

Pozitif Kan Kültürü Ş  elerinden Direkt Gram Boyaması ve Antibiyogram: Ne Kadar Yararlı?

Dr. Serap Şimşek-Yavuz

**İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD**

serapsimsekyavuz@gmail.com



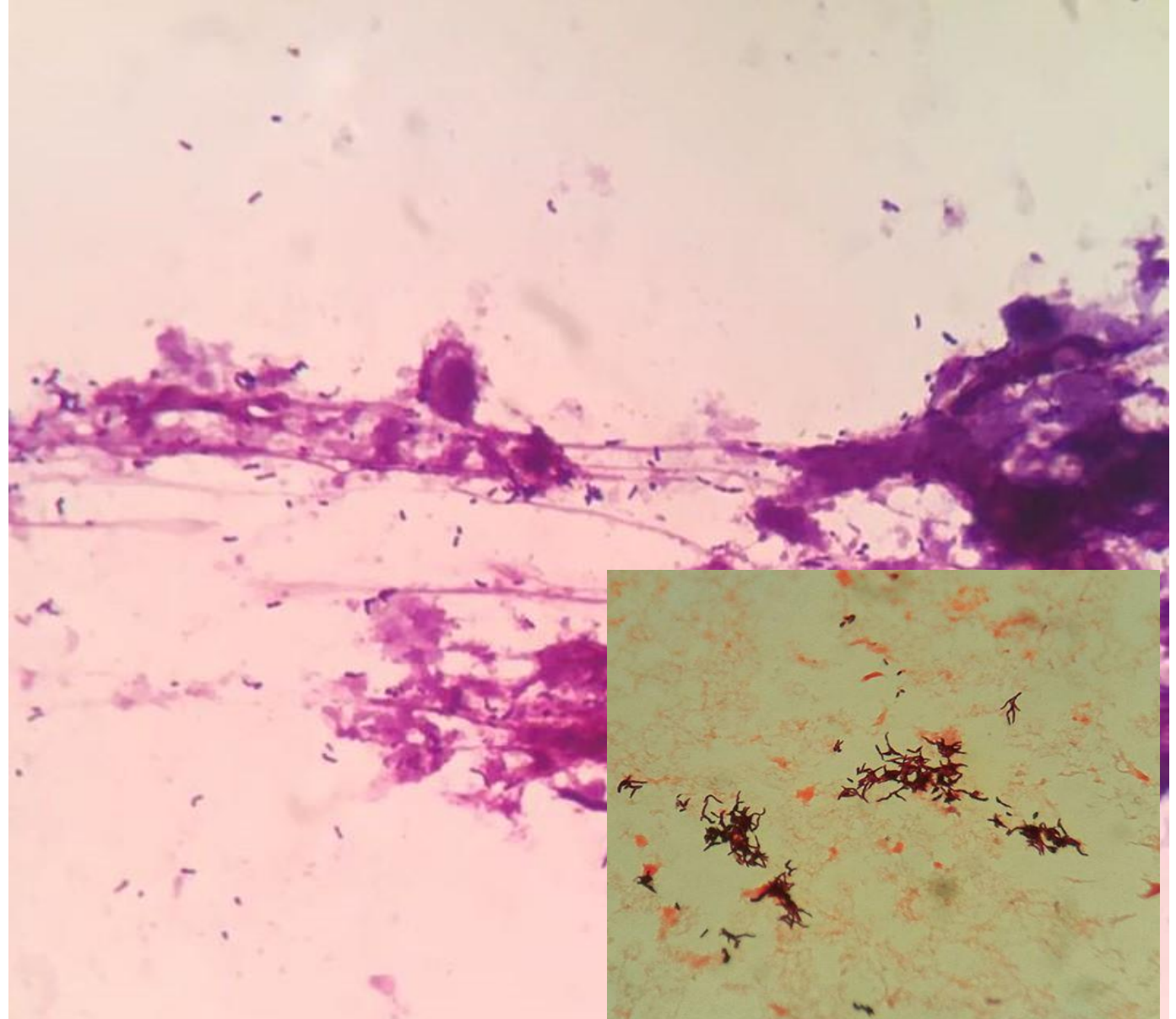
Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Direkt Gram Boyaması ve Antibiyogram: Ne Kadar Yararlı?

- **Sunum planı**

- Olgular
- Pozitif kan kültürü şişelerinde hızlı tanımlama ve antibiyogramın neden gerektiği
- Pozitif kan kültürü şişelerinde hızlı tanımlama ve antibiyogram için kullanılan testler ve karşılaştırılması
- Pozitif kan kültürü şişelerinde hızlı tanımlama ve antibiyogramın klinik sonuçlara etkisi
- Bu testlerin en etkili ne şekilde kullanılabileceği

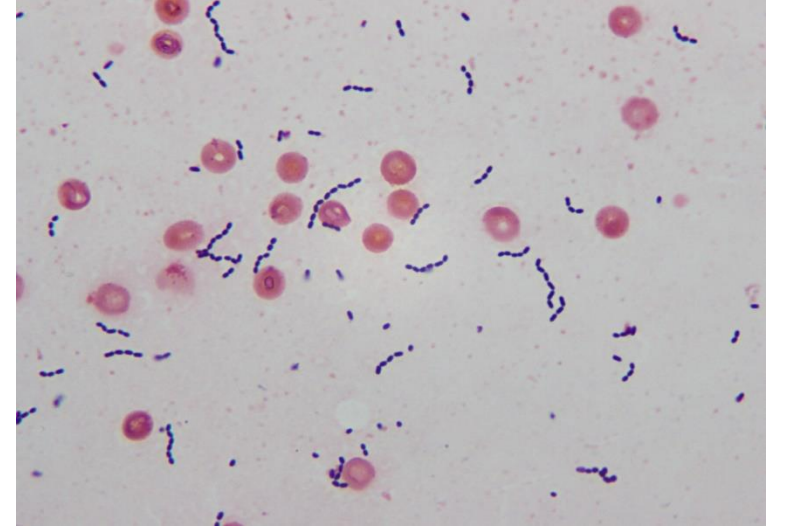
Olgu 1

- AK, 78 yaşında erkek
- Yakınmalar: Bel ağrısı, yürürken zorlanma
- 1 ay önce L4-L5 disk hernisi opr.
- MR'da L-4-L5'te spondilodiskit ve apse
- Anaerob kan kültürlerinde 6. günde uyarı
- Katı besiyeri pasajlarında üreme yok
- Şişeden ve apseden Gram boyaması:
Gram pozitif, pleomorfik, küme çomaklar
- Tahminimiz: *Cutibacterium*
(*Propionibacterium*) *acnes*: Uygun tedavi
başlandı
- MALDI-TOF tanımlama: *Cutibacterium*
(*Propionibacterium*) *acnes*



Olgu 2

- SG, 37 yaşında kadın
- Yakınmaları: Ateş, halsizlik, kilo kaybı
- Öykü: 6 aydır yakınmaları var
- FM'de: 2/6 sistolik üfürüm
- 3.gün kan kültürlerinde Gram-pozitif zincir yapmış koklar
- Katı besiyeri pasajında üreme yok
- Tahminimiz: *Abiotrophia defectiva*: SAM yerine PG'ye geçildi (de-eskalasyon)
- MALDI-TOF tanımlama: *Abiotrophia defectiva*

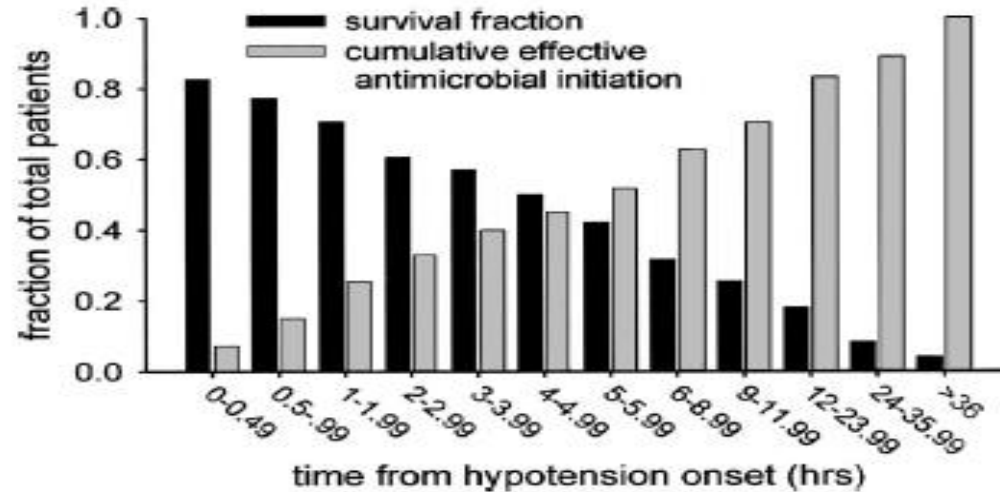


Olgu 3

- HÜ, 29 yaşında kadın
- Yakınma: Ateş ve döküntü
- Öz geçmişi: Atipik HÜS, Renal transplantasyon (2015)
- Sürekli kullandığı ilaçlar: Eculizumab, Deltacortril, Mikofenolat mofetil, Takrolimus
- FM: Vücut sıcaklığı 38.5 C⁰derece, az sayıda purpurik döküntü
- 2.gün kan kültüründe üreme uyarısı haberi: Gram negatif kokobasil??
- Tahminimiz: *Neisseria meningitidis*: Uygun tedavi başlandı
- MALDI-TOF tanımlama: *Neisseria gonorrhoeae*

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Bakterilerin Hızlı Tanımlanması Neden?

