella* spp.*	Parvovirus B19 Rubella*	
Subakut veya kronik artrit		*Borrelia burgdorferi** Atipik mikobakteriler *Mycobacterium tuberculosis**	Chikungunya virus*	*Candida* spp. *C. neoformans* *Blastomyces dermatitidis* *Aspergillus* spp *Coccidioides immitis* *Histoplasma capsulatum* *Fusarium* spp.
Proteze bağlı eklem enfeksiyonu	Eklem sıvısı, doku biyopsisi, çıkarılan protez	*S. aureus*, KNS *Enterococcus* spp. *Streptococcus* spp. Aerobik Gram negatif basiller *Corynebacterium* spp. *Propionibacterium acnes* Diğer anaeroplar (*Cutibacterium acnes*, *Finegoldia magna*) Polimikrobiyal		
Septik bursit	Bursa sıvısı	*Staphylococcus aureus*		

* Bunlar ülkemizde sürveyans programı kapsamında olan bildirimi zorunlu hastalık etkenlerdir. Bu etkenlerin tanısı için standart prosedürler UMS(2014) **Cilt I**, **Cilt II** ve **Cilt III**'de yer almaktadır.

Tablo 11. Belirli yaş gruplarında daha sık görülen septik artrit etkenleri.

Yaş grubu	Etkenler
Yenidoğanlar	B grubu streptokoklar, Gram negatif enterik basiller
<5 yaş	*Kingella kingae* (bu grupta en sık görülen etken) *Haemophilus influenzae* tip b (bu bakteri için aşılama yapılmayan ülkelerde) A grubu streptokoklar *Streptococcus pneumoniae*
Yetişkinler	*Neisseria gonorrhoeae*
İleri yaş	Gram negatif basiller

Tablo 12. Belirli durumlarda daha sık görülen enfeksiyöz artrit etkenleri.

Hastalık/klinik özellik	Etkenler
Orak hücreli anemi	*Salmonella* türleri
İmmün-yetmezlik	A grubu streptokoklar, *Listeria monocytogenes,* Gram negatif basiller
Altta yatan hastalık varlığı (kronik metabolik hastalıklar, eklem hastalığı gibi)	Gram negatif basiller
İntravenöz ilaç alışkanlığı	
Isırık öyküsü	Kedi-köpek: *Pasteurella multocida, Capnocytophaga* spp, anaerop bakteriler
	İnsan: *Eikenella corrodens* ve oral anaerop bakteriler
	Fare: *Streptobacillus moniliformis*
Eklem içine enjeksiyon öyküsü	*Candida* türleri ve diğer mantarlar
Sistemik enfeksiyon (mantara bağlı)	
Bitki dikeni batması	*Pantoea agglomerans, Nocardia* spp.
Doğum sonrası	*Mycoplasma hominis*

Tablo 13. Eklem sıvısı örneklerinin alınması, taşınması ve kabul/ret ölçütleri.

Örnek türü	Örnek alma özelliği	Miktarı	Taşıma özellikleri	Ret ölçütleri
Eklem sıvısı	Deri antisepsisi uygulandıktan sonra **klinisyen** tarafından aspirasyon ile alınır. Antisepsi; deri %70'lik alkolle silindikten sonra povidon iyot ya da klorheksidin ile sağlanır.	Örnek ne kadar fazla alınabilirse laboratuvara gönderilmelidir. Hücre sayımı için 1 mL ve yapılacak diğer incelemeler için 2-3 mL en az miktarlardır. Kan kültürü besiyerine ekim* için ayrıca 2-10 mL örneğe gereksinim duyulur.	Steril tüp / taşıyıcı / taşıma besiyerinde; En kısa sürede (15 dk'da, en fazla 1 sa içinde); Oda sıcaklığında	Pamuklu silgiç ile alınıp gönderilmiş örnekler Sızdırmış kapta gelen örnek** İğnesi üzerinde enjektör ile gelen örnek***

* Eğer örnek **sadece** kan kültürü şişesine alınmış ise, bu örnekten Gram boyama yapılamayacağı klinisyene bildirilmelidir.

** Sızdırmış kaplarda gelen örnekler işlenebilir, ancak kontaminasyon olasılığının bulunduğu klinisyene bildirilmelidir.

*** İğnesi üzerinde enjektörle laboratuvara gelen örnek, laboratuvar personelinin yaralanma riski nedeniyle önemlidir! İnvaziv girişimle alındığı için hasta açısından rahatsızlık verici bu işlemin tekrarlanması istenmediğinden dolayı, reddedilmez, ancak klinisyen telefonla aranarak bu tür örneklerin gelecek sefer uygun taşıyıcı kap/besiyeri içine aktarılarak gönderilmesi rica edilir.

Tablo 14. Eklem sıvısının makroskopik, mikroskobik ve biyokimyasal özellikleri

	Normal	Non-enflamatuvar	Enflamatuvar	Septik	Hemorajik
Görünüm	Berrak, saman rengi	Berrak, saman rengi	Sarı, dumanlı görünüm	Bulanık	Kanamalı
Viskozite	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük	Değişken
Lökosit sayısı/mm^3	<200	<2000	2000-50000	>50000**	Değişken
%PNL	<25	<25	<50	>75***	Değişken
Glikoz (% kan değeri)	%95-100	%95-100	%80-100	<%50	
Protein (g/L)	1.3 – 1.8	3 – 3.5	>4	>4	
Kristal*	Yok	Yok	Çeşitli ya da Yok	Yok	Yok

* Sodyum ürat kristalleri ve kalsiyum pirofosfat kristalleri enflamatuvar artrit ve sinovite neden olabilirler. Kristal varlığı açısından yapılacak mikroskobik incelemede polarize ışık kullanılmalıdır.

** Malignitesi olanlarda, kortikosteroid kullananlarda, intravenöz ilaç alışkanlığı olanlarda lökosit sayısı <50.000/mm^3 olabilir.

*** *Mycobacterium* spp. enfeksiyonlarında mononükleer hücre infiltrasyonu %30-50 arasında olabilir.

Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi

İşlemler BGK içinde gerçekleştirilmeli, kişisel koruyucu önlemler ihmal edilmemelidir.

Makroskopik inceleme

Örneğin makroskopik görünümü (miktarı, rengi, viskozitesi, ışığı geçirgenliği, pıhtı varlığı gibi) kaydedilmelidir. Eklem sıvısı içindeki lökosit sayısı arttıkça makroskopik olarak şeffaflığı azalır, rengi bulanıklaşır, enflamasyona bağlı olarak viskozitesi azalır.

Eklem sıvısı; monosodyum ürat ve kalsiyum pirofosfat kristalleri varlığında süte benzer beyaz renkte, kolesterol kristalleri varlığında sarı-kremsi görünümde, eski eklem protezlerine bağlı metal varlığında grimsi renkte olabilir. Enflamatuvar artropatilerde fibrin parçaları, travmatik durumlarda kan içerebilir (**Tablo 14**).

Kültürü yapılacak eklem sıvısı örneği **buzdolabına konmaz!**

Hücre sayımı ve kristal arama için mikroskopi yapılacak bir kısım örnek ayrılarak +4°C'de tutulabilir!

Hücre sayımı

Santrifüj edilmemiş örnekteki lökositler manüel olarak sayma kamarasında sayılır; örnek *pıhtı* içeriyorsa, yanlış sonuç verebileceği için hücre sayımı yapılmaz! Sıvının viskozitesinin yüksek olması nedeni ile otomatize sayım cihazlarında yanlış sonuçlar alınabilir. Lökosit sayısı çok yüksek olduğunda örneği dilüe etmek için %0.3'lük sodyum klorür çözeltisi kullanılır. Lökositlerin sayısı yanında PNL ve MNL ayrımının yapılarak % oranlarının belirtilmesi önemlidir. Bu ayırımda iki yol kullanılabilir:

Toplam lökosit sayısı belirlenirken dilüsyon yapılmış ise **sulandırma oranı** dikkate alınmalıdır!

Sayma kamarası ile sayım: Az sayıda lökosit içeren örnekler için uygundur.

- Az kanlı/kansız örneklerde; santrifüj edilmemiş örnek %0.1 toluidin ya da metilen mavisi ile boyandığında lökosit çekirdekleri ayırt edilebilir.
- Kanlı örnekler lökosit sayma eriyiği ile karıştırılıp 5 dk beklendiğinde eritrositler parçalanır ve lökositler ayırt edilir hale gelir.

Boyama yöntemi ile sayım: Lökosit sayısı yüksek olan örnekler için uygundur. Santrifüj edilmiş örneğin dibe çöken kısmından hazırlanan preparat havada kuruduktan sonra alkol ile tespit edilerek (alevde tespit edildiğinde lökositlerin morfolojisi bozulur) Gram yöntemi ile boyanır ve lökosit morfolojisi kaydedilir (**Tablo 15**).

Gram boyama

Önceden alkol ile temizlenmiş lam üzerine örnek miktarı azsa bir-iki damla damlatılıp yayılmadan kurutulur; metanol ile tespit edilir ve Gram yöntemi ile boyanır.

Örnek 2 mL'den fazla ise 1200×*g*'de 5-10 dk santrifüjlendikten sonra dipteki çökeltiden preparat hazırlanabilir. Lam BGK içinde ya da preparat kurutucuda kurutulur; metanol ile tespit edildikten sonra boyanır. Viskozitesi yüksek örneklerde preparatların sitosantrifüj ile hazırlanması önerilir.

Gram boyamada farklı yapıda mikroorganizmalar görüldüğünde örnek seçici aerop (MacConkey, Kolombiya nalidiksik agar gibi) ve anaerop plak besiyerlerine ekilmelidir (**Tablo 15**).

Kültür

Gram boyalı preparat en kısa sürede incelenmelidir. Pozitif sonuç alınması durumunda sonuç hemen klinisyene bildirilir!

Gelen örnek miktarı önemlidir (**Tablo 13**). Örnek yeterli miktarda alınmışsa aerop ve anaerop kan kültür şişelerine minimum/ maksimum miktarlara göre ekim yapılır. Örnek 2 mL civarında alınmışsa pediatrik şişeye ekilebilir. Örnek sadece birkaç damla halindeyse çikolata agar (öncelikli) ve kanlı agar besiyerlerine ekilir (örneğin gönderildiği tüp bir miktar sıvı besiyeri ile yıkanabilir). Gram yayma yapılmaz. Gelen örnek miktarı not edilir.

Sadece kan kültürü şişesinde gelen örneklerde agar plağında üremeyi tercih eden bakteriler için (*N. gonorrhoeae* gibi) şişeden çikolata agara pasaj yapılır. Anaerop kan kültür/sıvı kültürü besiyerine ekim yapılmamışsa 2-3 damla örnek anaerop besiyerine ekilir.

İncelemelerden sonra ayrılan bir miktar örnek +4°C'de 1 hafta süre ile saklanmalıdır!

Pıhtılı örnekler <0.5 mL steril sıvı besiyeri ile doku öğütücüde karıştırıldığında pıhtı çözülür ve içindeki bakteriler açığa çıkar. Mantar kültürü istenen örneklerde bu uygulama ile hifler canlılığını kaybedebileceğinden pıhtının parçalanması yerine nazikçe ayrılması önerilmektedir. Pıhtılı örneklerin kültüründe kontaminant mikroorganizmaların üreyebileceği akılda tutulmalıdır.

Alınan örnek sadece birkaç damla ise sadece çikolata agara ekim yapılır, tüp bir miktar sıvı besiyeri ile yıkanır. Gram boyama yapılmaz. Gelen örnek miktarı not edilir (*bkz.* **Tablo 15**).

Mantar ve mikobakteri türleri için özel kültürler sadece kronik artriti olan hastalardan, bağışık yetmezliği olanlardan ya da klinik olarak şüphelenilen hastalardan alınan örnekler için yapılmalıdır.

Mikobakteri enfeksiyonu şüphesinde ARB boyama ve mikobakteri kültürü yapılmalıdır!

Serolojik testler

Brucella spp, Parvovirus B19, kızamıkçık virüsü ve *Borrelia burgdorferi* gibi etkenlerin tanısı için hastadan serum örneği alınarak serolojik testler yapılabilir.

Septik artrit tanısında serum prokalsitonin yüksekliğinin CRP ve sedimentasyon testlerine göre daha duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir. Eklem sıvısında laktik asit, prokalsitonin ve TNF-α gibi enflamatuvar sitokinlerin yüksekliğinin tanıda yararı kesinleşmemiştir. Romatoit artritte eklem sıvısında romatoit faktörün pozitif (serumda negatif olsa bile) ve kompleman seviyelerinin düşük bulunabileceği ancak bu testlerin klinik tanı için düşük duyarlılık ve özgüllükte olduğu belirtilmektedir.

Moleküler testler

Kültürde zor üreyen ya da kültürü yapılamayan (*B. burgdorferi, Tropheryma whippelii* gibi) bakteriler veya virüsler etken olduğunda ya da hastaya önceden antimikrobiyal tedavi başlanması durumunda kültür sonuçları yanlış negatif sonuç verebilir. 16S rRNA genini saptayan PCR sonrası yapılan nükleik asit dizi analizi ile etken cins ya da tür düzeyinde tanımlanabilir. Gonokok ve mikobakteriler gibi kültürde saptanması zor olabilen mikroorganizmalar için PCR ile yüksek duyarlılık ve özgüllükte sonuçlar alınabilir. Stafilokoklar ya da streptokoklar gibi besiyerinde kolay üreyen bakteriler için PCR'nin üstünlüğü bulun**ma**maktadır. Örneğin 1-2 mL'si -80°C'de dondurularak saklandığında kültür sonucu negatif olan örneklerde PCR çalışılabilir.

Tablo 15. Eklem sıvısı örneklerinin mikroskobik incelemeler ve kültür için işlenmesi

Direk mikroskopi	Boyalı mikroskobik inceleme	Besiyeri		İnkübasyon			Etken mikroorganizma
				Sıcaklık	Ortam	Süre	
Hücre sayımı	Gram boyama	Rutin besiyerleri	Kanlı agar Çikolata agar MacConkey agar	35-37°C	%5-10 CO_2	4 gün*	Herhangi bir bakteri
			Seçici olmayan anaerop besiyeri		Anaerop ortam	5-7 gün	
		Kan kültürü besiyeri	Aerop		Aerop ortam	5-7 gün (*Brucella* sp şüphesinde daha uzun)	
			Anaerop		Anaerop ortam	5-7 gün	
Potasyum hidroksit Kalkoflor beyazı	Gram boyama		Sabouraud dekstroz agar Beyin-kalp infüzyon agar	22-26°C 35-37°C	Aerop ortam	2 hafta	Mantarlar**
	ARB		LJ besiyeri Sıvı besiyeri (otomatize sistem)	35-37°C		6-8 hafta	Mikobakteriler

* Günlük olarak değerlendirilir.
** Dimorfik veya esmer mantarların etken olabileceği kuşkusu varsa süre dört haftaya uzatılmalıdır.

Ara raporlar ve panik değerler

Eklem sıvısında mikroorganizma görülmesi durumunda klinisyene **hemen** telefonla ya da otomasyon sistemi ile bildirilir. Ön testler sonuçlanır sonuçlanmaz muhtemel cins/tür adı rapor edilmelidir.

Gonokoksik artrit şüphesinde **genito-üriner bölgeden** de kültür ve NAAT ile *Neisseria gonorrhoeae* aranmalıdır!

Sonuçların yorumlanması

Kültürde üreme saptandığında kültür sonuçlarının direkt Gram boyama sonucu ile uyumu kontrol edilir.

- Üreyen tüm mikroorganizmalar standart yöntemlerle tanımlanır.
- Şüpheli mikroskopi veya üremeler bildirimi zorunlu etkenlerden birini düşündürüyorsa (*örn., N. gonorrhoeae*, *Brucella* sp, *M. tuberculosis* vb.) standart izolasyon-identifikasyon prosedürleri için UMS (2014) – Cilt I, II, II ve Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi'ne başvurulmalıdır.
- Üreyen mikroorganizmalara uygun standartlara göre (EUCAST gibi) ADT yapılır.
- Kontaminasyon olasılığı bulunan mikroorganizmalar için tür düzeyinde tanımlama testleri yapılmaz (*örn*., sıvı besiyerinde üreme bulunmazken plak besiyerinde 1-2 koagülaz negatif stafilokok kolonisi varlığı).
- Pozitif kültürler en az 7 gün saklanmalıdır. İzolatların dondurularak saklanması önerilir.

Etken olan mikroorganizmaya göre klinik tabloda ve tanı testi sonuçlarında bazı farklılıklar göze çarpmaktadır.

- Septik artritlerde Gram boyamanın duyarlılığı etkene göre değişir ve yüksek değildir; bununla birlikte, özgüllüğü oldukça yüksektir (%100'e yakın) (**Tablo 16**).

- Önceden antibiyotik kullanmış hastaların %30-80'inde kültürde yalancı negatif sonuçlar alınmaktadır. Bunun dışındaki yalancı negatiflik nedenleri örneğin yanlış işlenmesi, uygun olmayan besiyerleri ve kültürde üreyemeyen mikroorganizmalardır.
- Kontaminant bakteriler üreyerek yalancı pozitifliğe neden olabilmekte, buna rağmen septik artritte kültürün özgüllüğü %90'ın üzerine çıkmaktadır (*bkz.* **Tablo 16**).

Prostetik eklem enfeksiyonlarında eklem sıvısında lökosit sayılarının daha düşük olabileceği akılda tutulmalıdır. Yapılan çalışmalarda çıkarılan parçanın sonikasyonu sonrasında biyofilm içindeki mikroorganizmaların saptanmasının arttığı böylece tanı duyarlılığının yükseldiği gösterilmiştir.

- Serolojik tanıda IL-6, TNF ve prokalsitonin testlerinin faydalı olabileceği belirtilmektedir. Eklem sıvısında α-defensin varlığını ELISA ya da lateral-flow testi ile saptayan yapılmış çalışmalarda duyarlılık ve özgüllük oranlarının %85-95 arasında bulunduğu ve özellikle omuz ve diz protez enfeksiyonu tanısında oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir.
- Operasyon sırasında eklem sıvısında strip test ile lökosit esteraz saptanmasının düşük duyarlılıkta bulunduğu ve kanamalı örneklerde yanlış pozitifliklerin görülebildiği belirtilmektedir.

Septik artritlerin %90'dan fazlasında *N. gonorrhoeae* **dışı** mikroorganizmalar etkendir. Bu grup hastaların çoğunda eklem sıvısı kültürleri pozitif olmakla beraber **kan kültürü**nde %25-70 oranında pozitiflik saptanır. Hastalardan eklem sıvısının yanı sıra kan kültürü de alınmalıdır!

Tablo 16. Septik artrit tanısında Gram boyamanın ve kültürün duyarlılığı

Artrit tablosu	Duyarlılık (%)	
	Gram boyama	Kültür
Non-gonokoksik artrit	50-70	75-95
Gonokoksik artrit	10-25	10-50
Tüberküloz artriti	20	79

Sonuçların raporlanması

Eklem sıvısı incelemelerinde laboratuvarın sonuçları raporlamadan önce şu hususları göz önüne almasında fayda vardır:

- Örnek cilt florası ile kontamine ise kültürün **yanlış pozitif** olmasına yol açabilir. Plakta kontaminan mikroorganizma şüphesi bulunduğunda RAPORa not olarak:

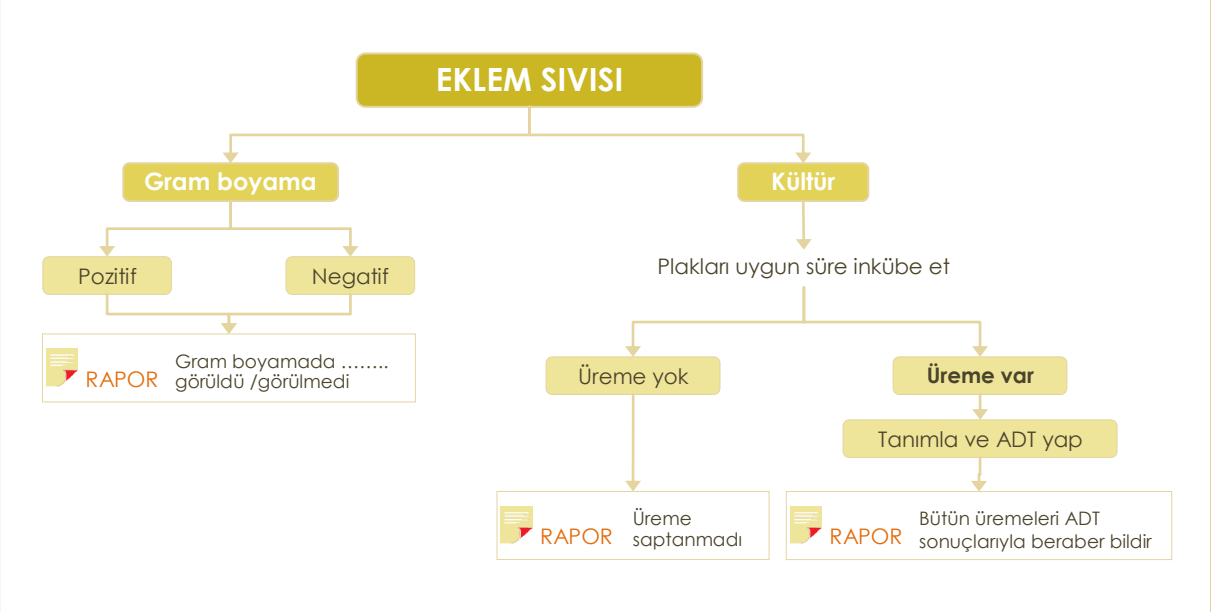
  "*Kültürde kontaminasyon-enfeksiyon ayrımı yapılamamıştır, uygun alınmış bir örnek ile kültürün tekrarlanması önerilir.*" yazılması uygun olur.
- Örnekteki mikroorganizma sayısının düşüklüğü, kültür alınmadan önce hastaya uygulanmış olan antimikrobiyal tedavi ve zor üreyen mikroorganizmaların etken oluşu, **yanlış negatif** sonuçlara neden olabilir.
- Artrit etkeni olabilen bazı mikroorganizmaların kültürde üretilemeyebileceği hatırlanmalıdır (*örn., B. burgdorferi*).

Aşağıda eklem sıvısı incelemeleri raporunda bulunması önerilen parametreler için bir taslak verilmektedir.

Eklem sıvısı incelemesi için RAPOR örneği – bulunması gereken parametreler

DİREKT İNCELEMELER	
Makroskopik görünüm:	Laboratuvara gelişte kaydedilen örneğe ait ilk makroskopik gözlem bulgusu (berrak, pürülan, hemorajik, vb.) bildirilir.
Hücre sayımı:	Lökosit sayımı yapılarak mm^3'de sayılan değer verilmelidir.
Direkt mikroskopi:	Kristallerin varlığı ve tipi bildirilir.
Gram boyama:	Mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi bildirilmelidir.
Aside dirençli boyama:	TB şüphesi ile inceleniyorsa aside dirençli basil varlığı bildirilmelidir.
KÜLTÜR	
Negatif sonuç:	"Üreme saptanmadı" şeklinde rapor edilmeli; raporda inkübasyon süresi de belirtilmelidir.
Pozitif sonuç:	Bütün üremeler ADT sonuçlarıyla beraber bildirilmeli ve bildirimi kaydedilmelidir.
MOLEKÜLER YÖNTEMLER	
Negatif sonuç:	"..... DNA/RNA'sı saptan**ma**dı." şeklinde raporlanır.
Pozitif sonuç:	"..... DNA/RNA'sı saptandı." şeklinde raporlanır.

İş akış şeması



Kaynaklar

1. Balato G, Matteo VD, Ascione T, et al. Laboratory-based versus qualitative assessment of α-defensin in periprosthetic hip and knee infections: a systematic review and meta-analysis. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. https://doi.org/10.1007/s00402-019-03232-5. Published online 12 July 2019.
2. Brannan SR, Jerrard DA. Synovial fluid analysis. *J Emerg Med.* 2006;30(3):331-9.
3. El-Gabalawy HS. Synovial fluid analysis, synovial biopsy, and synovial pathology. In: Firestein GS, Budd RC, Harris ED Jr., et al, eds. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 10th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2017. Chapter 53, p. 784-801.
4. García-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011;25(3):407-21.
5. Külah C. Vücut sıvıları kültürü (kan, beyin omurilik sıvısı ve idrar hariç). In: Başustaoğlu A, Yıldıran ŞT (eds). Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2014. Bölüm 3.5.
6. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, et all. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis.* 2018;67(6):e1-e94.
7. Ohl CA, Forster D. Infectious arthritis of native joints. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Updated Edition. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015. Chapter 105, p. 1302-17.
8. Smith JW, Chalupa P, Shabaz Hasan M. Infectious arthritis: clinical features, laboratory findings and treatment. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(4):309-14.
9. UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of fluids from normally sterile sites. Issued by the Standards Unit, Microbiology Services, PHE. Bacteriology, B 26, Issue no: 6.2, Issue date: 03.10.18. https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories.
10. Zimmerli W , Sendi P. Orthopedic implant-associated infections. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, eds. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Updated Edition. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015. Chapter 107, p. 1328-40.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

BÖLÜM 3

PERİKARD SIVISI

Giriş

Kalp ve devam eden büyük damarlar koruyucu tabaka olan perikard ile çevrilidir. Kalp kasını çevreleyen zar olan epikardiyum ile perikardiyum arasındaki alan perikard boşluğudur ve normalde 15-20 mL berrak sıvı içerir. Eğer sıvıda bir enfeksiyon etkeni varsa veya başka nedenle sıvı artışı olmuşsa perikard gergin bir hale gelir. Tamponad gelişebilir, kardiyak fonksiyonda ve dolaşımda bozulma görülebilir.

Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi

Perikard sıvısı normalde steril bir sıvıdır ve mikroorganizma bulunmaz. Dolayısıyla örnek alınırken kontamine olmamışsa saptanan bütün mikroorganizmalar etken kabul edilmelidir.

Perikardit etkenleri genellikle virüslerdir. Parazitler, bakteriler, bazı mantarlar ve enfeksiyon dışı durumlar (otoimmün hastalıklar, böbrek yetmezliği, miyokard enfarktüsü, mediastinal yaralanma vs.) da bununla ilişkili olabilir. Grup B ve daha az sıklıkta grup A koksaki virüsler ve bazı enterovirüsler akut perikardit nedeni olabilirler. Coxsackie B virus ile perikardın invazyonu küçük damarlar yoluyla olur ve akut enflamasyon gelişir. Hastalarda dispne, göğüs ağrısı olur ve bazı olgularda miyokard enfarktüsünü taklit edebilir. Perikardite miyokardit de eşlik edebilir.

Koksaki virüsler, boğaz sürüntü örneklerinden, dışkı örneklerinden veya nadiren perikard sıvısından izole edilebilir. Alternatif olarak viral RNA saptama yöntemleri kullanılabilir. Kabakulak virüsü miyokardit ve perikarditin daha nadir sebeplerindendir (ayrıca *bkz.* **Tablo 17**).

Tablo 17. Perikardit ve miyokarditte sık görülen etkenler*

Bakteri	Virüs	Mantar	Parazit
M. pneumoniae *C. trachomatis* *M. tuberculosis* *S. aureus* *S. pneumoniae* *S. pyogenes* *Enterobacterales* Diğer Gram negatif basiller Anaeroplar (*B. fragilis* grup, streptokoklar, *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp.) *Pseudomonas* spp.	Enterovirüsler (primer olarak Coxsackie virus A ve B ve daha az sıklıkta Ekovirüsler) Poliovirus Adenovirus İnfluenza virüsü Kabakulak virüsü HIV Sitomegalovirüs	*C. immitis* *Aspergillus* spp. *Candida* spp. *C. neoformans* *H. capsulatum*	*E. histolytica* *T. gondii* *T. cruzi* *E. granulosus* *T. spiralis*

* Bu Tabloda listelenenler haricindeki bazı etkenler de perikardiyal efüzyonlara neden olabilir. Virüsler dışındaki etkenlerle perikardit gelişen hastalarda sıklıkla yatkınlık oluşturan bir faktör mevcuttur (*örn.*, enfektif endokardit)

Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Perikard sıvısı sıklıkla elektrokardiyografik monitörizasyon esnasında iğne aspirasyonu veya cerrahi prosedür yoluyla alınır. Girişim yapılacak olan bölgenin kalbe olan yakın komşuluğundan dolayı perikard sıvısının alınma işlemi riskli bir işlemdir. Örnek alınmadan önce cilt dekontamine edilmeli, birkaç mL örnek alınmalıdır. Alınan örnek steril kap içinde, bekletilmeden laboratuvara gönderilmelidir. Örnek buzdolabına kon**ma**malıdır. Hasta başında aerop ve anaerop kan kültür şişelerine ekim yapılabilir. Laboratuvar personeli örnek gönderildikten sonra bilgilendirilmelidir. Tüberküloz ve geçirilmiş cerrahi öyküsü yardımcı klinik bilgilerdir.

Sadece kan kültür şişesi ile gönderilmiş örneklerden, mikroorganizmaların dilüsyona uğramaları nedeniyle Gram boyama yapılması uygun değildir. Bu nedenle kan kültür şişesine alınan örneklere ek olarak Gram boyama yapılabilmesi için steril tüpte bir miktar daha örnek gönderilmelidir (ayrıca *bkz.* **Tablo 18**).

Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi

Tüm işlemler BGK içinde yapılmalıdır.

Makroskopik inceleme

Normal perikard sıvısı berrak görünümdedir. Laboratuvara ulaşan örneğin hacmi ve görünümü kaydedilir.

Laboratuvara gelen pıhtılaşmış perikard sıvısı örnekleri bakterileri açığa çıkarmak için homojenize edilmelidir. Bu işlem için pıhtı içeren materyal steril doku öğütücüsü içine konmalı, üzerine 0.5 mL'yi aşmayacak şekilde steril buyyon ilave edilerek nazikçe homojenize edilmelidir. Mantar kültürü istendiğinde bu işlem hif yapılarına hasar vereceği için uygulan**ma**malıdır. Heparin de bazı mikroorganizmaları inhibe edebileceği için ideal olan, antikoagülan içermeyen örnek göndermektir. Heparin, hızla laboratuvara ulaştırılabilecek örnekler için kullanılabilir.

Hücre sayımı

Otomatize hemositometrik ölçümler yapılabilir. Bakteriyel enflamasyonda nötrofiller baskındır. Tüberküloz ve viral enfeksiyonlarda ise lenfosit hakimiyeti olur.