- Erken uygun antimikrobiyal tedavi sepsisli hastalarda mortaliteyi azaltır
- Uygun tedavideki her 1 saatlik gecikme sağ kalımı %8'lik azaltıyor



Kumar A.. Chest. 2009;136(5):1237-1248.

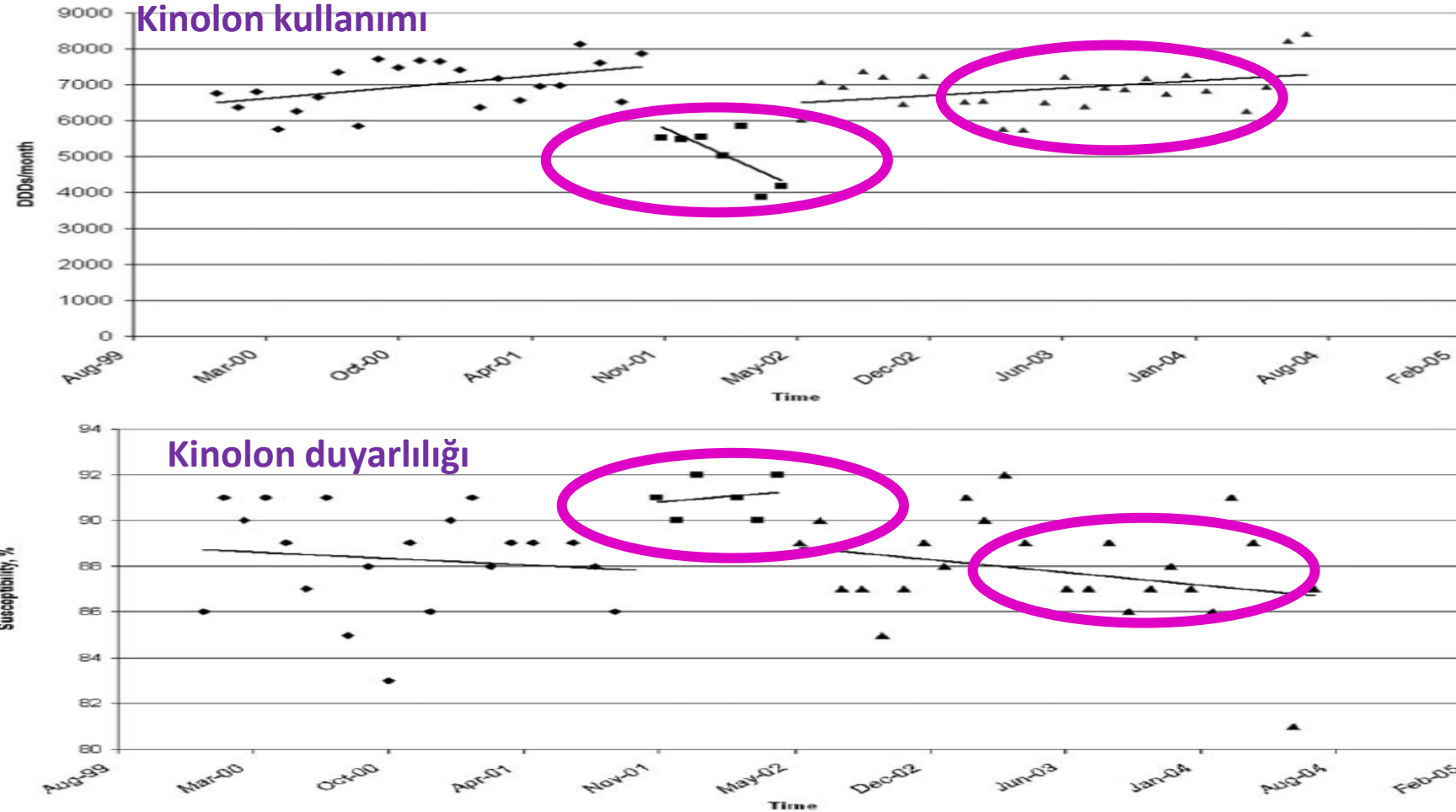
Kumar A. Crit Care Med. 2006;34(6):1589-1596.

Cosgrove SE. Clin Infect Dis. 2006;42(suppl 2):S82-S89

Ferrer R. Crit Care Med 2014; 42:1749-1755

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Bakterilerin Hızlı Tanımlanması Neden?

- Aşırı antibiyotik kullanımı dirençle ilişkili



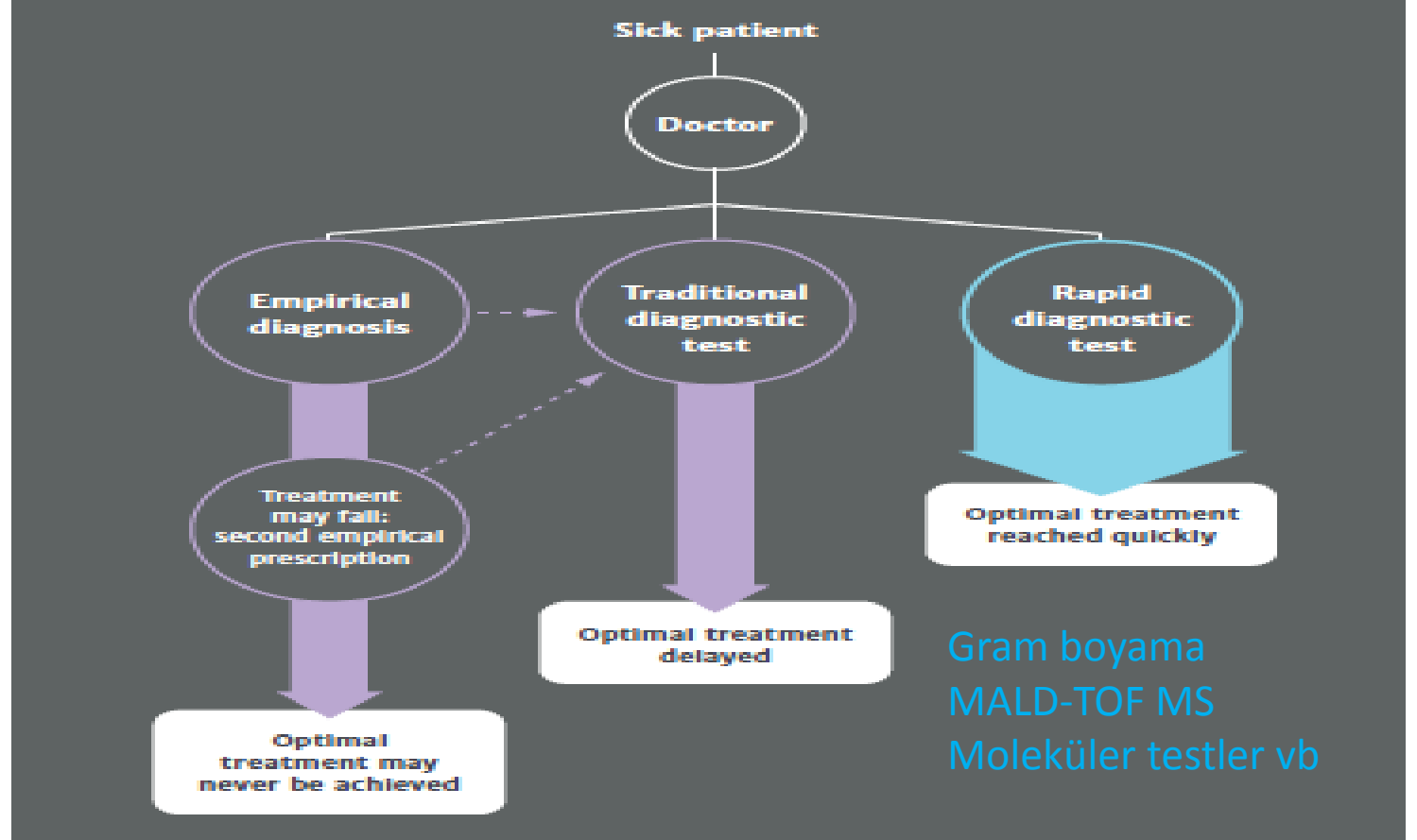
Kinolon kullanımının azalmasıyla, idrardan izole edilmiş *E. coli* suşlarında, kinolon duyarlılığında önemli artışı olmuş

Toplumda kinolon kullanımı arttığında duyarlılık tekrar azalmış.