Santrifüj

Berrak sıvılar santrifüj ya da filtrasyon yoluyla konsantre edilebilir. Pürülan materyal doğrudan besiyerine inoküle edilebilir. Sıklıkla örnekte 10^5 cfu/mL'den daha az mikroorganizma bulunduğu için örneklerin santrifüj edilmesi direkt mikroskopilerin duyarlılığını arttırır. Boyalı mikroskopilerin duyarlılığını arttırmak için sitosantrifüj kullanımı önerilmektedir. Kültür için de santrifüj yapmak önerilmektedir. Örnek miktarı az ise santrifüj işlemi yapılmadan birkaç damla örnek besiyerine inoküle edilebilir.

Örnek miktarının fazla olması etkeni yakalama şansını arttırır!

Antikoagülan olarak EDTA ve sitrat kullanılması mikroorganizmaları inhibe edebileceği için uygun değildir. Mikrobiyolojik incelemeler için antikoagülan kullanımı öneril**me**mektedir!

M. tuberculosis tanısında perikard **biyopsi**si ile elde edilen doku perikard sıvısına üstündür!

Tablo 18. Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Örnek alma yöntemi	Taşıma kabı/Miktar	Taşıma süresi ve ısısı	Saklama süresi ve ısısı	Ret ölçütleri
Cilt dekontaminasyonunu takiben iğne aspirasyonu (perikardiyosentez) veya cerrahi işlem esnasında	Steril tüpte; Bakteriler için 1-5 mL Mantarlar için 5 mL Mikobakteriler için >5 mL	<15 dk, oda ısısı	<24 sa, oda ısısı İşlemler sonrasında 1 hafta buzdolabında saklanmalı.	İğnesi üzerinde enjektör ile gönderilmiş örnek*
	Anaerop bakteriler, anaerop taşıma sistemi içerisinde; >1 mL	<15 dk, oda ısısı		
	Virüsler, viral transport besiyerinde; >1 mL	<15 dk, buz üzerinde	>24 sa ise -80°C	

* İğnesi üzerinde enjektörle laboratuvara gelen örnek, laboratuvar personelinin yaralanma riski nedeniyle önemlidir! İnvaziv girişimle alındığı için hasta açısından rahatsızlık verici bu işlemin tekrarlanması istenmediğinden, örnek reddedilmez, ancak klinisyen telefonla aranarak bu tür örneklerin gelecek sefer uygun taşıyıcı kap/besiyeri içine aktarılarak gönderilmesi rica edilir.

Gram boyama

Gönderilen tüm perikard sıvısı örneklerine Gram boya yapılmalıdır. İki adet preparat hazırlanıp biri Gram boyama yöntemi ile boyanmalı, diğeri saklanmalıdır. Santrifüj sonrası çökeltiden örnek alınarak lam üzerine konur ve yayılmadan kuruması beklenir. Metanol ile tespit edildikten sonra Gram boya ile boyanır. Preparatlarda lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi değerlendirilir.

Eğer örnek miktarı santrifüj edilemeyecek kadar azsa veya santrifüj imkanı yoksa örnek lam üzerine damlatılır yayılmadan kuruması beklenir. Ardından yeni bir damla örnek bu örneğin üzerine damlatılarak tekrar kuruması beklenir, tespit edilir ve boyanarak incelenir.

Diğer boyama teknikleri

Akridin oranj boyama

Bakteri ve diğer hücrelerin nükleik asitlerine bağlanan florokromatik bir boyadır. Mikroorganizmalarla hücresel materyalleri farklı renklerde boyar. Bakteri ve mantarlar parlak turuncu, insan epitel ve enflamatuvar hücreleri ve zemin açık yeşilden sarıya değişen renklerde boyanır. Gram boya ile boyanmayan ya da yoğun artık içinde saptanamayan mikroorganizmaların görülebilmesi için faydalıdır. Özellikle enfeksiyon varlığından şüphelenilen ancak Gram boya ile mikroorganizma saptanmayan örnekler için yararlıdır. Gram boyamada olduğu gibi preparat hazırlanır. Bu boyama ile mikoplazma türleri de görülebilir.

Akridin oranj **kanserojen**dir! Cilt ile temasını önlemek için mutlaka eldiven giyilmelidir!

Aside dirençli boyama

Santrifüj edilmiş örneğin çökeltisinden preparat hazırlanır ya da sitosantrifüj yoluyla hazırlanan preparat kullanılır.

Auramin-rhodamine boyama

Mikobakterilerin gösterilmesinde auramin-rhodamine floresan boyama kullanılabilir. Değerlendirmesi diğer boyama yöntemlerine göre kolaydır.

Direkt bakı ve kalkoflor beyazı ile boyama

Mantar varlığından şüphelenilen örnekler için kullanılırlar.

Kültür

Hasta başında aerop ve anaerop kan kültür şişelerine ekim yapılmadıysa gönderilen örnekten laboratuvarda şişelere ekim yapılabilir. Kan kültür şişeleri kullanılmayacaksa örnek santrifüj edildikten sonra çökeltiden kanlı ve çikolata agarlara ve beyin kalp infüzyon buyyon ya da triptik soy buyyona ekim yapılır (**Tablo 19**).

Az miktarda örnek geldiyse ve santrifüj için yeterli değilse 2-3 damla örnek besiyerine inoküle edilerek steril öze yardımıyla yayılır. Örnek miktarı daha azsa sadece çikolata agara ekim yapılır. Eğer Gram negatif mikroorganizma üremesi bekleniyorsa veya Gram boyalı preparatlarda Gram negatif mikroorganizma görülmüşse veya farklı morfolojide bakteri saptanmışsa MacConkey agara da ekim yapılır.

Örnekler besiyerlerine inoküle edildikten sonra steril öze ile yayılır ve uygun inkübasyon şartlarında bekletilerek günlük olarak 4 gün boyunca üremeler değerlendirilir.

Tüberküloz perikardit şüphesi varsa örnek Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine ve otomatize mikobakteri kültür sistemine ekilir. LJ besiyerleri ilk 4 hafta haftada 2 kez, daha sonraki 4 hafta haftada bir kez olmak üzere toplam 8 hafta koloni oluşumu açısından değerlendirilir. Koloni varlığı gözlenirse ARB ile basil varlığı değerlendirilir.

Otomatize hızlı kültür sistemlerinde ise üremeler daha erken saptanabilir.

Anaerop taşıma sistemi ile gelen örneklerden besiyerlerine inokülasyon yapılarak anaerop koşullarda inkübe edilir. Eğer aerop kültür istemi yapılmadıysa örnekler ayrıca kanlı ve çikolata agara inoküle edilip aerop koşullarda inkübe edilir. Anaerop koşullarda inkübe edilen besiyerleri üreme varlığı açısından 48 saat sonunda değerlendirilir.

Üreme gözlenen plaklar veya tüpler 7 gün boyunca buzdolabında saklanır. Tercih edileni ise üreyen suşların –80°C'de saklanmasıdır.

Tablo 19. Perikard sıvısı örneklerinin ekildiği besiyerleri ve inkübasyon koşulları

Besiyerleri	İnkübasyon			Etken mikroorganizmalar
	Sıcaklık	Ortam	Süre	
Koyun kanlı agar	35-37°C	%5-10 CO_2	4 gün	Çoğu mikroorganizma için uygun
Çikolata Agar				
Otomatize kan kültür şişeleri (aerop)		Aerop ortam	5-7 gün	Çoğu mikroorganizma için uygun
Otomatize kan kültür şişeleri (anaerop)				Çoğu anaerop mikroorganizma için uygun
Löwenstein-Jensen besiyeri			6 hafta	Mikobakteriler
Sıvı mikobakteri besiyeri (otomatize sistem)				
Sabouraud dekstroz agar			5-7 gün	Mantarlar
Beyin kalp infüzyon buyyon				Çoğu mikroorganizma için uygun
Triptik soy buyyon				

Virüs kültürü

Hücre kültürü pek çok virüs için tanıda altın standart olmakla beraber bazı virüslerin hücre kültürlerinde üretilmeleri mümkün değildir.

Diğer yöntemler

Antijen arama testi

İmmunokromatografik membran testinde idrarda *S. pneumoniae*'nin C-polisakkarit hücre duvar antijenini saptayan kit ile hızlı sonuç alınabilmektedir. *C. neoformans* için serumda lateks aglütinasyon testi çalışılabilir.

Antikor arama testi

Özellikle viral etiyolojide, akut ve konvalesan dönemde serumda antikor yanıtının incelenmesi faydalı olabilir.

Moleküler yöntemler

Kültürü zor veya yapılamayan bakteri varlığında ya da antibiyotik tedavisi alan hastalarda yalancı negatif sonuçlar alınabilir. Böyle durumlarda moleküler yöntemlerin kullanılması ile etken saptanabilir. Özellikle tüberküloz şüpheli olgularda da moleküler yöntemler faydalıdır. Ancak negatif test tüberküloz perikarditi dışlamaz.

Bazı virüslere yönelik tekli veya multipleks PCR uygulamaları mevcuttur. Multipleks PCR aynı anda birden fazla etkeni gösterme şansı sağladığı için tercih edilebilir.

Perikardit ve miyokarditlerde olası etkenlere göre önerilen tanı yöntemleri **Tablo 20**'de özetlenmektedir.

Tablo 20. Perikardit ve miyokardit etkenleri için önerilen tanı yöntemleri

Etken	Önerilen tanı yöntemi	Ek tanı yöntemi
Bakteriler	Gram boyama, kültür	Kan kültürü, *S. pneumoniae* için idrarda antijen arama testi
Mantar	Gram boyama, Kalkoflor boyama, KOH ile inceleme, Mantar kültürü,	*C. neoformans* için lateks aglütinasyon testi, Kan kültürü
Mikobakteriler	Asit fast boyama, mikobakteri kültürü	
Coxsackie virus A, B Echovirus Poliovirus Adenovirus HIV Kabakulak virüsü Cytomegalovirus	Moleküler yöntem (test mevcutsa ilk tercih olabilir) Virüs kültürü (tüm virüs tipleri için uygun değildir ve her laboratuvarda uygulanamaz)	Virüse özgü seroloji (akut ve konvalesan serum)
T. cruzi	Histopatoloji	*Trypanosoma* spp. *için kan yaymaları*
T. spiralis	Histopatoloji	
T. gondii	*Toxoplasma* NAAT	*T. gondii için seroloji*
E. histolytica	Serumda antikor aranması	*Trikrom boyama*
E. granulosus	Serumda antikor aranması	*Kist sıvısının mikroskobik incelenmesi*

Ara raporlar ve panik değerler

Perikard sıvısında mikroskobik incelemede (Gram boyama, fungal boyamalar veya ARB) mikroorganizma görülmesi, kültürlerde üreme olması ve antijen testlerinde veya NAAT ile pozitiflik saptanması **panik değer**dir. Bu durumlarda **hemen** klinisyene telefonla haber verilmelidir.

Perikard sıvısında mikroskobik incelemede **mikroorganizma** görüldüğünde kültür sonucunu beklemeden klinisyene **hemen telefon ile** bildirilmelidir!

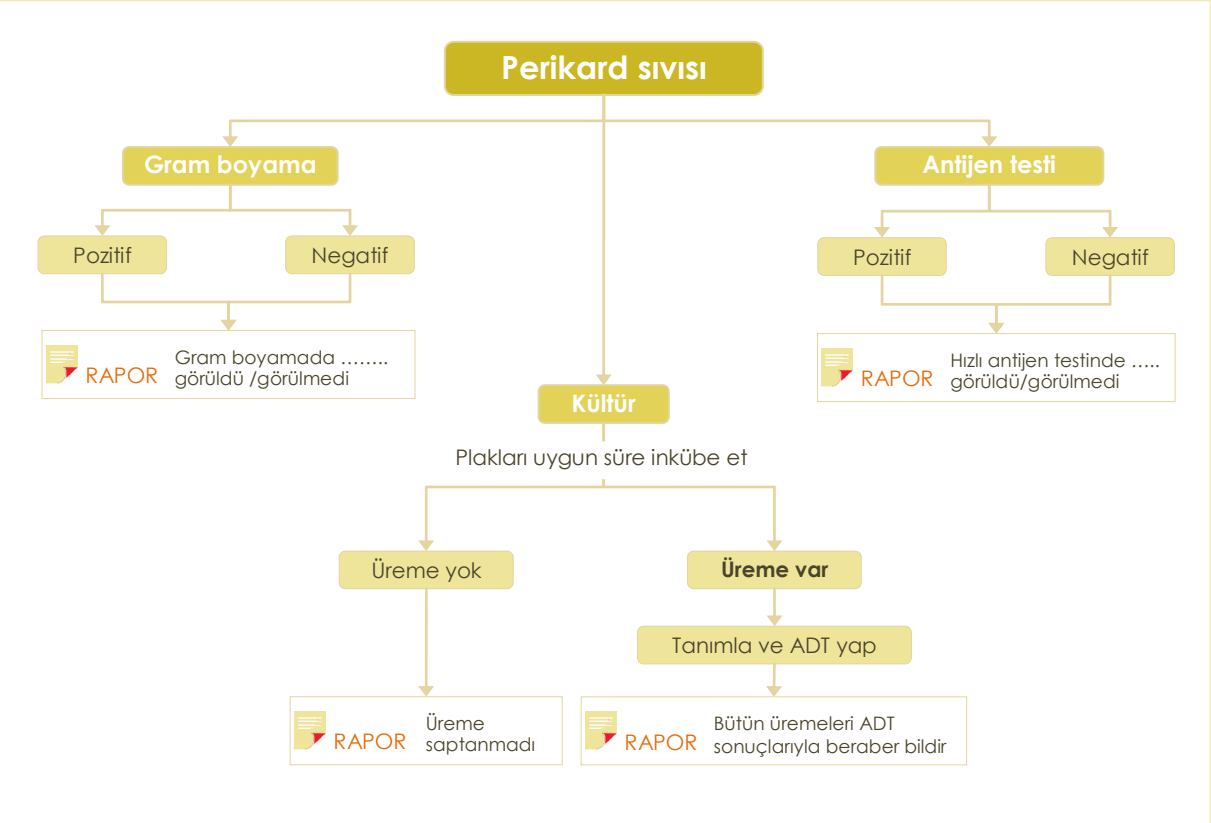
Sonuçların raporlanması

Aşağıda perikard sıvısı inceleme raporunda bulunması önerilen parametreler için bir taslak verilmektedir.

Perikard sıvısı incelemesi için RAPOR örneği – bulunması gereken parametreler

DİREKT İNCELEMELER	
Makroskopik görünüm:	Laboratuvara gelişte kaydedilen örneğe ait ilk makroskopik gözlem bulgusu (berrak, pürülan, hemorajik, vb.) bildirilir.
Hücre sayımı:	Örnekte eritrosit ve lökosit varlığı, mL'deki miktarları ve lökosit tipleri bildirilmelidir.
Gram boyama:	Lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi bildirilmelidir.
Aside dirençli boyama:	TB şüphesi ile inceleniyorsa aside dirençli basil varlığı bildirilmelidir.
Auramin-rhodamine boyama:	Uygun morfolojide sarı-turuncu basil varlığı pozitiflik olarak raporlanır. Negatif sonuç mikobakteri enfeksiyonunu dışlamaz.
KOH ve kalkoflor beyazı boyamaları:	Mantar elemanları görülmüşse raporlanır
Akridin oranj boyama:	Saptanan mikroorganizmalar morfolojisi ile beraber raporlanır. Gram boyalı preparat tekrar değerlendirilir. Eğer Gram boyalı preparatta bakteri görülemiyorsa; "*Örnek akridin oranj boyama ile pozitif ancak Gram boyamada bakteri saptanamadı*." şeklinde raporlanır. Mikroorganizma saptanmadıysa; "*Akridin oranj boyama ile mikroorganizma saptanmadı*." şeklinde raporlanır.
KÜLTÜR	
Negatif sonuç:	İnkübe edildiği gün sayısı ile birlikte rapor edilmelidir. ***Örnek rapor:*** "…….. gün inkübasyon sonrasında üreme saptanmadı."
Pozitif sonuç:	Normalde steril bir bölgeden alınmış olan örnekte, herhangi bir mikroorganizma bulunması anlamlı kabul edilmeli ve tüm izolatlar rapor edilmelidir. Bütün üremeler ADT sonuçlarıyla beraber bildirilmelidir.
MOLEKÜLER YÖNTEMLER	
Negatif sonuç:	"…… DNA/RNA'sı saptan**ma**dı." şeklinde raporlanır.
Pozitif sonuç:	"…… DNA/RNA'sı saptandı." şeklinde raporlanır.

İş akış şeması



Kaynaklar

1. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* 2013 Aug;57(4):485-8.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Normally sterile body fluids, bone and bone marrow, and solid tissues. 12th ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2007. Chapter 61, p. 904-13.
3. Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2010.
4. Karcher DS. McPherson RA. Cerebrospinal, synovial, serous body fluids, and alternative specimens. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011. Chapter 29, p. 480-506.
5. Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. Infections of the skin, soft tissue, muscle and associated systems. In: Medical Microbiology. 3rd ed. Spain: Mosby; 2004. Chapter 26, p. 349-382

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

BÖLÜM 4

PLEVRA SIVISI

Giriş

Paryetal plevra, torasik kavitenin seröz membranıdır ve torasik boşluğun içini döşer. Her bir akciğerin dış yüzeyi de visseral plevra ile döşelidir. Normalde plevral boşlukta solunum hareketleri esnasında akciğerin esnerken ve sönerken minimal sürtünmeye maruz kalmasını sağlamak için az miktarda sıvı bulunur (~20 mL). Bu sıvı paryetal plevradaki kapillerlerden köken alır. Paryetal plevra lenfatikleri yoluyla absorbe olur. Bu bölgede fazla sıvı toplandığında efüzyon adı verilir. Çok sayıda beyaz kan hücresi ve diğer enflamatuvar yanıt göstergeleri taşıyan plevra sıvıları genellikle enfeksiyon kaynaklıdır.

Pnömonili hastaların yaklaşık %50'sinde plevral efüzyon gözlenir. Pnömoni dışında farklı klinik tablolarda da plevral efüzyon gözlenebilir (*örn.,* sistemik romatolojik hastalıklar, maligniteler, kalp yetmezliği, tüberküloz, siroz...). Plevral efüzyonların nedeni yaklaşık %75 olguda parapnömoniktir, yani pnömonilere sekonder gelişir. Ayırıcı tanıda plevra sıvısı transuda ve eksuda tipi olarak ikiye ayrılır. Transuda, yüksek hidrostatik basınç (*örn.,* kalp yetmezliği), azalmış onkotik basınç (*örn.*, hipoproteinemi), asit sıvısının diyafram yoluyla geçişi gibi nedenlere bağlı olabilir. Eksuda ise yüksek kapiller geçirgenlik ve/veya bozulmuş lenfatik drenaj, malignite veya enflamatuvar (*örn.,* parapnömonik efüzyon) nedenli olabilir. Akciğeri enfekte etmiş olan mikroorganizma, bazen plevral boşluğa yayılır ve pürülan eksuda veya ampiyeme neden olur. Plevral efüzyonlar radyolojik olarak gösterilebilir. Fakat ampiyemin saptanması özellikle yoğun pnömonik infiltrasyonu olan hastalarda zor olabilir.

Tablo 21. Plevra sıvısında bulunabilecek olası etkenler

Bakteri		Virüs	Mantar	Parazit
S. aureus *S. pyogenes* *S. pneumoniae** *H. influenzae** *S. anginosus* *P. aeruginosa* *Enterococcus* spp. *M. tuberculosis*** *M. pneumoniae*	Enterik Gram negatif basiller Anaerop bakteriler *Actinomyces* spp. *Brucella* spp.* *Legionella* spp.* *Bacillus anthracis** *Nocardia* spp.	Coxsackie B virus	*Candida* spp. *Aspergillus* spp. *C. neoformans* *H. capsulatum* *B. dermatidis* *C. immitis /posadasii*	*P. westermani* *E. histolytica** *Echinococcus* spp.* *T. gondii**

* Bunlar ülkemizde sürveyans programı kapsamında olan bildirimi zorunlu hastalık etkenlerdir. Bu etkenlerin tanısı için standart prosedürler UMS(2014) **Cilt I**, **Cilt II** ve **Cilt III**'de yer almaktadır.

** *M. tuberculosis* tanısı için standart prosedürler UMS(2014) **Ulusal TB Tanı Rehberi**'nde yer almaktadır.

Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi

Plevra sıvısı normalde steril bir sıvıdır ve mikroorganizma bulunmaz. Dolayısıyla örnek alınırken kontamine olmamışsa saptanan bütün mikroorganizmalar etken kabul edilmelidir. Plevra enfeksiyonlarında olası etkenler **Tablo 21**'de özetlenmektedir.

Toplumdan kazanılmış ampiyemde *Streptococcus viridans, Streptococcus milleri* grup streptokoklar (*S. anginosus, S. intermedius, S. constellatus,*) ve pnömokoklar en sık izole edilen patojenlerdir. Toplum kaynaklı plevral enfeksiyonların %25 kadarında anaerobik bakteriler de olaya dâhildir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda stafilokoklar (özellikle MRSA), enterokoklar ve *Enterobacterales* üyeleri öncülük eder.

Pürülan olmayan komplike parapnömonik efüzyonların yaklaşık %20'sinde ve ampiyemlerin %70'inde kültürlerin pozitif olması beklenir.

Tüberküloza bağlı plevra efüzyonu özellikle primer enfeksiyondan 6-12 hafta sonra gözlenir. Küçük subplevral kazeöz odakların yıkılması ve içeriğin plevral boşluğa boşalması ile meydana geldiği düşünülür. İmmünolojik hipersensitivite reaksiyonu gelişir. Plevra sıvısı eksuda vasfındadır. %90 olguda lenfosit hakimiyeti vardır. Tüberküloz efüzyonlarının %5'ten azında ARB ile basil saptanabilir. Tüberküloz plöritli hastaların plevra sıvısı ve balgam mikobakteri kültürlerinin başarısı da düşüktür (~%30). Ancak mikobakteri kültürü için sıvı otomatize kültür sistemleri kullanıldığında başarı daha yüksektir ve sonuçlar daha hızlı alınır. Tüberküloz plörezisi şüphesi olan olgularda balgam incelemeleri de beraberinde yapılmalıdır.

Antikoagülan olarak EDTA ve sitrat kullanılması mikroorganizmaları inhibe edebileceği için uygun değildir! Mikrobiyolojik incelemeler için antikoagülan kullanımı öneril**me**mektedir!

Aerop ve anaerop kan kültür şişelerine örneğin ekimi hasta başında yapılmalı; Gram boyama için de steril bir tüpte ayrı bir örnek laboratuvara gönderilmelidir!

Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ ret ölçütleri

Mikrobiyolojik inceleme için iğne aspirasyonu (torasentez) yoluyla alınan örnek, laboratuvara plevra sıvısı, torasentez sıvısı veya ampiyem sıvısı adlarıyla gönderilebilir. Çok sayıda PNL içeren ve makroskopik olarak pürülan olan plevral efüzyonlar ampiyem sıvısı olarak isimlendirilir (**Tablo 22**).

Klinik örnek mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır. Öncesinde alkolle ve ardından iyot çözeltisi ile cilt dekontaminasyonu yapılmalıdır. Alınan örnek hemen laboratuvara sızdırmaz steril bir kap içinde (antikoagülan olarak heparin içerebilir) gönderilmelidir. Anaerop etken düşünülüyorsa anaerop taşıyıcı sistem kullanılmalıdır. Örnek buzdolabına kon**ma**malıdır. En geç 4 saat içinde analiz edilmelidir. Eş zamanlı olarak kültür amacıyla kan örneğinin de alınması önemlidir (özellikle pnömokoksik enfeksiyonlarda).

Alınan örnek 20-40 mL ise klinisyen tarafından 3 kısma ayrılmalı; biyokimyasal (5 mL), mikrobiyolojik (5-10 mL) ve sitolojik (10-25 mL) incelemelerde kullanılmalıdır. Eğer örnekten virolojik çalışmalar yapılacaksa +4°C'de 24 saat, -80°C'nin altında daha uzun süreler için saklanabilir (**Tablo 22**).

Gönderilen örnek miktarı ne kadar fazla ise (>100 mL) etkeni gösterme şansı o kadar artar!

Tüberküloz veya fungal kaynaklı enfeksiyon şüphesinde, **kültür** ve **histopatolojik** inceleme amacıyla plevra **biyopsi** örneği alınması tanı duyarlılığını arttırır!

Tablo 22. Plevra sıvısı örneklerinin alınması, taşınması, kabul/ ret ölçütleri

Örnek alma yöntemi	Taşıma kabı/Miktar	Taşıma süresi ve ısısı	Saklama süresi ve ısısı	Ret ölçütleri
İğne aspirasyonu (torasentez)	Steril tüp (antikoagülan olarak heparin içerebilir); 5-10 mL Aerop ve anaerop kan kültür şişeleri* Anaerop taşıma kabı; >1 mL	<15 dk, oda ısısı	<24 sa, oda ısısı	İğnesi üzerinde enjektör ile gönderilmiş örnek**
	Virüsler için viral taşıma besiyeri; 1 mL	<15 dk, buz üzerinde	>24 sa, -80°C	
	Mikobakteriler için; 5-10 mL	<2 sa, oda ısısı		

* Eğer örnek **sadece** kan kültürü şişesine alınmış ise, bu örnekten Gram boyama yapılamayacağı klinisyene bildirilmelidir.

** İğnesi üzerinde enjektörle laboratuvara gelen örnek, laboratuvar personelinin yaralanma riski nedeniyle önemlidir! İnvaziv girişimle alındığı için hasta açısından rahatsızlık verici bu işlemin tekrarlanması istenmediğinden örnek reddedilmez, ancak klinisyen telefonla aranarak bu tür örneklerin gelecek sefer uygun taşıyıcı kap/besiyeri içine aktarılarak gönderilmesi rica edilir.

Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi

Tüm işlemler BGK içinde yapılmalıdır. Ön tanıda aerosoller ile bulaş olasılığı yüksek etkenlerden (*M. tuberculosis* gibi) şüpheleniliyor ve özellikle bunların kültürlerde üremiş izolatları ile çalışma yürütmek gerekiyorsa asgari BGD2+ laboratuvar şartları sağlanmalıdır.

Makroskopik inceleme

Laboratuvara ulaşan örneğin hacmi ve görünümü kaydedilmelidir. Normal plevra sıvısı açık sarı, saman rengindedir. Örneğin rengi, bulanıklığı, kan veya pıhtı içerip içermediği kontrol edilip kaydedilmelidir. Püy görünümü ampiyem nedenlidir. Klinisyen tarafından apse oluşumu tarif edilmişse ve kötü kokulu örnekse anaerop enfeksiyon açısından anlamlı olabilir. Beyaz/süt gibi bir görünüm ampiyem veya şilotoraks (lenfoma, travma gibi nedenlerle torasik duktusun yıkımı ile lenfatik sıvının plevral boşluğa geçişi) nedenli olabilir. Kanlı sıvı malignite, travma, pulmoner emboli, pnömoni nedenli olabilir.

Laboratuvara gelen pıhtılaşmış plevra sıvısı örnekleri, bakterileri açığa çıkarmak için homojenize edilmelidir. Bakteriler için doku homojenizatörü veya cam doku öğütme makinesi kullanılabilir. Motorlu olanlarda ısı oluşacağı için mikroorganizmalar ölebilir, ideali manüel olanların kullanılmasıdır. Mantarlar için öğütücü önerilmez, mantar hücrelerini serbest bırakmak için pıhtı kıyılmalıdır.

Hücre sayımı

Otomatize hemositometrik ölçümler yapılabilir. Plevral enflamasyonda nötrofiller baskındır. Tüberküloz ve viral enfeksiyonlarda ise lenfosit hâkimiyeti olur. Olgularda, parapnömonik enfeksiyonlarda C-reaktif protein >30 mg/dL düzeyi anlamlıdır.

Örnekler işlemler sonrasında 1 hafta buzdolabında saklanmalıdır!

Santrifüj

Berrak sıvılar santrifüj ya da filtrasyon yoluyla konsantre edilebilir. Sıklıkla örnek 10^5 cfu/mL'den daha az mikroorganizma içerdiği için örneklerin santrifüj ya da sitosantrifüj yoluyla konsantre edilmesi direkt mikroskopilerin duyarlılığını arttırır. Kültür için de santrifüj önerilmektedir. Eğer örnek miktarı santrifüj edilemeyecek kadar az veya santrifüj imkânı yoksa örnek lam üzerine damlatılır ve yayılmadan kuruması beklenir. Ardından yeni bir damla örnek bu örneğin üzerine damlatılarak tekrar kuruması beklenir, tespit edilir ve boyanarak incelenir. Örnek miktarı az veya pürülan ise santrifüj işlemi yapılmadan birkaç damla örnek besiyerine inoküle edilebilir.

Gram boyama

Gönderilen tüm plevra sıvısı örneklerine Gram boya uygulanmalıdır. İki adet preparat hazırlanıp biri Gram boyama yöntemi ile boyanmalı, diğeri saklanmalıdır. Santrifüj sonrası çökeltiden örnek alınarak lam üzerine konur ve yayılmadan kuruması beklenir. Metanol ile tespit edildikten sonra Gram boya ile boyanır. Preparatlarda lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi değerlendirilir.

Gram boyama sonucunda elde edilen sonuç hemen klinisyene bildirilir.

Diğer boyama teknikleri

Aside dirençli boyama

Santrifüj edilmiş örneğin çökeltisinden preparat hazırlanır ya da sitosantrifüj yoluyla hazırlanan preparat kullanılır.

Akridin oranj **kanserojen**dir! Cilt ile temasını önlemek için mutlaka eldiven giyilmelidir!

Auramin-rhodamine boyama

Mikobakterilerin gösterilmesinde duyarlılığı daha yüksek bir yöntem olan floresan boyalarla boyama yapılabilir.

KOH ile inceleme ve kalkoflor beyazı ile boyama

Mantar varlığından şüphelenilen örneklerde KOH (potasyum hidroksit) incelemesi ve kalkoflor beyazı ile boyama uygulanır. Gram boyama da bazı mantar elemanları için faydalıdır.

Akridin oranj boyama

Hücrenin nükleik asitlerine bağlanan florokromatik bir boyadır. Mikroorganizmalarla hücresel materyalleri farklı renklerde boyar. Gram boya ile boyanmayan ya da yoğun artık içinde saptanamayan mikroorganizmaların görülebilmesi için faydalıdır. Gram boyamada olduğu gibi preparat hazırlanır.

Drenaj tüpleri ve uçlarının kültürünün yapılması uygun **değil**dir! Taze örnekten çalışılması gereklidir!