- Erken de-eskelasyonla direnç azaltılabilir

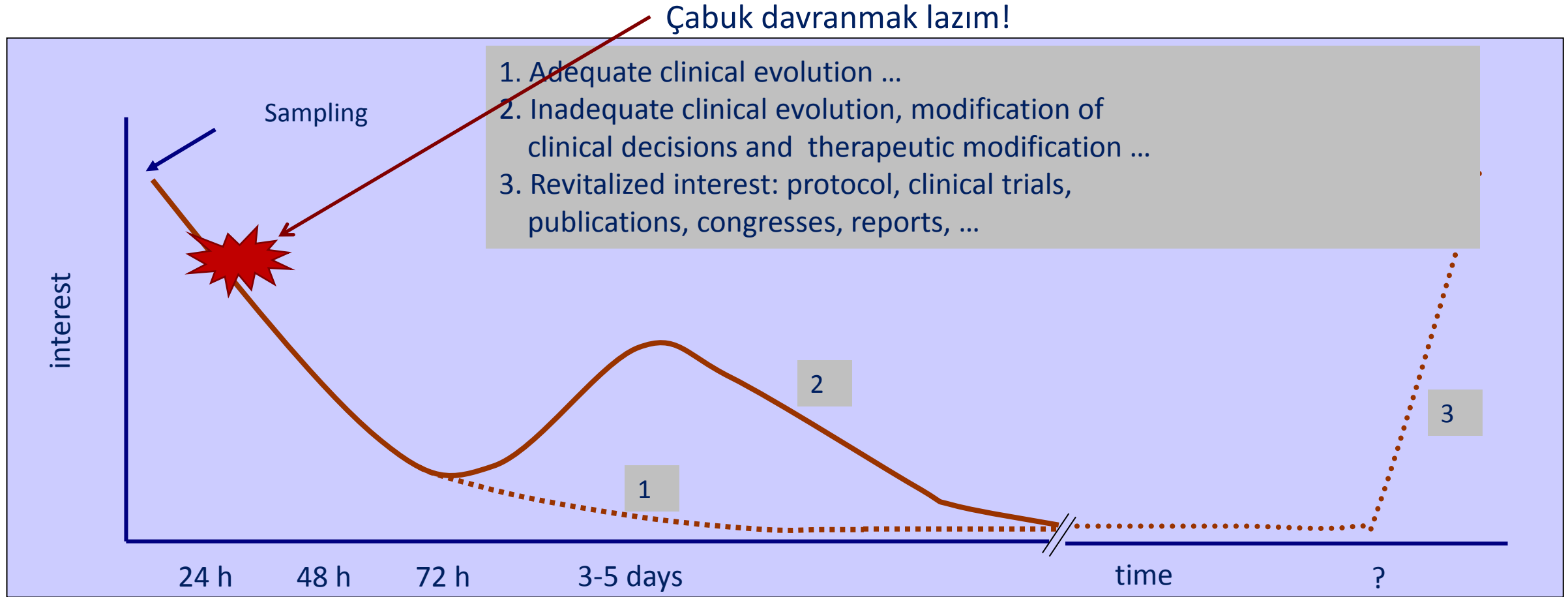
Hızlı Bakteri Tanımlama Testlerinden Beklentiler

- Antimikrobik tedavinin optimizasyonu
 - Hastada mortalite-morbiditenin azaltılmasını
- Erken de-eskalasyonla direncin azaltılması
- Maliyetin azaltılması



Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Bakterilerin Hızlı Tanımlanması Neden?

- Klinisyenlerin mikrobiyoloji raporlarına ilgisi**



Edwards et al. Arch Intern Med 1973; 132:678-82

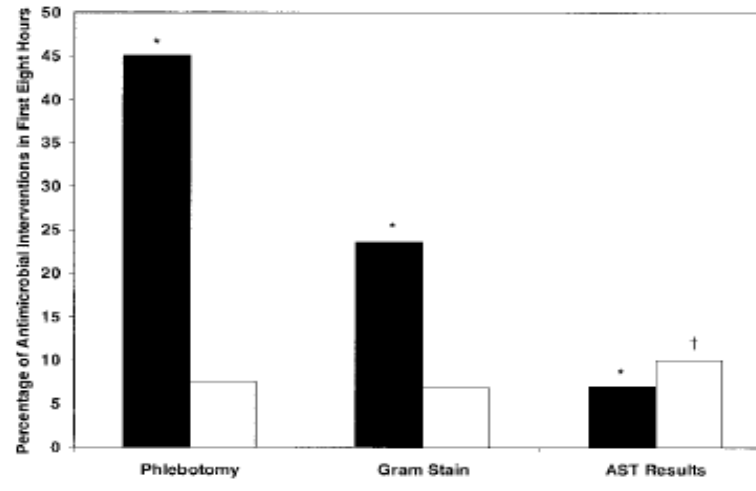
Spencely et al. J Infect 1979; 1:23-26

Cunney et al. Int J Antimicrob Chemother 2000; 14:13-9

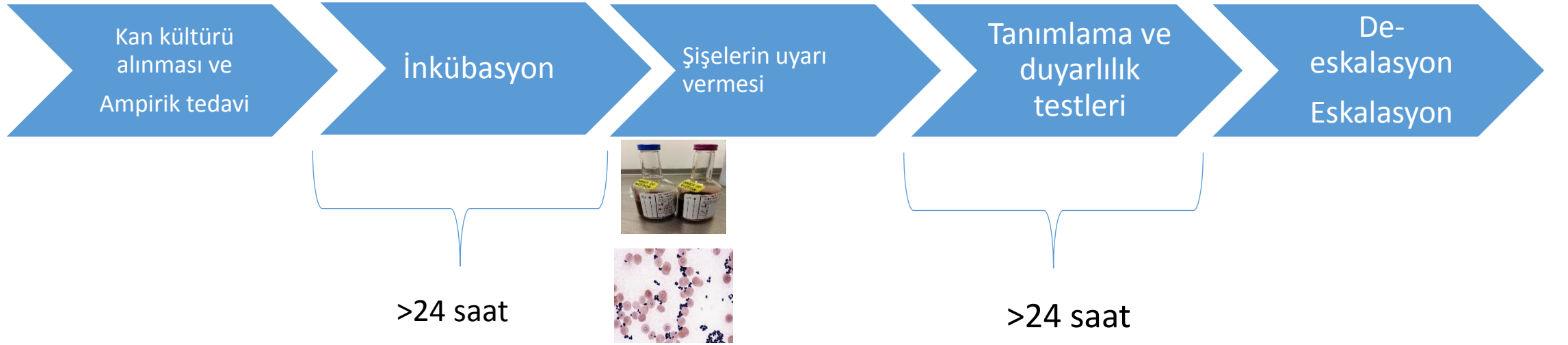
R. Cantón (personal experience)

Mikrobiyolojik Sonuçların Antimikrobiyal Başlanması veya Kesilmesine Etkisi

- 509 kan dolaşımı infeksiyonunda mikrobiyoloji raporlarının antimikrobiyal yönetimine etkisi
 - Antibiyotiklerin çoğu flebotomi sırasında ve Gram boyaması sonuçları alındıktan sonra başlanmış
 - Antibiyogram sonuçları, antimikrobiyal yönetimde en az etkisi olan bilgi



Üremiş Kan Kültürlerinin Klasik Değerlendirilmesi



Sonuçlar en erken 48 saat, genelde 72-96 saatte
Gram boyaması ve diğer hızlı tanı testleri bu süreyi 24 saate düşürebilir

Uygun Ampirik Antimikrobik Seçimini Etkileyen Faktörler

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji Uzmanı



Erken ve uygun
antimikrobiyal
seçimini

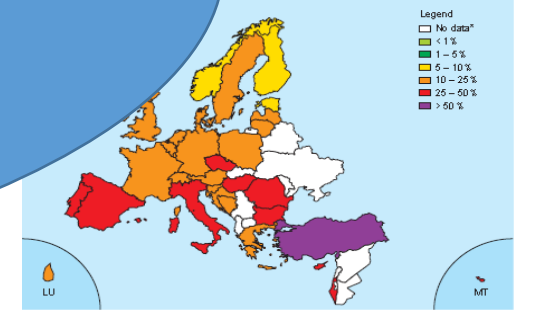
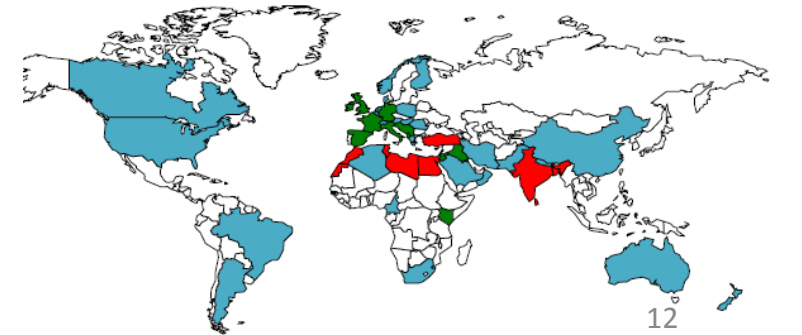


Figure 5.15. *Escherichia coli*: proportion of invasive isolates with resistance to 3rd generation cephalosporins in 2008.

- Unknown distribution of OXA-48 producers
- Sporadic spread of OXA-48 producers
- Outbreaks caused by OXA-48 producers
- Endemicity of OXA-48 producers



Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Bakterilerin Hızlı Tanımlanması

- Gram boyaması
- PCR
- Multipleks PCR
- Nanopartikül prob teknolojisi (nükleik asid ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonu)
- Peptid nükleik asid floresan in situ hibridizasyon (PNA FISH)
- MALDI-TOF



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Clinical Microbiology
Reviews



CLINICAL MICROBIOLOGY BEST PRACTICES

Effectiveness of Practices To Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: a Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis

- Kan dolaşımı infeksiyonlarının erken uygun tedavisini sağlamak amacıyla kullanılan hızlı tanı testlerinin etkinliğini araştıran 16 çalışmanın meta-analizi
- Kullanılan testler 12 çalışmada moleküler, diğer 4'ü Apı, VİTEk vb.
- Gram boyaması, tüm çalışmalarda pozitif kan kültürlerini doğrulamak için kullanılmış bir rutin mikrobiyoloji testi olmasına karşın, sadece bir çalışmada klinik sonuçlara etkisi araştırılmış

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Bakterilerin Hızlı Tanımlanması

- **İdeal test**
 - Kolay ulaşılabilir
 - Kolay yapılabilir
 - Ucuz
 - Hızlı sonuçlanan
 - Doğru sonuç veren
 - Duyarlı
 - Özgül
 - Klinik sonuçlara olumlu etkili

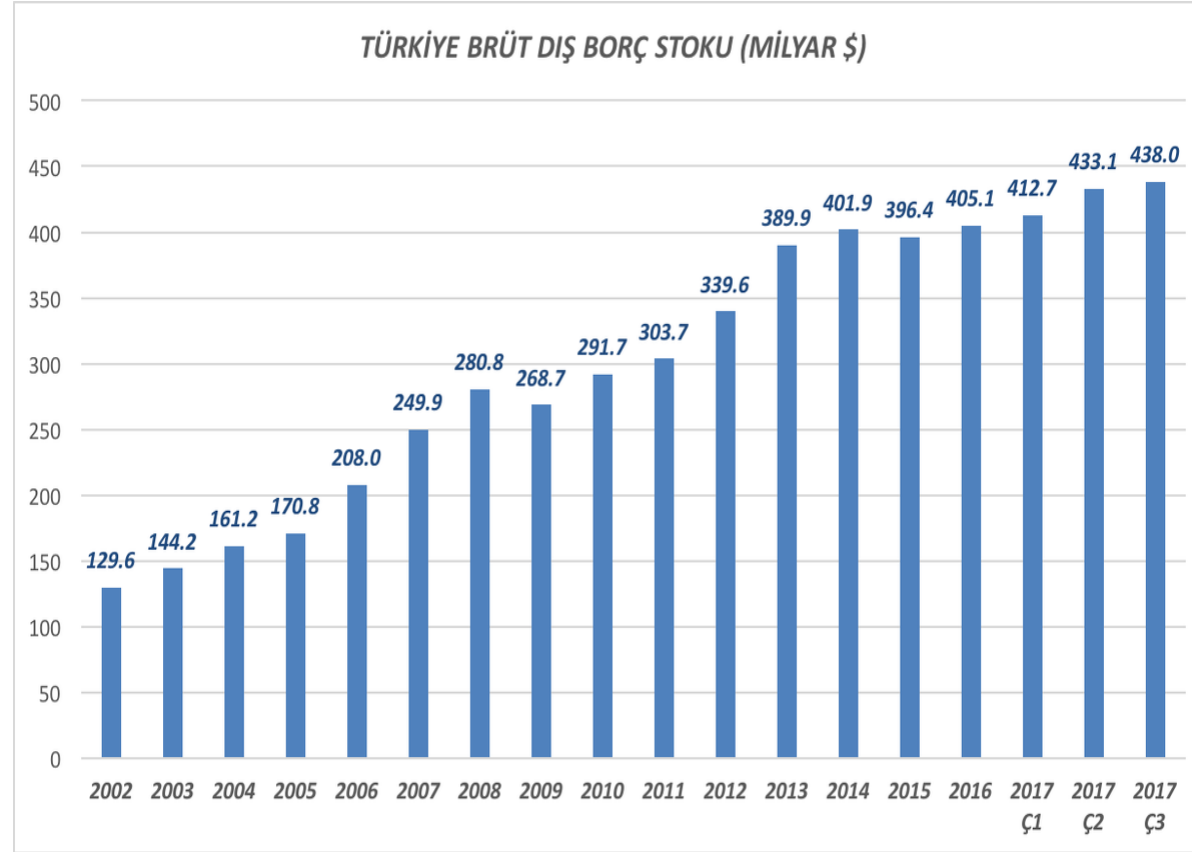
Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Bakterilerin Hızlı Tanımlanması

- Değerlendirmede deneyim ve beceri çok önemli
- Test başına maliyet
 - Moleküler (Verigene) 99 \$
 - PNA-FISH 57 \$
 - MALDI-TOF 2 \$ (Cihaz: 350.000 Euro)
 - Gram boyaması <0.5 \$

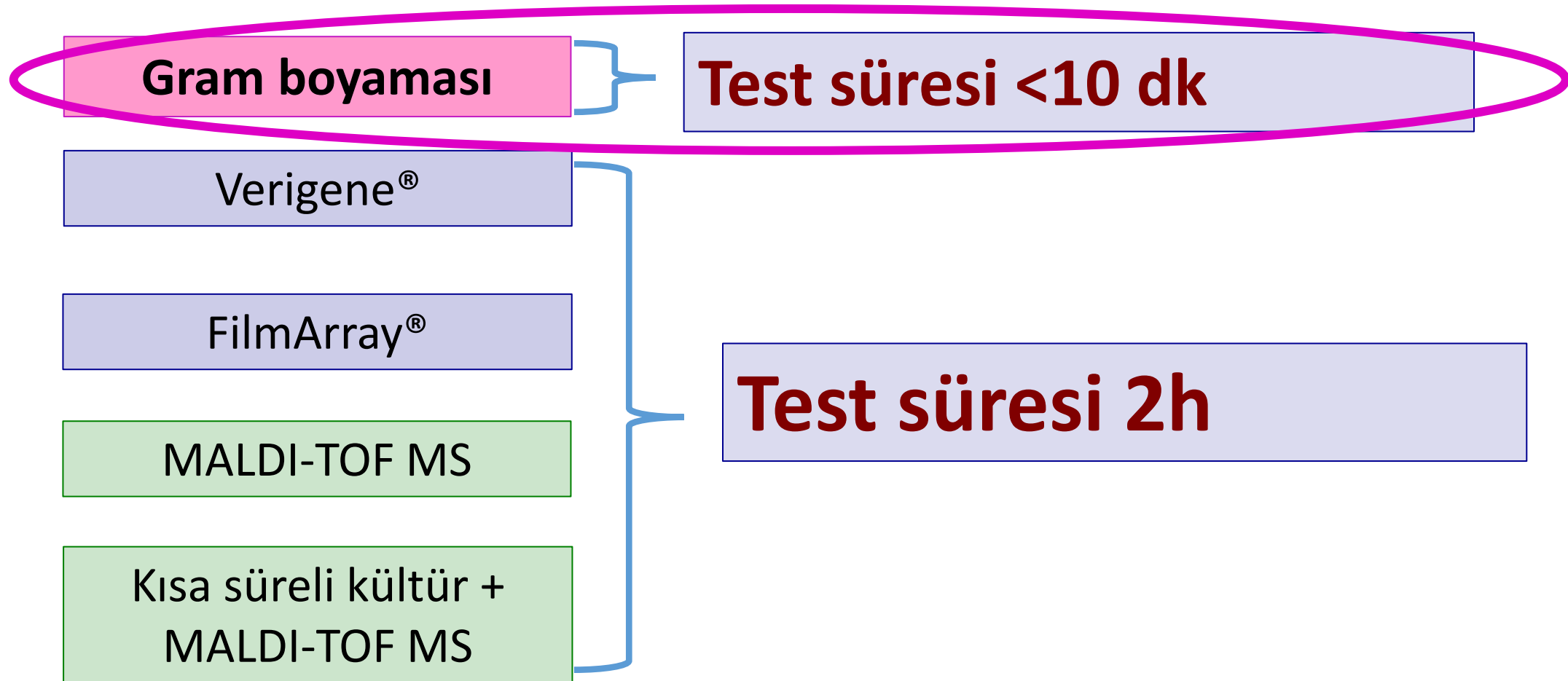
Bizim İçin Test Maliyeti Önemli mi?

KİŞİ BAŞINA DÜŞEN MİLLİ GELİR

1	Katar	100889
2	Lüksemburg	77958
3	Singapur	60799
4	Norveç	54397
5	Brunei	54114
6	ABD	51704
7	Hong Kong	50936
8	İsviçre	44864
9	San Marino	42724
10	Kanada	42317
11	Avustralya	41954
12	Avusturya	41908
13	Hollanda	41527
14	İrlanda	40716
15	İsveç	40304
16	Kuveyt	39874
17	İzlanda	39718
18	Almanya	38666
19	Tayvan	38357
20	Belçika	37459
...		
68	Türkiye	14812



Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Bakterilerin Hızlı Tanımlanması



Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Direkt Gram Boyaması

- Toplam 8253 kan kültürü şişelerinden direkt yapılmış Gram boyama sonuçları: Toplam hata oranı %0.7

Summary of Gram Stains of All Positive Blood Cultures

Blood Culture Gram Stain	No. of Positive Blood Cultures	No. Misread	No. of Major Errors [†]	No. of Mixed Cultures	No. of <i>Bacillus</i> Species
Gram-positive cocci	5,885	22 (0.4)	6 (0.1)	16 (0.3)	—
Gram-positive rods	367	10 (2.7)	7 (1.9)	3 (0.8)	— [‡]
Gram-negative rods	1,959	25 (1.3)	5 (0.36)	9 (0.5)	11 (0.6)
Gram-negative cocci	42	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—
Total	8,253	57 (0.7)	18 (0.2)	28 (0.3)	11 (0.1)

3'ü *Acinetobacter* spp.

9'u *Bacillus* spp. ve
2'si *Clostridium* spp.