Yalancı negatif kültür sonucu, önceden kullanılmış antibiyotik tedavisine veya sıvının uygunsuz alınmasına bağlı olabilir!

Kültür

Hasta başında aerop ve anaerop kan kültür şişelerine ekim yapılmadıysa gönderilen örnekten laboratuvarda şişelere ekim yapılabilir. Kan kültür şişeleri kullanılmayacaksa örnek santrifüj edildikten sonra çökeltiden kanlı, çikolata agarlara ve beyin kalp infüzyon buyyonuna ya da triptik soy buyyona ekim yapılır (**Tablo 23**).

Az miktarda örnek geldiyse ve santrifüj için yeterli değilse 2-3'er damla örnek besiyerlerine inoküle edilerek steril öze yardımıyla yayılır. Örnek miktarı daha azsa sadece çikolata agara ekim yapılır.

Eğer Gram negatif mikroorganizma üremesi bekleniyorsa veya Gram boyalı preparatlarda Gram negatif mikroorganizma görüldüyse ya da karışık morfolojide bakteri saptandıysa MacConkey agara da ekim yapılır.

Plaklar uygun inkübasyon koşullarında bekletilerek üremeler 4 gün boyunca günlük değerlendirmelerle izlenir.

Tüberküloz plörezi şüphesi varsa örnek LJ besiyerine ve otomatize mikobakteri kültür sistemine ekilir. LJ besiyerleri ilk 4 hafta haftada 2 kez, daha sonraki 4 hafta haftada bir kez olmak üzere toplam 8 hafta koloni oluşumu açısından değerlendirilir (**Tablo 23**).

Koloni varlığı gözlenirse ARB boyama ile basil varlığı değerlendirilir. Otomatize hızlı kültür sistemlerinde ise üremeler daha erken saptanabilir.

Anaerop taşıma sistemi ile gelen örneklerden besiyerlerine inokülasyon yapılarak anaerop koşullarda inkübe edilir. Aerop kültür istemi yapılmamış olsa bile örnekler yine de kanlı ve çikolata agara ekilip aerop koşullarda da inkübe edilmelidir. Anaerop inkübe edilen besiyerleri üreme varlığı açısından 48 saat sonunda değerlendirilir. Üreme gözlenen plaklar veya tüpler 7 gün boyunca buzdolabında saklanır. Tercih edileni ise üreyen suşların –80°C'de saklanmasıdır.

Beyin kalp infüzyon ya da triptik soy buyyonda üreme yokken, **tek bir plakta** 1-2 koloni KNS üremesi varsa tam identifikasyon yapılmayabilir.

Viral kültür

Hücre kültürü pek çok virüs için tanıda altın standart olmakla beraber bazı virüslerin hücre kültürlerinde üretilmeleri mümkün değildir.

Diğer yöntemler

Antijen arama testi

İmmünokromatografik membran testinde idrarda *S. pneumoniae*'nın C-polisakkarit hücre duvar antijenini saptayan kit ile hızlı sonuç alınabilmektedir. İdrarda *L. pneumophila* serogrup 1 antijeni de aranabilir. *C. neoformans* için serumda lateks aglütinasyon yöntemi ile antijen testi yapılabilir. Direkt floresan antikor yöntemi ile plevra sıvısından *L. pneumophila* çalışılabilir.

Antikor arama testi

Özellikle viral etiyolojide, akut ve konvalesan dönemdeki serumda antikor yanıtının incelenmesi faydalı olabilir.

Tablo 23. Plevra sıvısı örneklerinin ekildiği besiyerleri ve inkübasyon koşulları

Besiyerleri	İnkübasyon			Hedef mikroorganizmalar
	Sıcaklık	Ortam	Süre	
Koyun kanlı agar	35-37°C	%5-10 CO_2	4 gün	Çoğu mikroorganizma için uygun
Çikolata agar				
Otomatize kan kültür şişeleri (aerop)		Aerop ortam	5-7 gün	
Otomatize kan kültür şişeleri (anaerop)		Anaerop ortam	5-7 gün	Çoğu anaerop mikroorganizma için uygun
Löwenstein-Jensen		Aerop ortam	6 hafta	Mikobakteriler
Sıvı mikobakteri besiyeri (otomatize sistem)				
Sabouraud dekstroz agar			3-4 hafta, dimorfik mantar kuşkusu varsa 6 hafta	Mantarlar
Beyin kalp infüzyon buyyon				Çoğu mikroorganizma için uygun
Triptik soy buyyon				

Tablo 24. Plevra sıvısında bulunan etkenler için önerilen tanı yöntemleri

Etken	Önerilen tanı yöntemi	Ek tanı yöntemi
S. aureus	Gram boyama, kültür	Kan kültürü
S. pyogenes		
*H. influenzae**		
S. anginosus		
*S. pneumoniae**		İdrarda pnömokok antijeni Kan kültürü
*B. anthracis**		
Enterobacterales		
P. aeruginosa		
Legionella spp.*	Gram boyama, BCYE agarda kültür, DFA	İdrarda *Legionella* antijeni *(L. pneumophila* serogroup 1 için)
B. fragilis grup	Gram boyama, anaerop kültür	
Prevotella spp.		
F. nucleatum		
Peptostreptococcus spp.		
Actinomyces spp.		
Nocardia spp.	Gram boyama, modifiye asit fast boyama, kültür	
*M. tuberculosis***	Asit fast boyama, mikobakteri kültürü, PCR	
Candida spp.	Kalkoflor beyazı-KOH, Gram boyama, mantar kültürü	
Aspergillus spp.	Kalkoflor beyazı, Periyodik asit Schiff, Gomori'nin metenamin gümüşleme, mantar kültürü	Serumda galaktomannan antijeni, BAL örneğinden mikroskopi ve kültür
C. neoformans	Çini mürekkebi ile direkt mikroskopi, mantar kültürü	
H. capsulatum	Kalkoflor-KOH, mantar kültürü, antijen testi	
C. immitis/posadasii	Periyodik asit Schiff ve Gomori'nin metenamin gümüşleme boyaları, mantar kültürü	Serumda IgM ve IgG aranması
B. dermatitidis	Kalkoflor beyazı, Periyodik asit Schiff, Gomori'nin metenamin gümüşleme, mantar kültürü,	Serumda, idrarda ve plevra sıvısında antijen aranması
P. westermani	Direkt mikroskobik inceleme ile yumurta aranması	
*E. histolytica**	Direkt mikroskopik inceleme	
Echinococcus spp*	Direkt mikroskobik inceleme	Serumda özgül antikor aranması
*T. gondii**	Giemsa boyama	Serumda özgül antikor aranması
Coxsackievirus B	RT-PCR	Serumda antikor çalışılması

Kısaltmalar – BAL, bronko-alveolar lavaj; BCYE, buffered charcoal yeast extract agar; DFA, direkt floresan antikor

* Bunlar ülkemizde sürveyans programı kapsamında olan bildirimi zorunlu hastalık etkenlerdir. Bu hastalıkların/etkenlerin tanısı için standart prosedürler UMS (2014) **Cilt I, Cilt II** ve **Cilt III**'de yer almaktadır.

** *M. tuberculosis* tanısı için standart prosedürler UMS(2014) **Ulusal TB Tanı Rehberi**'nde yer almaktadır.

Moleküler yöntemler

Gram boyama ve kültüre ilave olarak uygulanan moleküler yöntemler tanıda faydalı bulunmuştur. Geleneksel yöntemlerle bakteri saptanma başarısı %60 iken moleküler yöntemlerin de kullanılmasıyla %75'e çıkmıştır. Özellikle antibiyotik tedavisi almış olanlarda ve anaerobik enfeksiyonlarda moleküler yöntemler önerilmektedir. Tüberküloz plörezide direkt mikroskopi ve kültüre ek olarak PCR yöntemi kullanılabilir. Bazı virüslere yönelik tekli veya multipleks PCR uygulamaları da mevcuttur. Multipleks PCR aynı anda birden fazla etkeni gösterme şansı sağladığı için tercih edilebilir. Ancak moleküler testler ile alınan negatif sonuçlar etkeni veya tanıyı ekarte ettirmez.

Plevra sıvısında aranan etkenler için önerilen tanı yöntemleri **Tablo 24**'de özetlenmektedir.

Ara raporlar ve panik değerler

Plevra sıvısında mikroskobik incelemede (Gram boyama, fungal boyamalar veya ARB) mikroorganizma görülmesi, kültürlerde üreme olması ve antijen testlerinde veya NAAT ile pozitiflik **panik değer**dir. Bu durumlarda **hemen** klinisyene telefonla haber verilmelidir.

Plevra sıvısında mikroskobik incelemede **mikroorganizma** görüldüğünde kültür sonucunu beklemeden klinisyene **hemen telefon ile** bildirilmelidir!

Sonuçların raporlanması

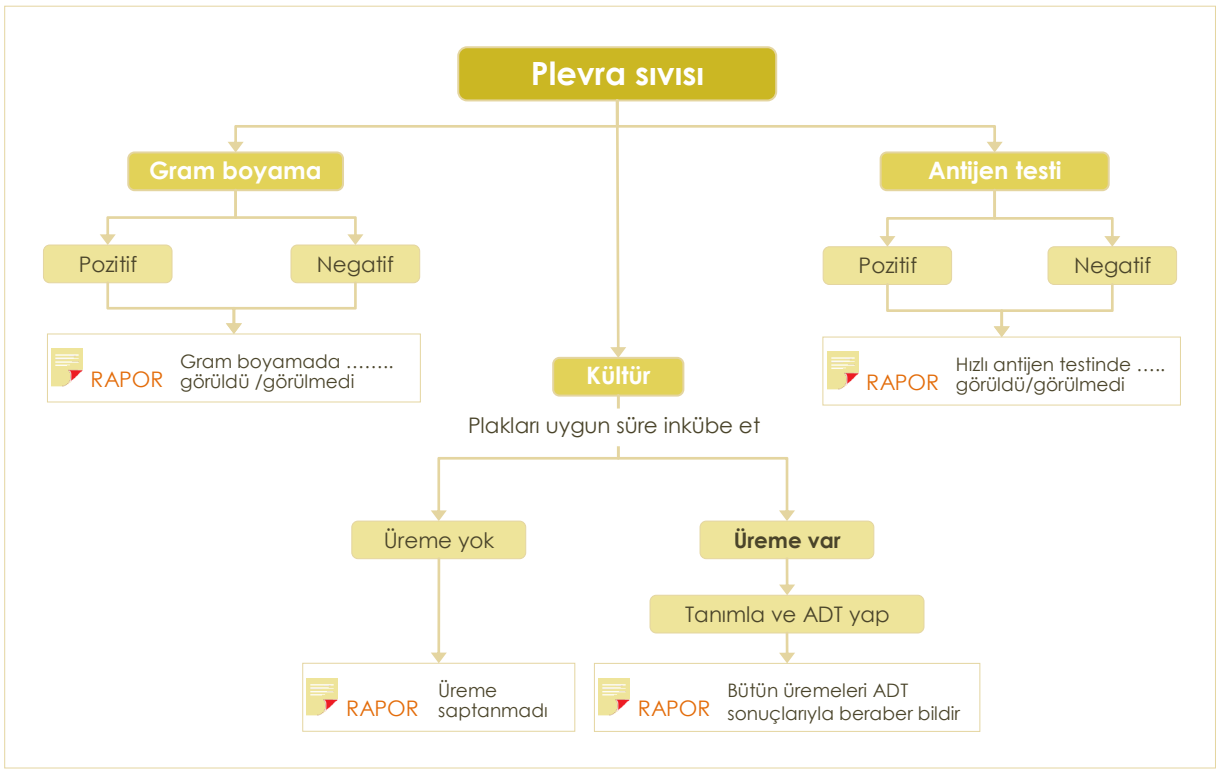
Plevra sıvısı incelemesi için RAPOR örneği – bulunması gereken parametreler

DİREKT İNCELEMELER	
Makroskopik görünüm:	Laboratuvara gelişte kaydedilen örneğe ait ilk makroskopik gözlem bulgusu (berrak, pürülan, hemorajik, vb.) bildirilir.
Hücre sayımı:	Örnekte eritrosit ve lökosit varlığı, mL'deki miktarları ve lökosit tipleri bildirilmelidir.
Gram boyama:	Lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi bildirilmelidir.
Aside dirençli boyama:	TB şüphesi ile inceleniyorsa aside dirençli basil varlığı bildirilmelidir.
Auramin-rhodamine boyama:	Uygun morfolojide sarı-turuncu basil varlığı pozitiflik olarak raporlanır. Negatif sonuç mikobakteri enfeksiyonunu dışlamaz.
Akridin oranj boyama:	Saptanan mikroorganizmalar morfolojisi ile beraber raporlanır. Gram boyalı preparat tekrar değerlendirilir. Eğer Gram boyalı preparatta bakteri görülemiyorsa; "*Örnek akridin oranj boyama ile pozitif ancak Gram boyamada bakteri saptana**ma**dı.*" şeklinde raporlanır. Mikroorganizma saptanmadıysa; "*Akridin oranj boyama ile mikroorganizma saptan**ma**dı.*" şeklinde raporlanır. Bu boyama ile *Mycoplasma* türleri de görülebilir.
KOH ve kalkoflor beyazı boyama:	Mantar elemanları görülür ise raporlanır ve hemen klinisyene haber verilir.
KÜLTÜR	
Negatif sonuç:	İnkübe edildiği gün sayısı ile birlikte rapor edilmelidir. ***Örnek rapor:*** "…….. gün inkübasyon sonrasında üreme saptan**ma**dı."
Pozitif sonuç:	Normalde steril bir bölgeden alınmış olan örnekte, herhangi bir mikroorganizma bulunması anlamlı kabul edilmeli ve tüm izolatlar rapor edilmelidir. Bütün üremeler ADT sonuçlarıyla beraber bildirilmelidir.
MOLEKÜLER YÖNTEMLER	
Negatif sonuç:	"…… DNA/RNA'sı saptan**ma**dı." şeklinde raporlanır.
Pozitif sonuç:	"…… DNA/RNA'sı saptandı." şeklinde raporlanır.