Bakterilerin Gram Morfolojilerine Detaylı Bakış

<i>Clostridium</i> spp.	Gram-positive, -variable, or -negative bacilli with or without spores; bacilli may be large, slender and short, or long; sometimes form coils; often smaller than <i>Bacillus</i> spp.	Blood, intra-abdominal, wounds, abscesses	Normal gastrointestinal and genital tract microbiota
<i>S. pneumoniae</i>	Gram-positive cocci in pairs, lancet shapes, short chains	Lower respiratory tract, blood, CSF, sterile fluids	Quellung test may be used on selected clinical specimens.
<i>Enterococcus</i> spp.	Gram-positive cocci in pairs, short chains; may resemble pneumococci	Urine, wounds, blood, intra-abdominal abscesses	Normal gastrointestinal tract microbiota; common cause of superinfections in patients treated with expanded-spectrum cephalosporins
<i>Streptococcus</i> spp.	Round to oval gram-positive cocci, occasionally elongated; in pairs and/or short to long chains; nutritionally variant streptococci often seen as highly pleomorphic, gram-variable to gram-negative coccobacilli with pointed ends and spindle shapes	Blood, CSF, respiratory tract, multiple other sources	May be difficult to distinguish from corynebacteria and lactobacilli
<i>Aerococcus viridans</i>	Gram-positive cocci in pairs, tetrads, clusters	Blood, CSF	
<i>Staphylococcus</i> spp.	Gram-positive cocci in pairs, tetrads, clusters	Abscesses, drainages, wounds, respiratory tract, blood, tissue, sterile fluids, indwelling catheters	Normal microbiota, especially skin, nares
<i>S. aureus</i>	May often be characterized by very uniform, geometric clusters of small cocci, whereas coagulase-negative species are often irregular and more pleomorphic, with greater size variation		
<i>Rothia mucilaginosa</i>	Large gram-positive cocci in pairs, tetrads	Blood in compromised patients, peritoneal dialysates	Normal oral microbiota

SHORT REPORT

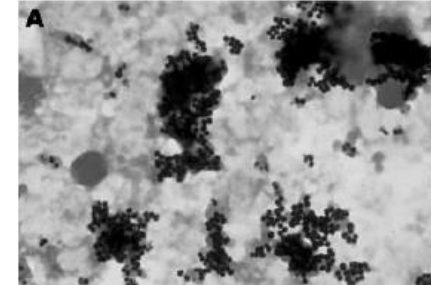
Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics

D R Murdoch, R L Greenlees

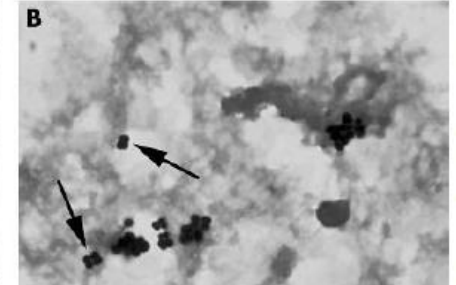
- Direkt Gram boyamada stafilokoka benzeyen Gram-pozitif kok görülen 150 kan kültürü incelenmiş

Staphylococcus aureus ve KNS'nin kan kültürü şişelerinden yapılmış direkt Gram boyamadaki görünüşleri

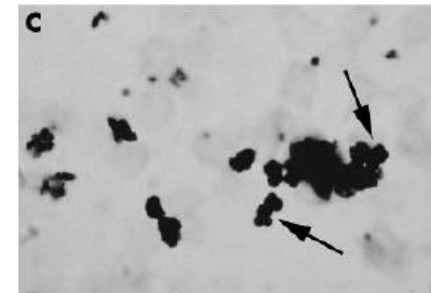
Bottle type	Organism	Cell size	Cluster characteristics
Anaerobic	<i>S aureus</i>	Small ($<1\ \mu\text{m}$)	Irregularly clustered in large numbers (typically 200–300 cells)
	Coagulase-negative staphylococci	Large ($\geq 1\ \mu\text{m}$)	Tetrads or small clusters up to 16 cells
Aerobic	<i>S aureus</i>	Large ($\geq 1\ \mu\text{m}$)	Very tight clusters (typically 8–32 cells). Individual cells cannot be distinguished
	Coagulase-negative staphylococci	Variable (typically $<1\ \mu\text{m}$)	Tetrads or small clusters up to 16 cells



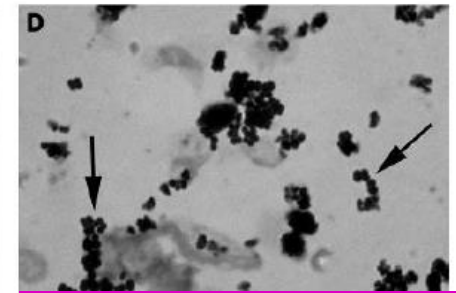
Anaerob şişede *S.aureus*



Anaerob şişede KNS



Aerob şişede *S.aureus*



Aerob şişede KNS

Murdoch DR. *J Clin Pathol* 2004;57:199–201

SHORT REPORT

Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics

D R Murdoch, R L Greenlees

- Bu ölçütlerle *S aureus*'u diğer stafilokoklardan %89 duyarlılık ve %98 özgüllükle ayırt edebilmişler
- Test süresi 10 dk

Table 2 Performance characteristics of Gram stain compared with culture for identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles

Microscopist*	Blood culture bottle type	No. Gram stains positive for <i>S aureus</i> /No. cultures positive for <i>S aureus</i> (% sensitivity)	No. Gram stains negative for <i>S aureus</i> /No. cultures negative for <i>S aureus</i> † (% specificity)	PPV (%)	NPV (%)
Technologist	All	59/66 (89)	82/84 (98)	59/61 (97)	82/89 (92)
	Aerobic	26/31 (84)	49/50 (98)	26/27 (96)	49/54 (91)
	Anaerobic	33/35 (94)	33/34 (97)	33/34 (97)	33/35 (94)
Microbiologist	All	58/66 (88)	77/84 (92)	58/65 (89)	77/85 (91)
	Aerobic	24/31 (77)	47/50 (94)	24/27 (89)	47/54 (87)
	Anaerobic	34/35 (97)	30/34 (88)	34/38 (89)	30/31 (97)

*Technologist experienced with the criteria; clinical microbiologist recently taught the criteria; †includes coagulase negative staphylococci and micrococcus species.

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Bakterilerin Gram Morfolojilerine Detaylı Bakış

Organism(s)	Gram stain morphology ^a	Frequent sources	Comments
<i>Enterobacteriaceae</i>	Straight thick bacilli; short to medium length with rounded ends; antimicrobial agent-affected organisms may be pleomorphic, filamentous, and/or irregularly staining	Urinary tract, multiple other sources	Includes organisms that cause gastroenteritis and bacterial dysentery; also normal gastrointestinal tract microbiota; nosocomial strains may be multiply resistant to antimicrobial agents
<i>Pseudomonas</i> spp.	Thin bacilli; medium length to long with rounded to pointy ends; often in pairs; antimicrobial agent-affected organisms may appear filamentous, coiled, and/or pleomorphic	Lower respiratory tract, wounds, eyes, multiple sites in compromised patients	Nosocomial strains may be multiply resistant to antimicrobial agents
<i>Haemophilus</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., fastidious gram-negative bacilli	Small coccoid to bacillary forms; pleomorphic; often with filamentous forms; may be faintly staining	Blood, sterile fluid (including CSF), lower respiratory tract, abscesses, wounds, eyes, genital tract	Inoculate CHOC.
<i>Legionella</i> spp.	Pleomorphic slender bacilli of variable lengths that may stain pale; may not take stain in clinical specimens	Lower respiratory tract	Add special growth media; direct fluorescent antibody stains and molecular probes available; acid wash method may be used to enhance recovery from specimens with mixed microbiota
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp.	Long slender bacilli with tapered to pointed ends; "needlelike"; may be in pairs, end to end, or filamentous	Respiratory tract, wounds, blood, abscesses	Endogenous microbiota
<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Fusobacterium mortiferum</i> , or <i>Fusobacterium varium</i>	Highly pleomorphic bacilli with rounded to tapered ends; pale and irregularly staining, with bizarre forms and round bodies	Wounds, blood, abscesses	Endogenous microbiota

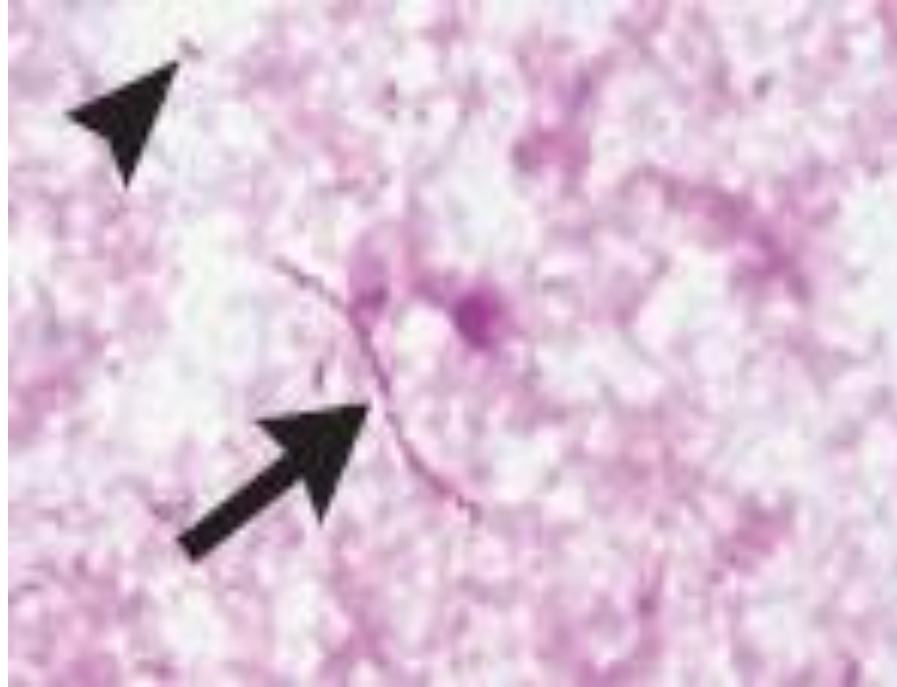
Bakterilerin Gram Morfolojilerine Detaylı Bakış