Plevra sıvısı normalde steril bir örnek olması nedeniyle **tüm üremeler anlamlı** kabul edilir ve tanımlanıp ADT sonucuyla birlikte **raporlanır!**

Kontaminasyon düşünülüyorsa *"gerçek enfeksiyon ayrımının yapıla**ma**dığı, bu nedenle yeni örnek istendiği"* **raporlanmalıdır!**

İş akış şeması



Kaynaklar

1. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* 2013;57(4):485-8.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Normally sterile body fluids, bone and bone marrow, and solid tissues. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2007. Chapter 61, p. 904-13.
3. Foster S and Maskell N. Bacteriology of complicated parapneumonic effusions. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13:319–323.
4. Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2010.
5. Karcher DS. McPherson RA. Cerebrospinal, synovial, serous body fluids, and alternative specimens. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011. Chapter 29, p. 480-506.
6. Khan FY, Alsamawi M, Yasin M, etal. Etiology of pleural effusion among adults in the state of Qatar: a 1-year hospital-based study. *East Mediterr Health J* 2011;17:611–618.
7. Light RW. Pleural effusions. *Med Clin North Am* 2011;95:1055–1070.
8. Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. Lower respiratory tract infections. In: Medical Microbiology. 3rd ed. Spain: Mosby; 2004. Chapter 19, p. 217-239.
9. Porcel JM. The diagnostic utility of pleural fluid tests in clinical practice. *Curr Respir Med Rev* 2012;8:383–390.
10. Porcel JM, Light RW. Pleural effusions. *Disease-a-Month* 2013;59:29–57.
11. Utine GE, Ozcelik U, Kiper N, etal. Pediatric pleural effusions: etiological evaluation in 492 patients over 29 years. *Turk J Pediatr* 2009;51:214–219.
12. Villena Garrido V, Ferrer Sancho J, Hernández Blasco L, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Rodríguez Panadero F, Romero Candeira S, Salvatierra Velázquez A, Valdés Cuadrado L; Area de Tecnicas y Trasplantes. SEPAR. Diagnosis and treatment of pleural effusion. *Arch Broncopneumol* 2006;42(7):349-72.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

BÖLÜM 5

PERİTON VE PERİTON DİYALİZİ SIVISI

Giriş

Sağlıklı insanlarda periton boşluğunda iç organların hareketini kolaylaştıracak ve periton yüzeyinin nemliliğini sürdürecek kadar az miktarda sıvı bulunur. Normal periton sıvısı çoğunluğu mononükleer hücreler olmak üzere az sayıda lökosit (<250/mm^3) ve deskuame serozal hücreleri içerebilir. Bu seröz sıvının protein içeriği (<3g/dL) ve özgül ağırlığı (<1.016) düşüktür. Enfeksiyonlar ve enflamasyon esnasında periton boşluğunda sıvı birikmesi olur. Bu durum asit olarak, biriken sıvı da asit sıvısı olarak adlandırılır. Asit sıvısı artmış sayıda enflamatuvar hücre ve yüksek düzeyde protein içerir. Steril koşullar altında uygun bir iğne ile karın duvarından girilerek periton boşluğundan sıvı alınmasına parasentez denir. Peritonun enflamasyonu peritonit olarak adlandırılır ve periton boşluğunun mikroorganizmalarla kontaminasyonu, kimyasallarla irritasyonu veya her ikisi aracılığı ile oluşabilir. Enfektif peritonitler primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere üç kategoriye ayrılır. Sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) ile ilişkili peritonitler ayrı bir kategoride değerlendirilir.

Primer peritonitte görünür herhangi bir enfeksiyon odağı yoktur ve spontan bakteriyel peritonit (SBP) olarak da adlandırılır. Genellikle nefrotik sendromlu çocuklarda ve asiti olan sirozlu tüm yaş grubundaki hastalarda görülür.

Sekonder peritonit, perfore organ, cerrahi/travmatik hasar, bağırsak duvarı bütünlüğünün kaybına neden olan yıkıcı bağırsak hastalığı (ülseratif kolit, karsinoma, apendiks rüptürü gibi), tıkanma ve önceden var olan bir enfeksiyonun (karaciğer apsesi, salpenjit, sepsis gibi) sekeli olarak gelişebilir.

Tersiyer peritonit, sekonder peritonitin başarısız tedavisini takiben gelişen devamlı veya tekrarlayan peritonit olarak tanımlanır. İntraabdominal abse veya tedaviye dirençli patojenler ile ilişkili olabilir.

Periton diyalizi ilişkili peritonit, en sık kullanılan periton diyalizi tipleri olan SAPD, sürekli siklik periton diyalizi (SSPD) ve aralıklı periton diyalizi (APD) ile ilişkili olabilir. Tanısı aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile konulur.

- Lökosit sayısının >100/mm^3 (genellikle PNL >%50) olduğu bulanık periton sıvısı (olguların %98'inde)
- Karın ağrısı (olguların yaklaşık %75'inde)
- Diyalizat kültür pozitifliği

Farklı enfektif peritonitlerde sık görülen etkenler **Tablo 25**'de özetlenmektedir.

Tablo 25. Periton ve periton diyaliz sıvısında bulunabilecek olası etkenler

Enfeksiyon hastalığı		Bakteri		Virüs	Mantar	Parazit
		Aerop	Anaerop			
Primer peritonit	Erişkinlerde	*Escherichia coli* *Klebsiella* spp *S. pneumoniae* *Enterococcus* spp Diğer streptokoklar	Nadir			
	Çocuklarda	*S. pneumoniae* A grubu streptokoklar *E. coli*	Nadir			
Sekonder peritonit	Mide Proksimal ince bağırsak	*E. coli* *Klebsiella* spp. Streptokoklar	Daha az sıklıkta			*E. histolytica* *Strongyloides stercoralis* (Nadir)
	Safra yolları	*E. coli* *Klebsiella* spp *Enterobacter* spp *Proteus* spp *Enterococcus* spp	*Bacteroides fragilis* (Daha az sıklıkta)	CMV		
	Distal ince bağırsak, Kolon	*E. coli* *Klebsiella* spp *Enterobacter* spp *Proteus* spp	*B. fragilis* *Bacteroides* spp *Clostridium* spp *Fusobacterium* spp Gram-pozitif koklar			
	Apandisit (Gangrenöz, nekrotik)	*E. coli* *Klebsiella* spp *Enterobacter* spp *Proteus* spp *P. aeruginosa*				
Tersiyer peritonit		*S. aureus,* KNS *Enterococcus* spp *P. aeruginosa*			*Candida* spp	
Sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar		*S. aureus* *P. aeruginosa* *E. coli* *Klebsiella* spp *Enterobacter* spp *Proteus* spp *Serratia* spp Diğer Gram-negatif basiller			*Candida* spp	
Periton diyalizi ilişkili peritonitler		Stafilokoklar Viridans streptokoklar *Enterobacterales* Diğer Gram-negatif basiller *Mycobacterium* spp (Nadir)	Nadir	CMV	*Candida* spp *Aspergillus fumigatus* *Fusarium* spp.	

Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi

Primer (spontan bakteriyel) peritonit

Spontan bakteriyel peritonit genellikle tek etkenli olup sıklıkla intestinal sistemden kaynaklanan aerop bir mikroorganizma etken olduğundan anaerop kültürlerin tanı değeri azdır.

Sekonder peritonit

Sekonder peritonitte etken patojenler kaynağa göre değişir ve genellikle gastrointestinal floradan kaynaklanır. Sekonder peritonit çoğunlukla çok etkenli olup anaerop flora bakterilerini içerebilir.

Tersiyer peritonit

Tersiyer peritonitte, periton sıvısından mikroorganizma izole edilemez veya düşük derecede virülan mikroorganizmalar (enterokoklar, mantarlar gibi) izole edilebilir.

Periton diyalizi ilişkili peritonit

Diyaliz sıvısının değerlendirilmesi SBP için kullanılan ile temelde aynıdır. Enfeksiyonlar tek etkenli olma eğilimindedir ve anaerop bakteriler nadiren etkendir. Kateter enfeksiyonlarında *S.aureus* ve *P. aeruginosa*, peritonitlerde *S. epidermidis* başta olmak üzere diğer KNS'ler en sık görülen etkenlerdir.

Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Periton ve periton diyaliz sıvısı örnekleri mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalı ve **Tablo 26**'da verilen koşullar sağlanmalıdır.

İyotlu bir preparat ile deri üzerine antisepsi uygulanmalıdır. Sıvının alınacağı bölge %70 etanol ve iyot çözeltisi (%1-2 iyot tentürü veya %10 povidon iyot) ile silinmelidir. İyot tentürü kullanılırsa işlem sonrasında %70'lik etanol ile silinerek uzaklaştırılmalıdır.

Daima mümkün olduğunca çok sıvı gönderilmeli, hiçbir zaman sıvıya daldırılmış bir silgiç gönderil**me**melidir.

Hücre sayımı için sıvı antikoagülan olarak EDTA içeren tüpe alınarak gönderilmelidir.

Örnek alınma sıklığı ve sayısı hastanın klinik durumuna bağlı olup örnek tekrarının sınırlaması yoktur.

Örnek laboratuvara olabildiğince kısa süre içinde taşınmalı ve dondurul**ma**malıdır!

Örnek perkütan iğne aspirasyonu yoluyla alınmalıdır!

Periton diyaliz sıvısı örneği alınırken kültür için **ilk bulanık sıvı**nın alınması önerilir!

Örnek toplandıktan sonra laboratuvara ulaştırılmasına kadar 48 saatten fazla zaman geçmişse örnek işlenmeli fakat rapora "*Örnek alındıktan sonra laboratuvara ulaştırılmasına kadar >48 saat geçmiştir; sonuçlar buna göre yorumlanmalıdır*" gibi bir yorum yazılmalıdır.

Örnek kabı taşıma esnasında sızdırmış ise, örnek işleme alınmalı fakat hekim kontaminasyon olasılığı hakkında uyarılmalıdır.

Tablo 26. Periton sıvısı örneklerinin alınması, taşınması ve ret ölçütleri

Örnek	Alma yöntemi	Taşıma kabı	Taşıma süresi/ısısı	Saklama süresi/ısısı	Ret ölçütleri
Periton sıvısı	Perkütan iğne aspirasyonu veya cerrahi yoluyla; örnek miktarı 10-50 mL	• Anaerop taşıyıcı sistem, • Steril kapaklı sızdırmaz örnek kabı, • Aerop ve anaerop kan kültürü şişeleri*	≤15 dk; oda ısısı	Bakteri kültürü için ≤24 sa/oda ısısı Mantar kültürü için ≤24 sa/4°C	Silgiç ile gönderilmiş örnek Sızdırmış kapta gelen örnek** İğnesi üzerinde enjektör ile gelen örnek***
Periton diyaliz sıvısı	Diyaliz torbası; örnek miktarı en az 50 mL	• Diyalizat torbası daha geniş bir plastik torba içine, bu torba da tek kullanımlık plastik veya diğer bir sızdırmaz kap içine yerleştirilmelidir. • Diyaliz sıvısı enjektöre alınabilir; ancak hasta başında steril sızdırmaz bir tüpe ve/veya kan kültür şişesine* aktarılmalıdır.	≤1 sa; oda ısısı	≤24 sa/4°C	

* Eğer örnek **sadece** kan kültürü şişesine alınmış ise, bu örnekten Gram boyama yapılamayacağı klinisyene bildirilmelidir.

** Sızdırmış kaplarda gelen örnekler işlenebilir, ancak kontaminasyon olasılığının bulunduğu klinisyene bildirilmelidir.

*** İğnesi üzerinde enjektörle laboratuvara gelen periton sıvısı örneği, laboratuvar personelinin yaralanma riski nedeniyle önemlidir! İnvaziv girişimle alındığı için hasta açısından rahatsızlık verici bu işlemin tekrarlanması istenmediğinden dolayı örnek reddedilmez, ancak klinisyen telefonla aranarak bu tür örneklerin gelecek sefer uygun taşıyıcı kap/besiyeri içine aktarılarak gönderilmesi rica edilir. İğnesi çıkarılmış enjektör içinde gönderilen örnek pıhtılaşmış ise örnek işleme alınırken kontamine olabileceğinden ret edilebilir.

Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi

Makroskopik inceleme

Örnek miktarı, rengi, şeffaflığı (berrak/bulanık/opak), viskozite ve pıhtı varlığı kaydedilmelidir. Transüda niteliğindeki sıvılar genellikle saman sarısı renkli ve şeffaftır. Bunun dışında etiyolojiye bağlı olarak kırmızı, kahverengi, yeşil, beyaz veya siyah olabilir.

Gram boyama

Gram boyama için **sitosantrifüjlenmiş sıvı**nın kullanılması önerilmektedir!

Alternatif olarak besiyerine inoküle edilecek santrifüjlenmiş sıvı çökeltisinden Gram boyama için yayma hazırlanabilir fakat sitosantrifüjden daha az hassastır. Bu yöntemde laboratuvara gönderilen >1 mL örnekler 1500×*g*'de 15 dk santrifüjlenmelidir.

Santrifüj işlemi uygulanamayacaksa, Gram boyama öncesinde, temiz bir lam üzerine 1-2 damla örnek koyulmalı, lam üzerinde yayılmadan kurutulmalıdır.

Spontan bakteriyel peritonitte ve SAPD ile ilişkili peritonitlerde periton sıvısında bakteri sayısı 1 cfu/mL kadar düşük olabileceğinden Gram boyama çok yararlı olmayacaktır. Spontan bakteriyel peritonitte 50 mL asit sıvısının santrifüj edildikten sonra, çökeltiden yapılan Gram boyamanın bile duyarlılık oranı yalnızca %10 olarak bildirilmektedir. Gram boyama, yine de tedavinin erken başlatılmasını sağlamada yararlıdır.

Periton sıvısı için klinik olarak kullanılan çeşitli drenaj tüpleri ve uçları kültür için uygun **değildir** ve işleme alınmamalıdır. Kültür için bu aletlerden alınan sıvılar gönderilmelidir!

Gram boyama için sitosantrifüjlenmiş sıvının kullanılması önerilmektedir!

Hücre sayımı

Sıvı berrak ise sulandırılmadan, bulanık veya kanlı ise serum fizyolojik veya diğer uygun sıvılar ile sulandırılarak sayım yapılabilir.

Toplam lökosit sayısı - Özellikle SBP'nin ayırıcı tanısı için istenir. Santrifüjlenmemiş örnekten hücre sayım kamaraları (Neubauer lamı/Thoma lamı) kullanılarak yapılabilir.

Ayırımsal hücre sayımı - Her bir lökosit türü sayılmalı, kaydedilmeli ve sonuç toplamda yüzde olarak ifade edilmelidir. Polimorf nüveli lökositler ve mononükleer lökositler arasındaki ayrımdır. İki şekilde yapılabilir.

- **Hücre sayım kamarası yöntemi:** Özellikle az sayıda lökosit içeren örnekler için önerilmektedir.
- **Boyama yöntemi:** Hücre tipini belirlemek için kullanılır ve sayım kamarasında ayrımı zor olan çok sayıda lökosit içeren örnekler için önerilir. Gram boyamada olduğu gibi, sitosantrifüj veya santrifüj işleminden sonra yayma hazırlanmalı ve havada kurutulmalıdır. Alkol ile tespit edilmeli ve lökosit morfolojisini tanımlamak için uygun olan Wright veya Giemsa-Wright gibi bir boyama yöntemi ile boyanmalıdır.

Asit sıvısının ayırıcı tanısında kullanılabilecek makroskopik ve mikroskobik özellikleri **Tablo 27**'de verilmiştir.

Tablo 27. Asit sıvısının ayırıcı tanısı

Ön tanı	Makroskopik görünüm	Protein (g/dL)	Lökosit (µL)
Piyojenik peritonit	Bulanık veya pürülan	Pürülan ise >25	> 250, PNL hakimiyeti
Tüberküloz peritonit	Berrak, bulanık, hemorajik veya şilöz	>25 (%50)	>1000 (>%70), genellikle >%70 lenfosit
Siroz	Saman sarısı renginde veya safra ile boyalı	<25 (%95)	<250 (%90), mezotelyal hakimiyeti
Malign asit	Saman sarısı renginde, hemorajik, musinöz veya şilöz	>25 (%75)	>1000 (%50), değişken hücre tipleri
Pankreatik asit	Bulanık, hemorajik veya şilöz	Değişken, sıklıkla >25	Değişken

Diğer mikroskobik incelemeler

KOH ve kalkoflor beyazı ile inceleme

Mantar şüphesi varsa yapılabilir. Örnek miktarı >2mL ise sitosantrifüj veya santrifüj (1500-2000×*g*'de 5 dk) işleminden sonra yapılmalıdır.

Ziehl-Neelsen veya auramin-rhodamine boyama

Mycobacterium spp. şüphesi varsa yapılabilir. Örnek miktarı >2 mL ise sitosantrifüj veya santrifüj (3000×*g*'de 15 dk) işleminden sonra yapılmalıdır.