- Pozitif şişelerden Gram boyamasıyla *Pseudomonas* spp.'nin ayırt edilmesi
 - Ölçüt: Gram-negatif, ince, orta-uzun boylu, sivri uçlu çomaklar
 - Diğer Gram-negatiflerden ayırt etmede kültüre göre duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %71 ve %98.9, %94 ve %93
- Gram-negatif çomak+şişede çok fazla gaz varsa: *Enterobacteriaceae*

Pozitif Kan Kültürü Şişelerindeki Bakterilerin Gram Morfolojilerine Detaylı Bakış

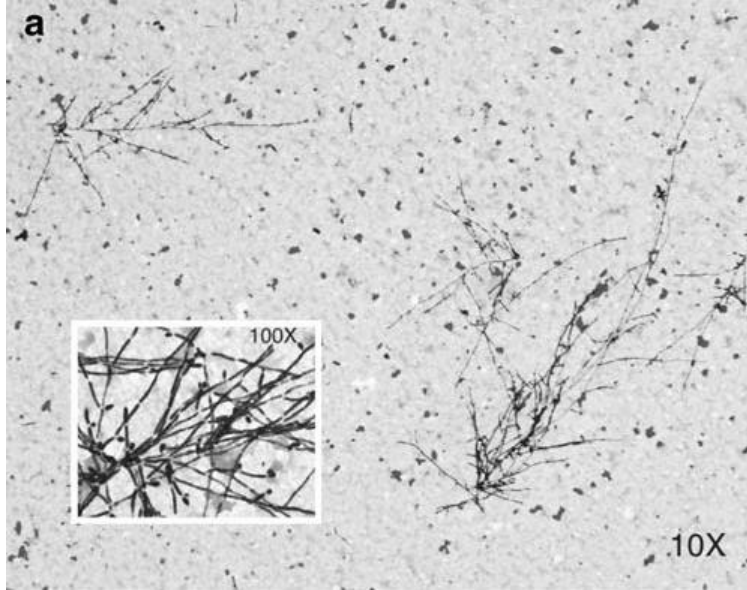
Campylobacter jejuni

Kan kültürü şişesinden yapılan Gram boyamada spiral bakteri

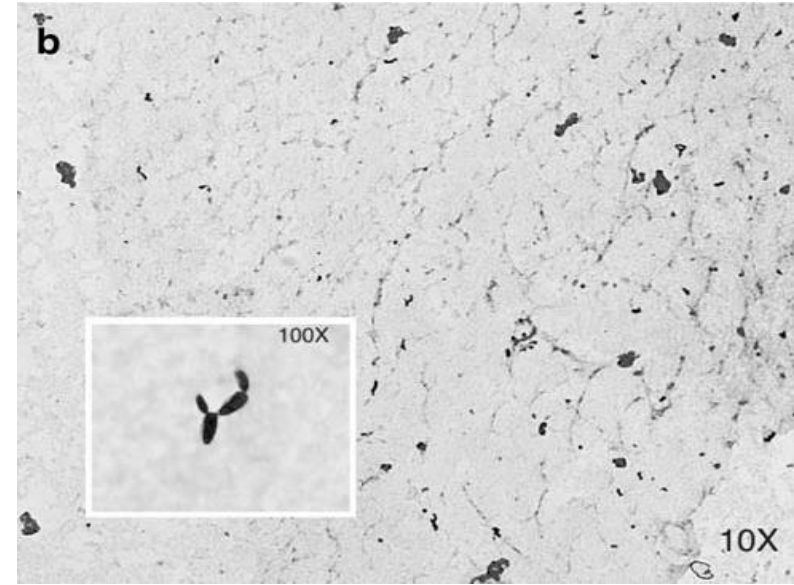


Differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* yeast directly from blood cultures by Gram stain morphology

Aerob şişeden Gram boyamasında psödohip kümelerinin görülmesinin *C. albicans*'ı göstermedeki duyarlılığı %96, özgüllüğü %95

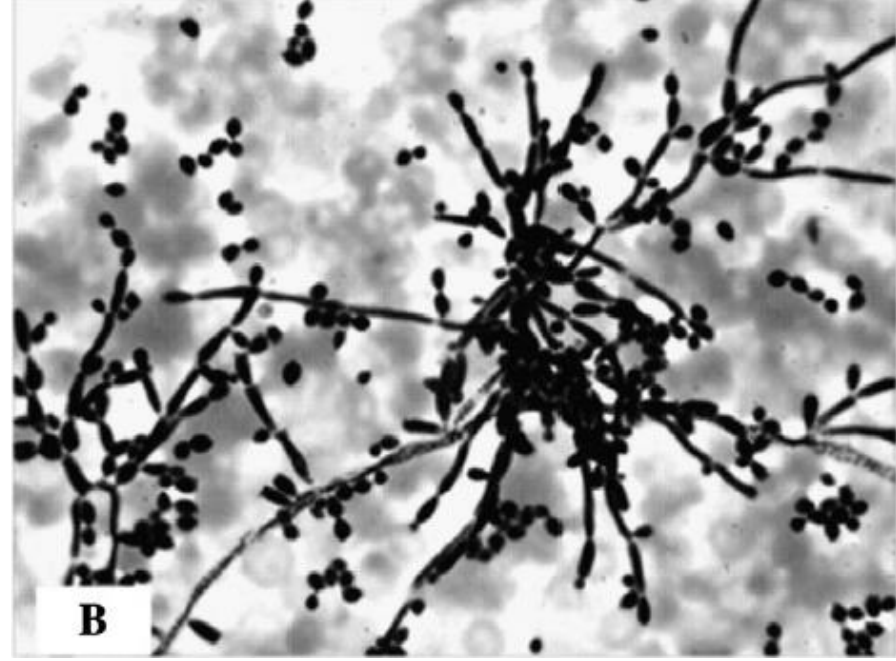
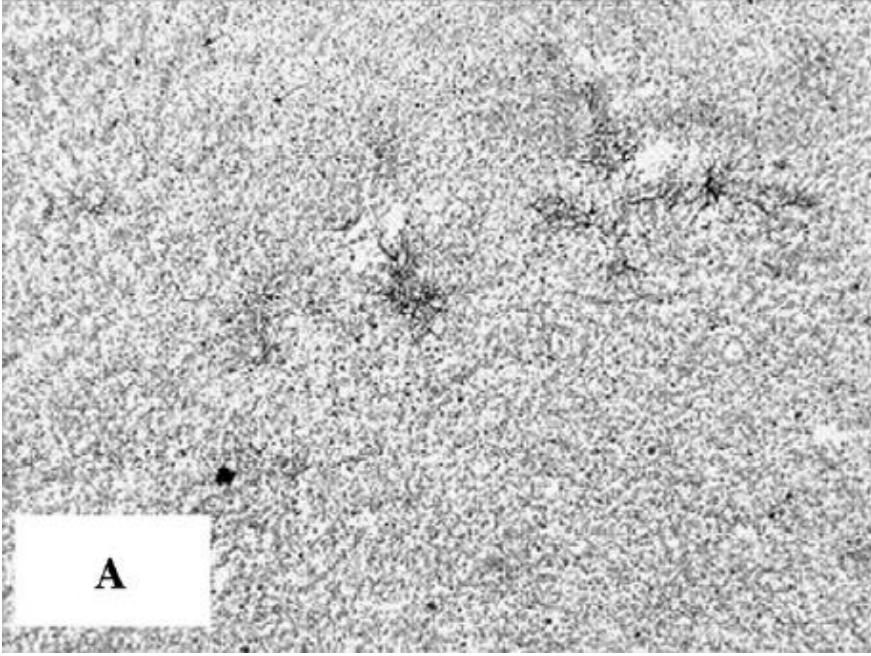


C. albicans, 10× ve 100× büyütme



C. glabrata 10× ve 100× büyütme

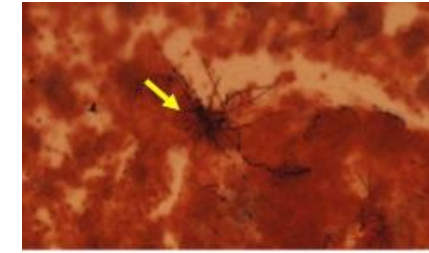
Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Yapılan Direkt Gram Boyamasıyla *Candida albicans*'ın Tanınması



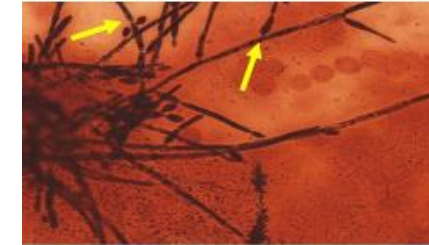
Dallanan, küme yapmış psödohipler (A) (10×), (B) (100×)
C.albicans'ı göstermede duyarlılığı %98, özgüllüğü %94

Comparative analysis of Gram's stain, PNA-FISH and Sepsityper with MALDI-TOF MS for the identification of yeast direct from positive blood cultures

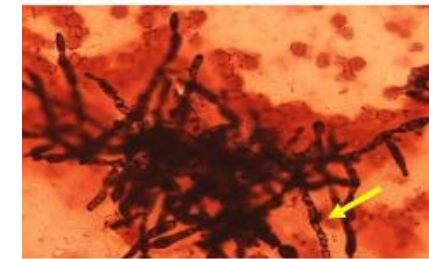
- 50 fungemili hastadan üretilmiş 50 mayayla inoküle edilmiş kan kültürü şişelerindeki üremeler 3 yöntemle değerlendirilmiş (Gram boyaması, PNA-FISH, MALDI-TOF MS)
- Gram boyamasının değerlendirilmesi: 7 maya türü (*C.albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. neoformans*, *C. guilliermondii* ve *C. parapsilosis*) için daha önceden belirlenmiş özgül morfolojik karakteristiklere göre yapılmış (4 aylık eğitim)



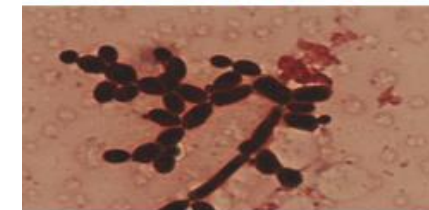
Scanning the slide at X10 objective will highlight the pseudohyphal clustering



Elongated hyphae with visible septa. May appear with or without a constriction i.e. true/pseudo hyphae



Transparent hyphae in mycelial mass. The hyphae may poorly take up gram stain and appear hyaline



Rounded blastospores originating from hyphae

	Subset description			Classification results			
	Species <i>n</i>	Total <i>n</i>	% of <i>n</i>	Correct	MisID ²	Unknown	Success %
(a) Performance total							
Gram's stain	10	50	100.0	36	13	1	72
PNA-FISH	10	50	100.0	43	2	5	86
MALDI-TOF	10	50	100.0	28/38 ¹	0	22/12 ¹	56/76 ¹

Comparative analysis of Gram's stain, PNA-FISH and Sepsityper with MALDI-TOF MS for the identification of yeast direct from positive blood cultures

- Gram boyaması, PNA-FISH, MALDI-TOF MS'in maliyetleri

	Gram's stain	PNA-FISH	MALDI-TOF
Cost per test	\$0.17 ¹	\$57.00 ¹	\$2.17 ¹
Turnaround time	15 min	90 min	90 min
Technical requirement	Experienced ²	Inexperienced	Inexperienced

Review Article

Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit

- Üremiş kan kültürü şişelerinden MALDI-Sepsityper yöntemiyle bakteri tanımlamasını değerlendiren 21 çalışmanın (3320 şişe) derlemesi
 - %80 şişede tür düzeyinde tanımlama yapabilmiş
 - Gram-negatif bakterilerde %90
 - Gram-pozitif bakterilerde %76
 - Mayalarda 66%

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Hızlı Bakteri ve Direnç Tanımlaması

- 200 tek bakteri üremiş kan kültürü şişesinde Verigene BC-GN ve MALDI Sepsityper sonuçları

	No. (%) of cultures	No. (%) organisms correctly detected by:		
		MALDI Sepsityper		Verigene BC-GN
		Genus (>1.6)	Species (≥ 1.8)	
Definitive identification				
<i>Enterobacteriaceae</i>	157 (78.5)	154 (98.1)	149 (94.9)	144 (91)
Non- <i>Enterobacteriaceae</i>	43 (21.5)	34 (79.1)	33 (76.7)	26 (60)
Total	200	188 (94)	182 (91)	170 (85)

Impact of Reporting Gram Stain Results From Blood Culture Bottles on the Selection of Antimicrobial Agents

■Table 3■

Suspected Microorganisms and Accuracy of Gram Stain *

Suspected Microorganism by Gram Stain	Total Episodes	Gram Stain Results Matched Culture Identification	Mismatched Episodes
Gram-positive cocci			
<i>Staphylococcus</i> spp	178 (36.9)	178 (100.0)	0 (0.0)
<i>Streptococcus</i>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12 (2.5)	12 (100)	0 (0)
Other streptococci	35 (7.3)	35 (100)	0 (0)
Other gram-positive cocci/undetermined	3 (0.6)	2 (67)	1 (33.3)
Gram-positive rods			
<i>Corynebacterium</i> spp	4 (0.8)	4 (100)	0 (0)
Gram-negative cocci			
<i>Neisseria/Moraxella</i> spp	1 (0.2)	1 (100)	0 (0)
Gram-negative rods			
Enterobacteriaceae family	147 (30.5)	138 (93.9)	9 (6.1)
<i>Pseudomonas</i> spp and related organisms	27 (5.6)	27 (100)	0 (0)
Other gram-negative rods/undetermined	16 (3.3)	16 (100)	0 (0)
Fungi			
Yeasts	21 (4.4)	21 (100)	0 (0)
Multiple microorganisms	38 (7.9)	36 (95)	2 (5)
Total	482 (100.0)	470 (97.5)	12 (2.5)

Impact of Reporting Gram Stain Results From Blood Culture Bottles on the Selection of Antimicrobial Agents

Suspected Microorganism Based on Gram Stain	No. (%) of Episodes	Start Abx	Adjust Spectrum	Add Other Abx	Other	Total
Gram-positive cocci						
<i>Staphylococcus</i> spp	178 (36.9)	20 (11.2)	21 (11.8)	34 (19.1)	32 (18.0)	107 (60.1) [†]
<i>Streptococcus</i>						
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12 (2.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (33)	4 (33)
Other streptococci	35 (7.3)	0 (0)	1 (3)	8 (23)	6 (17)	15 (43) [†]
Other gram-positive cocci/undetermined	3 (0.6)	0 (0)	0 (0)	2 (67)	0 (0)	2 (67)
Gram-positive rods						
<i>Corynebacterium</i> spp	4 (0.8)	0 (0)	1 (25)	2 (50)	0 (0)	3 (75)
Gram-negative cocci						
<i>Neisseria/Moraxella</i> spp	1 (0.21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
Gram-negative rods						
Enterobacteriaceae family	147 (30.5)	10 (6.8)	0 (0.0)	5 (3.4)	30 (20.4)	45 (30.6) [†]
<i>Pseudomonas</i> spp and related organisms	27 (5.6)	0 (0)	0 (0)	3 (11)	13 (48)	16 (59) [†]
Other gram-negative rods/undetermined	16 (3.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (25)	4 (25)
Fungi						
Yeasts	21 (4.4)	0 (0)	1 (5)	8 (38)	3 (14)	12 (57)
Multiple microorganisms	38 (7.9)	3 (8)	1 (3)	5 (13)	9 (24)	18 (47)
Total	482 (100.0)	33 (6.8)	25 (5.2)	67 (13.9)	102 (21.2)	227 (47.1)

Decreased Mortality Associated With Prompt Gram Staining of Blood Cultures

- Kan kültürü üredikten sonra Gram boyaması sonucunun bildirilme süresi <1 saat olanlarla >1 saat olan 99'ar hastalık 2 grup karşılaştırılmış

	TAT		Difference	P
	<1 h	≥1 h		
Time to detection (h)	13.7	13.6	0.1	.7860
Gram stain TAT (h)	0.1	3.3	-3.2	< .0001
Mortality rate (%)	10.1	19.2	-9.1	.0389
Length of stay (d)	11.0	10.5	0.5	.6988
Positive length of stay (d)*	7.9	7.7	0.2	.7920
Variable costs (\$)	9,543	9,361	182	.9150
Male sex (% of group)	47	49	-2	.7773
Age (y)	69.2	66.6	2.6	.3054

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Direkt Gram Boyaması

Tablo 3. Kan Kültüründe Üreyen Gram-pozitif, Gram- Üreyen negatif ve Maya Görünümlü Mikroorganizmalarındaki Cins Düzeyinde Tanımlanması.

Mikroorganizmanın Gram morfolojisi	Doğru	Yanlış	Toplam
Streptococcus spp.	2	1	3

P-198

Konsültan Enfeksiyon Hastalıkları ve Klini Mikrobiyoloji Hekiminin Üreme Olan Kan Kültürü Şişelerinden Hazırlanan Gram Boyamasını Değerlendirmesi: Bakterileri Hızlı Tanımlanmasında ve Uygun Tedavini Düzenlenmesinde Ne Kadar Yararlı?