Periton sıvısının kültürü

- Periton sıvısının 2-3 damlası %5 koyun kanlı ve çikolata agara inoküle edilmelidir.
- Çok az miktarda (1-2 damla) örnek alınmışsa yalnızca çikolata agara ekilmeli, Gram boyama yapılmamalıdır.
- Alınan örneğin miktarı raporda belirtilmelidir.
- Örnek 0.5-1 mL ise 10 mL sıvı besiyerine inoküle edilmelidir.
- Örnek yeterli ise hem aerop hem de anaerop şişeye inoküle edilmeli ancak üretici firma tarafından önerilen örnek miktarından daha az konulmamalıdır. Şişelerde bulunan SPS mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkili olabilir.
- Anaerop sıvı besiyeri veya anaerop kan kültür şişesine inokülasyon yapılmamış ise 2-3 damla örnek katı anaerop besiyerine ekilmelidir.
- Rutin kültüre ilave olarak mantar ve mikobakteri kültürü yapılacaksa örnek miktarı dikkate alınmalıdır. Örnek 2mL'den az ise besiyerlerine direkt, fazla ise santrifüjlendikten sonra ekim yapılmalıdır.
- Mantar kültürü için 1500-2000×*g*'de 5 dk, mikobakteri kültürü için 3000×*g*'de 15 dk santrifüjlendikten sonra çökeltiden ekimler yapılmalıdır.

Periton sıvısı bağırsak içeriği ile **kontamine** ise inoküle edilecek besiyerlerine kolistin-nalidiksik asit agar veya fenil-etil alkollü agar ve seçici anaerobik besiyeri de eklenmeli, bu durumda sıvı besiyerlerine ekim yapıl**ma**malıdır!

- Örnek pıhtılı ise önerilen, pıhtı içeren çökeltinin steril doku öğütücüye koyulması, üzerine az miktarda (<0.5 mL) sıvı besiyeri ilave edilerek karışımın nazikçe homojenize edilmesidir. Böylece bakterilerin serbest kalması sağlanır. Mantar kültürü istenmiş ise bu işlem hiflere zarar verebileceğinden yapılmamalıdır.

Periton diyaliz sıvısının bakteri kültürü

Periton sıvısı örneği **2 mL'den fazla ise** ve ayrıca kan kültürü şişelerine alınmamış ise **aerop şişeye**, yeterli miktarda var ise **anaerop şişeye** de inoküle edilmelidir!

- Diyalizat torbası 10-20 kez alt üst edilerek karıştırılmalıdır.
- Giriş portu (kateter ile torbayı birleştiren) povidon iyot ile silinmeli, havada kuruması beklenmeli, 100 mL sıvı çekilerek, 50'şer mL'lik vidalı kapaklı santrifüj tüplerine koyulmalıdır.
- Her bir tüpteki örnek 3000×*g*'de 15 dk santrifüjlenmeli, üst sıvı dikkatli bir şekilde ayrılmalıdır.
- Çökelti 5mL steril fizyolojik tuzlu su ile süspanse edilmeli, çalkalanmalı ve kültür işlemleri için kullanılmalıdır.
- %5 koyun kanlı agar, çikolata agar, MacConkey veya EMB agara çökeltiden birer damla Pastör pipeti kullanılarak inoküle edilmeli ve 5 mL örnek de bir kan kültür şişesine ekilmelidir.

Tablo 28. Periton ve periton diyaliz sıvısı örneklerinin işlenmesi

Direkt mikroskopi	Boyalı mikroskobik inceleme	Kültür için besiyeri (Standart)	İnkübasyon			Değerlendirme zamanı	Hedef mikroorganizma	Özel durumlar
			Sıcaklık	Ortam	Süre			
Hücre sayımı (Periton sıvısında isteğe bağlı)	Gram boyama	%5 KKA ve Çikolata agar	35-37°C	%5-10 CO_2	4 gün	Günlük	Herhangi bir mikroorganizma	
		MacConkey veya EMB agar		Aerop			Gram negatif bakteriler	Anaerop kültür sadece sekonder bakteriyel peritonitlerde veya klinik endikasyon varsa yapılmalıdır.
		Anaerop KKA Kanamisin-vankomisinli lize kanlı agar		Anaerop	En az 2 gün	2 günde bir	Klinik olarak anlamlı tüm anaeroplar *Bacteroides* spp. *Fusobacterium* spp. *Prevotella* spp.	
		Aerop kan kültür şişesi		Aerop	5-7 gün	Üretici firma önerisine göre	Herhangi bir mikroorganizma	Sekonder peritonitlerde kültür öncesi Gram-boyamada birden fazla morfolojiye sahip mikroorganizmalar görülürse, kan kültür şişelerine ekilmemelidir.
		Anaerop kan kültür şişesi Anaerop beyin-kalp infüzyon		Anaerop			Herhangi bir mikroorganizma	Anaerop kültür sadece sekonder bakteriyel peritonitlerde veya klinik endikasyon varsa yapılmalıdır.
		Bacteroides safra eskulin agar		Anaerop	2 gün (daha uzun süre gereke bilir)	2 gün	*B. fragilis* grup *Bilophila wadsworthia Fusobacterium* spp.	Anaerop kültür **sadece** sekonder bakteriyel peritonitlerde veya klinik endikasyon varsa yapılmalıdır.
		KNAA veya Fenil-etil alkollü agar			En az 2 gün		Anaerop Gram pozitif bakteriler	Mikroskobik değerlendirme karışık enfeksiyonu düşündürüyor ise ekilmelidir.
		KNAA		%5-10 CO_2	4 gün	Günlük	Aerop Gram pozitif bakteriler	
	ARB veya Auramin-fenol boyama	Sıvı besiyeri (otomatize sistem)		Aerop	6 hafta	Üretici firma önerisine göre	Mikobakteriler	Klinik endikasyon varsa ekilmelidir.
		LJ				Haftalık		
	Gram boyama KOH ve Kalkoflor beyazı ile inceleme	Beyin-kalp infüzyon agar	22-26°C 35-37°C	Aerop	3-4 hafta	Günlük	Mantarlar	Rutin bakteriyel kültür, kan kültür şişeleri kullanılmış ise veya örnek santrifüjlenir ise *Candida* spp. izolasyonu için yeterlidir. İlave mantar kültürü klinik endikasyon varsa yapılmalıdır.
		İnhibitör mold agar						

Kısaltmalar – KKA, koyun kanlı agar; KNAA, Kolistin-nalidiksik asit agar

Tablo 29. Periton sıvılarında bulunan olası etkenler için önerilen tanı yöntemleri

Etken	Önerilen tanı yöntemi	Ek tanı yöntemi
Bakteriler	Gram boyama, kültür	
Mikobakteriler	Ziehl-Neelsen boyama, auramin-fenol boyama, kültür	Periton biyopsisi; periton sıvısı, aspirat veya dokudan NAAT
Mantarlar	Gram boyama, KOH ile inceleme, kalkoflor beyazı ile boyama, kültür	
Virüsler	Moleküler yöntem	Seroloji
Parazitler	Periton sıvısının mikroskobik incelemesi	Gaita, safra ve duodenal aspirat sıvılarının mikroskobik incelemesi

Periton diyaliz sıvısının mikobakteri ve mantar kültürü

- Mikobakteri ve mantar kültürleri klinik endikasyon varsa yapılmalıdır. Kültürler paralel veya ardışık yapılabilir.
- Paralel kültürler için, çökelti hem mikobakteri hem mantar besiyerlerine aynı gün inoküle edilmelidir. Aside-dirençli yayma, kalkoflor beyazı ile boyama veya KOH preparatları pozitif ise yapılmalıdır.
- Ardışık kültürler için konsantre diyalizat +4°C'de 5 gün saklanmalı; bakteri kültürleri negatif çıkarsa ve hasta tedaviye yanıt vermezse mikobakteri ve mantar kültürleri yapılmalıdır.
- Uygun besiyerlerine ekimler yapıldıktan sonra **Tablo 28**'de verilen inkübasyon koşulları sağlanmalıdır.

Moleküler yöntemler

Periton sıvısı kültürde zor üreyen veya üremeyen bakterileri içeriyorsa ya da kültür öncesinde antimikrobiyal tedaviye başlanmış ise kültür sonuçları negatif olabilir. Bu durumda PCR patojenin cins ve tür düzeyinde tanımlanmasına yardımcı olabilir. Kültürün yerine kullanılmamalı mutlaka kültür ile birlikte yapılmalıdır. Kültür negatif olduğunda PCR için 1-2 mL örnek toplanmalı ve çalışılıncaya kadar -80°C'de saklanmalıdır.

Periton ve periton diyaliz sıvısında bulunan olası etkenler için önerilen tanı yöntemleri **Tablo 29**'da verilmiştir.

Sonuçların yorumlanması

- Periton sıvısı kültürlerinde, sıvı besiyerinde üreme yokken katı bir besiyerinde bir veya iki koloni KNS üremesi varsa tür düzeyinde tanımlama yapıl**ma**malıdır.
- Kültür karışık gastrointestinal mikroorganizmaları içeriyorsa ve baskın mikroorganizma yoksa, özellikle çok etkenli olma eğiliminde olan sekonder peritonitlerde,

  "karışık aerop ve anaerop bağırsak florası üredi"

  gibi genel bir açıklama yazılmalı; tüm mikroorganizmalar tür düzeyinde tanımlan**ma**malıdır.

Periton diyalizi ilişkili peritonitli vakalarda, **kültür negatiflik oranı**nın %10'un altında olması idealdir.

%20'den fazla ise kültür yöntemleri gözden geçirilmeli ve düzeltilmelidir!

- Bununla birlikte, MRSA, beta-hemolitik streptokoklar, çoğul dirençli Gram negatif basiller ve VRE gibi bazı bakteriler ampirik antimikrobiyal tedavinin yönlendirilmesi için seçilerek tanımlanmalıdır. Geleneksel tedaviye yanıt vermeyen hastalarda dirençli organizmaların ve intraabdominal abse varlığının araştırılması için ilave örnekler alınmalıdır.
- Hastanın cildinde bulunan mikroorganizmalar (*S. aureus* ve diğer stafilokoklar gibi) diyaliz ilişkili peritonitlerin de en sık nedenidir ve az sayıda bulunduklarından enfeksiyon ile kontaminasyon ayrımını yapmak zordur. Klinik korelasyon göz önünde bulundurulmalıdır. Kültür sonuçları Gram boyama sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir.
- Diğer göstergelerin varlığına rağmen kültür sonuçları negatif çıkarsa, zor ve yavaş üreyen *Mycobacterium* spp., mantarlar, *Chlamydia trachomatis* veya *Neisseria gonorrhoeae* gibi diğer patojenler araştırılmalıdır.
- Tüberküloz peritoniti oldukça nadir olarak saptanır. Tanıda optimal koşullar altında bile asidik sıvının mikobakteriyel kültürünün duyarlılık oranı yaklaşık %50'dir. Tüberküloz peritonitinin tanısında periton biyopsi örneğinin kültürü ve histolojik özelliklerinin birlikte değerlendirilmesi ile duyarlılık oranı %100'e yaklaşır.

Eğer karışık abdominal flora üremişse, **raporlarken;** organizma gruplarını ve bazı önemli mikroorganizmaları belirtecek şekilde

"C. perfringens ve *S. aureus*'u içeren çeşitli enterik basiller ve karışık anaerop flora üredi"

gibi genel bir ifade yazılması yeterli olabilir!

- Periton diyalizi ilişkili peritonitli vakaların % 5-10'unda kültür sonuçları negatif olabilir. Diyaliz sıvısının sabit akışı ile mikrobiyal yoğunluğun azalması, zor ve geç üreyen mikroorganizmaların etken olması, hastanın kültür öncesinde antimikrobiyal tedavi alması ve uygun olmayan kültür tekniği negatif kültür sonuçlarına neden olabilir.
- İlave testler için pozitif kültür plakları veya tüpleri en az yedi gün veya tercihen izolatlar dondurularak daha uzun süre saklanmalıdır.

Ara raporlar ve panik değerler

Ön testler tamamlanınca en kısa sürede (muhtemel cins ve tür düzeyinde) **raporlanmalıdır**!

- Mikroskobik incelemede herhangi bir mikroorganizma saptandığı zaman kliniğe/diyaliz ünitesine **hemen telefonla** ve hastane/laboratuvar bilgi sistemi ile bildirilmelidir!
- Ön testler tamamlanınca en kısa sürede (muhtemel cins ve tür düzeyinde) **rapor edilmelidir**!
- Periton diyaliz sıvısı için **tüm pozitif kültür sonuçları** Enfeksiyon Kontrol Komitesine ve Diyaliz Ünitesine bildirilmelidir!

Mikroskobik incelemede herhangi bir mikroorganizma saptandığı zaman **hemen** kliniğe/diyaliz ünitesine **telefonla** bildirilmelidir!

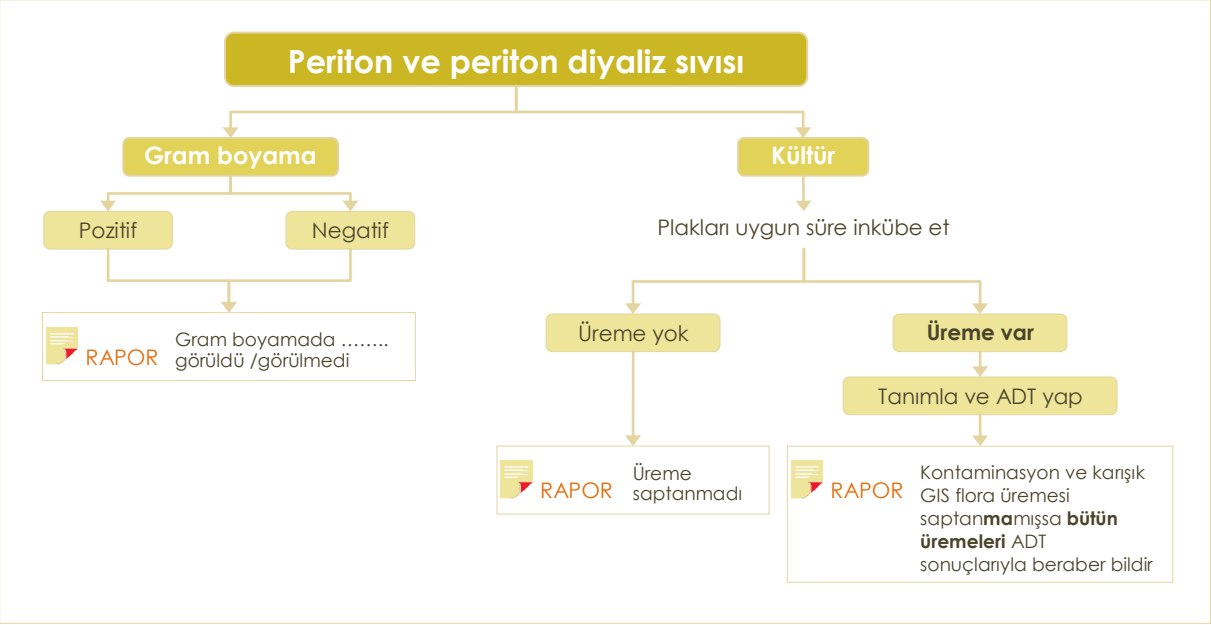
Periton diyaliz sıvısının **tüm pozitif kültür sonuçları** Enfeksiyon Kontrol Komitesine ve Diyaliz Ünitesine bildirilmelidir!

Sonuçların raporlanması

Periton ve periton diyalizi sıvıları incelemesi için RAPOR örneği – bulunması gereken parametreler

DİREKT İNCELEMELER	
Makroskopik inceleme:	Laboratuvara gelişte kaydedilen örneğe ait gözlem bulguları -örnek miktarı, rengi, berrak veya bulanık olması, viskozite ve pıhtı varlığı gibi makroskopik özellikleri- rapor edilmelidir.
Mikroskopik inceleme:	Hücre sayısı (yapılmışsa) lökosit sayısı x10^6/L şeklinde yazılmalıdır. Ayrıca PNL ve MNL sayısının toplam lökosit sayısındaki yüzdesi de bildirilmelidir.
Gram boyama:	Mikroorganizma ve lökosit varlığı veya yokluğu rapor edilmelidir.
Ziehl-Neelsen veya auramin-fenol boyama:	*Mycobacterium* spp. görülürse rapor edilmelidir.
KOH inceleme, kalkoflor beyazı boyama:	Mantar elemanları görülür ise rapor edilmelidir.
KÜLTÜR	
Negatif sonuç:	İnkübe edildiği gün sayısı ile birlikte rapor edilmelidir. ***Örnek rapor:*** "…….. gün inkübasyon sonrasında üreme saptanmadı."
Pozitif sonuçlar:	• Klinik endikasyon varsa ve kontaminasyon saptan**ma**mış ise üreyen tüm mikroorganizmalar uygun ADT sonuçları ile birlikte rapor edilmelidir. • Kontaminasyondan şüpheleniliyorsa, rapora; "*Kontaminasyon ile gerçek enfeksiyon ayrımı yapılamamıştır, uygun bir şekilde alınan örnek ile kültür tekrarı önerilir*" şeklinde bir not eklenmelidir. • Ek inceleme sonuçları da rapor edilmelidir.

İş akış şeması



Kaynaklar

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Body fluid analysis for cellular composition; proposed guideline. CLSI document H56-P [ISBN 1-56238-575-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania. 2005.
2. Collins L. Examination of body fluids: preparation of slides and cell morphology. *Clin Lab Sci* 2009; 22(1):49-53.
3. Fish DN. Intraabdominal infections. In: Helms RA, Quan DJ, Herfindal ET, Gourley DR, (eds). Textbook of Therapeutics: Drug and Diseae Management. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1984-2001.
4. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Normally sterile body fluids, bone and bone marrow, and solid tissues. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2007. p. 904-913.
5. Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook 3rd ed. Washington: ASM Press; 2010.
6. Glickman RM. Abdominal swelling and ascites. In: Krasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, (eds). Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 243-246.
7. Health Protection Agency (2015). Investigation of continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid. UK Standards for Microbiology Investigations. B 25 Issue 6. Erişim t: 25 Mayıs 2020. https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-25-investigation-of-continuous-ambulatory-peritoneal-dialysis-fluid
8. Health Protection Agency (2018). Investigation of fluids from normally sterile sites. UK Standards for Microbiology Investigations. B 26, Issue 6.2. Erişim t: 25 Mayıs 2020. https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-26-investigation-of-fluids-from-normally-sterile-sites
9. Levison ME, Bush LM. Peritonitis and intraperitoneal abscesses. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. New York: Elsevier/Churchill Livingstone; 2010. p.1011-1034.
10. Li PK, Szeto CC, Piraino B, Bernardini J, Figueiredo AE, Gupta A, et al. Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update. *Perit Dial Int* 2010; 30:393-423.
11. Merck Manuel. Erişim t: 26 Mayıs 2020. http://www.merckmanuals.com/professional/genitourinary_disorders/renal_replacement_therapy/peritoneal_dialysis.html
12. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Uptade by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis 2018;67(6):813-816.*
13. Mount Sinai Hastanesi Klavuzu. Erişim t: 26 Mayıs 2020. https://eportal.mountsinai.ca/Microbiology/manual/sfld/mi_sfld.pdf
14. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. (Çeviri ed, Başustaoğlu A. Klinik Mikrobiyoloji). Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009.
15. Runyon BA. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ (eds). Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 9th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p.1517–41.
16. Shulman LM, Rudich C, Sayar Y, Goldfeld G, Mendelson E, Blau A, Vonsover A. Detection of CMV-DNA in cells from peritoneal fluid of IPD/CAPD patients by polymerase chain reaction. *Adv Perit Dial* 1992; 8:258-64.
17. Siegenthaler W. Differential diagnosis in internal medicine: from symptom to diagnosis. New York: Thieme Publishers; 2007. p. 150-201.
18. Teitelbaum I, Burkar J. Core curriculum in nephrology peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 2003; 42:1082-96.
19. Tolkoff-Rubin N. Geri dönüşümsüz böbrek yetmezliğinin tedavisi. In: Goldman L, Ausiello D (eds). Cecil Medicine (Çeviri ed. Ünal S). 23. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2011. s. 936-47.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

BÖLÜM 6

AMNİYON SIVISI

Giriş

Amniyon sıvısı fetüsün gelişimi sırasında onu çevreleyen, bebeğin korunmasını ve beslenmesini sağlayan sıvıdır. Amniyon sıvısı, bebeğin cilt, solunum sistemi, sindirim sistemi ve boşaltım sisteminden dökülen hücrelerin olduğu bir sıvıdır. Normalde steril olan sıvının enfeksiyonu anne ve bebek için mortalite ve morbidite nedenidir.

Klinik örnek mikroorganizma ilişkisi

Amniyon sıvısı normalde steril bir sıvıdır ve mikroorganizma bulunmaz. Bakteri üremesi durumunda örneğin alınması sırasındaki kontaminasyon riski dikkate alınarak etken olup olmadığına karar verilmelidir (**Tablo 30**).

Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Amniyon sıvısı amniyosentez ile aspire edilerek veya sezeryan sırasında en az 3 mL örnek alınıp steril tüpte ve/veya anaerop taşıma sistemi içinde laboratuvara gönderilmelidir. Örneğin taşınması veya işlenmesinde gecikme olacaksa oda ısısında saklanmalıdır. Virolojik çalışmalar yapılacaksa +4°C'de 24 saat, daha uzun süreler için -80°C'de saklanabilir (**Tablo 31**).

Örneklerin uygulanacak yönteme göre işlenmesi

Makroskopik inceleme

Sıvının rengi, bulanıklığı, kan veya pıhtı içerip içermediği kontrol edilip kaydedilmelidir.

Santrifüj

Klinik örnek 1 mL'den az ise santrifüj yapılmamalıdır. Biri yedek olmak üzere iki preparat hazırlanmalı ve aşağıdaki kültür ortamlarına ekim yapılmalıdır. Eğer örnek 1mL'den fazla ise 1500×g'de 15-20 dk santrifüj edilmelidir. 2-3 damla örnek sitosantrifüj de yapılabilir.

Eğer *santrifüj* ya da *sitosantrifüj* olanağı **yoksa** lam üzerine bir damla örnek damlatılıp kuruduktan sonra üzerine tekrar damlatılarak incelenecek örnek yoğunlaştırılmak suretiyle Gram boyama yapılabilir!

Tablo 30. Amniyon sıvısında bulunabilecek olası etkenler

Bakteri		Virüs	Parazit
Ureaplasma urealyticum *Mycoplasma hominis* *Bacteroides* spp. *Gardnerella vaginalis* *S. agalactiae* *Peptostreptococcus* spp. *E. coli* *Enterococcus* spp.	*Fusobacterium* spp. *H. influenzae** *H. parainfluenzae* *L. monocytogenes** *N. gonorrhoeae** *Pasteurella bettyae* *S. pyogenes* *Streptococcus anginosus* group	Herpes simplex virus Cytomegalovirus Rubella virus* Parvovirus B19 Varicella zoster virus HIV*	*T. gondii**

* Bunlar ülkemizde sürveyans programı kapsamında olan bildirimi zorunlu hastalıkların etkenlerdir. Bu etkenlerin tanısı için standart prosedürler UMS(2014) **Cilt I**, **Cilt II** ve **Cilt III**'de yer almaktadır.

Tablo 31. Amniyon sıvısı örneklerinin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Örnek alma yöntemi	Taşıma kabı ve miktar	Taşıma süresi/ısısı	Saklama süresi/ısısı	Ret ölçütleri
Amniyosentez, Sezeryan	Steril tüp, Anaerop transport sistemi; 3 mL	<2 sa; Oda ısısı	<24 sa; Oda ısısı	Yok

Tablo 32. Amniyon sıvısı için kültür besiyerleri ve inkübasyon koşulları

Besiyerleri	İnkübasyon			Etken
	Sıcaklık	Atmosfer	Süre	
Koyun kanlı agar EMB Agar veya MacConkey agar	35-37°C	Aerop ortam	48 sa	Aerop bakteriler
Çikolata agar		%5-10 CO_2		*N. gonorrhoeae*
Tiyoglikolatlı besiyeri		Anaerop ortam	5 gün	Anaerop bakteriler
Anaerop kanlı agar			48 sa	
Antibiyotikli anaerop kanlı agar				

Gram boyama

İki adet preparat hazırlanıp biri Gram boyama yöntemi ile boyanmalı, diğeri saklanmalıdır. Lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi değerlendirilmelidir.

Kültür

Steril bir pipet ile çökeltiden veya direk örnekten **Tablo 32**'de belirtilen besiyerlerine inoküle edilmelidir. Tek koloni düşürmek için, steril bir öze ile inokulum yayılmalıdır. 24 ve 48 saat inkübasyonlar sonunda incelenen kültür plaklarında üreme varsa üreyen bütün izolatlar tanımlanmalı ve duyarlılık testleri uygulanmalıdır.

Hücre ve doku kültürü

Amniyon sıvısının viral ve paraziter enfeksiyonlarının tanısı için altın standart yöntemdir ancak rutin laboratuvarlar için uygun değildir.

Moleküler yöntemler

Amniyon sıvısının PCR analizi viral ve paraziter enfeksiyonların hızlı tanısı için tercih edilir.

Ara raporlar ve panik değerler

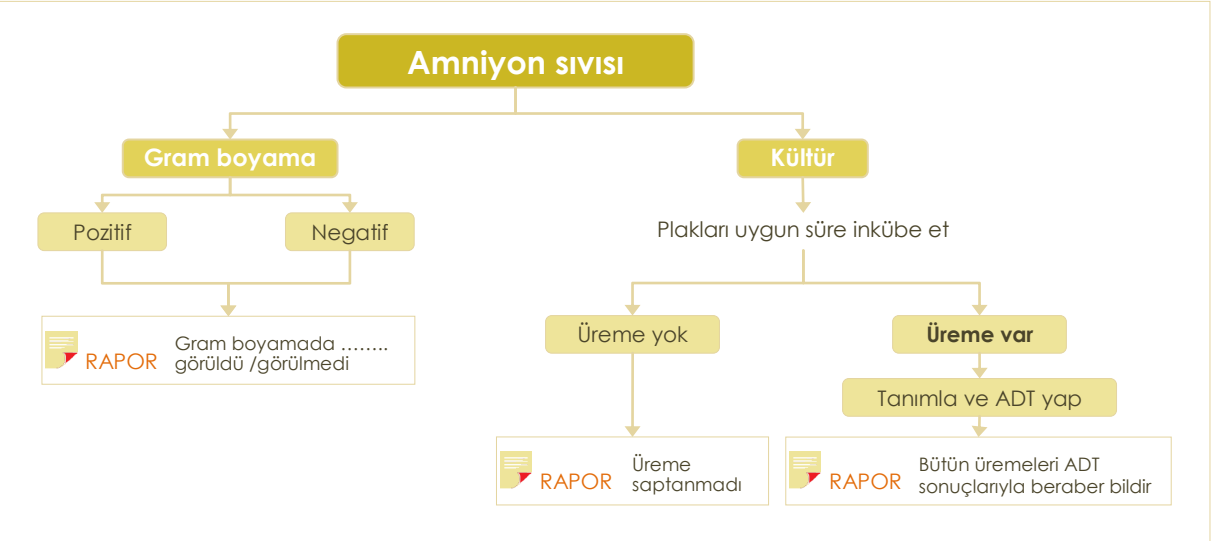
Gram boyalı mikroskopide herhangi bir mikroorganizma saptandığı zaman kliniğe **hemen telefonla** ve hastane/laboratuvar bilgi sistemi ile bildirilmelidir.

Sonuçların raporlanması

Amniyon sıvısı incelemesi için RAPOR örneği – bulunması gereken parametreler

DİREKT İNCELEMELER	
Makroskopik inceleme:	Laboratuvara gelişte kaydedilen örneğe ait gözlem bulguları (örnek miktarı, rengi, berrak veya bulanık olması, kan veya pıhtı içerip içermediği vb) rapor edilmelidir.
Gram boyama:	Lökosit varlığı ve türü, mikroorganizma varlığı, Gram boyanma özelliği ve morfolojisi rapor edilmelidir.
KÜLTÜR	
Negatif sonuç:	"Üreme saptanmadı." şeklinde raporlanır.
Pozitif sonuç:	Bütün üremeler ADT sonuçlarıyla beraber bildirilmelidir.
MOLEKÜLER YÖNTEMLER	
Negatif sonuç:	"..... DNA/RNA'sı saptan**ma**dı." şeklinde raporlanır.
Pozitif sonuç:	"..... DNA/RNA'sı saptandı." şeklinde raporlanır.

İş akışı şeması



Kaynaklar

1. Abdel-Razeq SS, Buhimschi IA, Bahtiyar MO, Rosenberg VA, Dulay AT, Han CS, et al. Interpretation of amniotic fluid white blood cell count in "bloody tap" amniocentesis in women with symptoms of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2010; 116:344-54.
2. Garcia LS, Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2010.
3. Health Protection Agency. (2017). Investigation of genital tract and associated specimens. UK Standards for Microbiology Investigations. B 28, Issue 4.6. Erişim t: 10 Mayıs 2020. https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-28-investigation-of-genital-tract-and-associated-specimens
4. Health Protection Agency. (2018). Investigation of fluids from normally sterile sites. UK Standards for Microbiology Investigations. B 26, Issue 6.2. Erişim t: 10 Mayıs 2020. https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-26-investigation-of-fluids-from-normally-sterile-sites
5. Karcher DS. McPherson RA. Cerebrospinal, synovial, serous body fluids, and alternative specimens. In: McPherson RA, Pincus MR, (eds). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011.
6. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Uptade by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis* 2018;67(6):813-816.
7. Mount Sinai Hastanesi Klavuzu. Erişim t: 10 Mayıs 2020. https://eportal.mountsinai.ca/Microbiology/manual/sfld/mi_sfld.pdf
8. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. (Çeviri ed. Başustaoğlu A. Klinik Mikrobiyoloji). Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009.
9. WHO Blood Safety and Clinical Technology. Guidelines on standard operating procedures for microbiology: Collection and transportation of clinical specimens. Chapter 2. Erişim t: 18 Mayıs 2020. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205200/B0217.pdf?sequence=1&isAllowed=y
10. Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. UK: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 92-5.

www.klimud.org

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLIMUD)
Meşrutiyet Cad. Kültür Apt. No: 38/15 Kat: 7 Kızılay-Ankara/Türkiye
Tel: +90 312 230 78 18 • +90 530 693 86 67
info@klimud.org • klimud@gmail.com