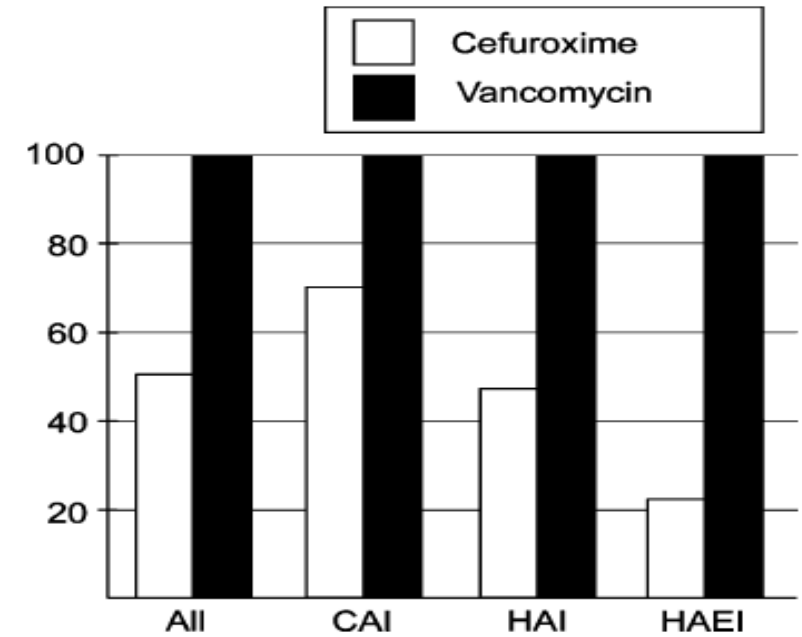
Seniha Başaran, Ezgi Özbek, Müberra Hraloğlu, Sera Şimşek Yavuz, Atahan Çağatay, Oral Öncül, Hal Özsüt, Haluk Eraksoy

Konsültan İHKM hekimi, gördüğü hastaların üremiş kan kültürlerinden hazırlanan Gram boyamalarını değerlendirerek üreyen mikroorganizmaları, Gram-pozitif ve mayalarda cins düzeyinde olmak üzere, üremeden sonraki ilk yarım saat içinde morfolojik olarak doğru bir şekilde tanımlayabilir. Elde ettiği bilgilerle hastaların en az yarısının erkenden doğru antimikrobiyal tedaviye ulaşmasını sağlayabilir. İHKM hekimlerinin bu Gram boyaması fırsatını klinik pratikte daha fazla değerlendirmesi, hem erken başlanan uygun tedavinin mortaliteyi azaltması, hem de hastane maliyetlerini azaltması nedeniyle oldukça önemlidir.

Blood culture Gram stain and clinical categorization based empirical antimicrobial therapy of bloodstream infection

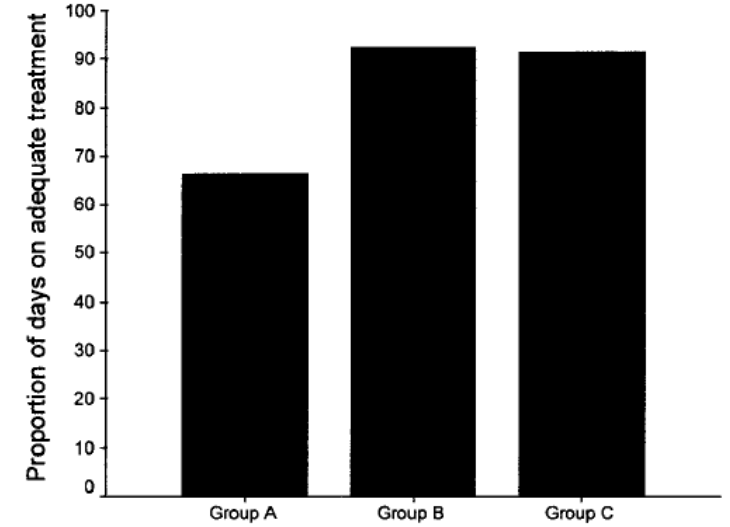
- Üremiş kan kültürü şişelerinden yapılan Gram-boyamasıyla birlikte, infeksiyonun toplum kökenli, sağlık bakımıyla ilişkili veya hematoloji ünitesi infeksiyonu şeklinde gruplandırılmasının antimikrobiyal duyarlılığı tahmin etmedeki yararı

Küme yapmış Gram-pozitif kokların, infeksiyonun edinildiği yere göre duyarlılık %



Sadece Gram Boyama Sonuçlarının Bildirilmesi Yeterli Değil

- Grup A: Doktora telefonla hemen Gram boyama sonucu bildiriliyor ve sonra klasik rapor gidiyor
- Grup B: A+ yazılı tedavi önerisi gidiyor (İHKM)
- Grup C: B+doktorla konuşuluyor (İHKM)
- Aktif uyarı, hastaların ~%50'de tedavi değişikliğine yol açmış
- B ve C grubunda uygun tedavi alma olasılığı daha yüksek
- Uygun tedavi alma oranları A'da %66, B'de %92, C'de %91



Effect of MALDI-TOF MS Alone versus MALDI-TOF MS Combined with Real-Time Antimicrobial Stewardship Interventions on Time to Optimal Antimicrobial Therapy in Patients with Positive Blood Cultures.

Özellik	MALDI (126)	MALDI+AMS (126)	Sig.
Optimal tedaviyi başlama süresi, h	75.17	43.06	P<0.001
Toplam hastanede yatış süresi (HYS), gün	15.03	9.02	P=0.021
Gr (+) HYS, gün	14.64	10.31	P = 0.002
Gr (-) mikrobiyolojik klirens süresi, h	51.13	34.51	P<0.001
Gr (-) HYS, gün	15.40	7.90	P=0.027

Hızlı tanı testleri, eşlik eden antimikrobiyal yönetimi faaliyetleri yoksa etkisizdir 😊)

Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction–Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing

	Standard	rmPCR	rmPCR+AMY	Sig.
Tanımlama süresi, h	22.3	1.3	1.3	P<0.001
Uygun antimikrobik başlanma süresi, h	11	6	4	P=0.55
De-eskelasyon süresi, h	34	38	21	P<0.001
Eskelasyon süresi, h	24	5	6	P=0.04

Hızlı tanı testleri, eşlik eden antimikrobiyal yönetimi faaliyetleri yoksa etkisizdir 😊)

The Effect of Molecular Rapid Diagnostic Testing on Clinical Outcomes in Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-analysis

Antimikrobiyal yönetim programıyla birlikte hızlı tanı testlerinin kullanımı

Antimikrobiyal yönetim programı olmaksızın hızlı tanı testlerinin kullanımı

Study or Subgroup	mRDT		Conventional Testing		Weight, %	OR (95%CI)
Events	Total	Events	Total			
1.1.1 mRDT with ASP						
Bauer et al [17] (2010)	15	82	19	74	5.6	0.65 (.30–1.39)
Bias et al [19] (2015)	3	37	7	55	1.8	0.61 (.15–2.51)
Box et al [20] (2015)	6	64	10	103	3.0	0.96 (.33–2.79)
Forrest et al [24] (2006)	2	119	2	84	0.9	0.70 (.10–5.08)
Forrest et al [23] (2006)	19	72	20	76	6.0	1.00 (.48–2.09)
Forrest et al [25] (2008)	17	95	37	129	7.4	0.54 (.28–1.04)
Heil et al [27] (2012)	5	21	19	61	2.7	0.69 (.22–2.16)
Huang et al [29] (2013)	31	245	52	256	11.8	0.57 (.35–.92)
Lockwood et al [30] (2016)	11	241	14	149	4.9	0.46 (.20–1.04)
Macvane et al [32] (2015)	5	63	5	50	2.1	0.78 (.21–2.84)
Macvane et al [33] (2016)	6	23	16	45	2.8	0.64 (.21–1.95)
Nagel et al [36] (2014)	11	117	19	129	5.3	0.60 (.27–1.32)
Pardo et al [39] (2016)	5	84	37	252	3.6	0.37 (.14–.97)
Perez et al [15] (2013)	6	107	12	112	3.3	0.50 (.18–1.37)
Revolinksi et al [40] (2015)	8	95	13	133	4.0	0.85 (.34–2.14)
Sango et al [42] (2013)	11	28	7	46	2.8	3.61 (1.19–10.89)
Sothoron et al [43] (2015)	5	67	4	59	1.9	1.11 (.28–4.34)
Suzuki et al [44] (2015)	3	88	19	147	2.3	0.24 (.07–.83)
Walker et al [45] (2016)	8	97	19	98	4.3	0.37 (.16–.90)
Subtotal		1745		2058	76.5	0.64 (.51–.79)
Total events	177		331			
Heterogeneity: $\tau^2 = 0.01$ $\chi^2 = 19.00$ ($df = 18$; $P = .39$); $I^2 = 5\%$						
Test for overall effect: $z = 4.14$ ($P < .001$)						

1.1.2 mRDT without ASP

Beuving et al [18] (2015)	14	114	8	109	4.1	1.77 (.71–4.40)
Felsenstein et al [22] (2016)	5	189	11	194	3.0	0.45 (.15–1.33)
Frye et al [26] (2012)	14	110	17	134	5.7	1.00 (.47–2.14)
Ly et al [31] (2008)	8	101	17	101	4.2	0.43 (.17–1.04)
Masionka et al [34] (2014)	6	55	10	55	2.9	0.55 (.19–1.64)
Neuberger et al [37] (2008)	1	42	4	42	0.7	0.23 (.02–2.17)
Wang et al [46] (2013)	8	48	8	38	2.9	0.75 (.25–2.23)
Subtotal		659		673	23.5	0.72 (.46–1.12)

Total events 56 75
Heterogeneity: $\tau^2 = 0.08$ $\chi^2 = 7.74$ ($df = 6$; $P = .26$); $I^2 = 23\%$
Test for overall effect: $z = 1.46$ ($P = .15$)

Hızlı tanı testleri, eşlik eden antimikrobiyal yönetimi faaliyetleri yoksa etkisizdir 😊

Pozitif Kan Kültürlerinden Direkt Antibiyogram Yapılması

- Direkt inokülasyondan 6 saat sonra sonuçlar alınabilir
- Klasik antibiyogramla karşılaştırıldığında sonuçlar %97 uyumlu
- %1.6 minör, %1.5 majör, %0.1 çok majör uyumsuzluk

Doern G. Antimicrob Agents Chemother 1981;20:696-8.

Romero-Gomez MP. J Infect. 2012;65:513–20.

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Direkt Antibiyogram

Gram negative rods 3221 organisms and antibiotic combinations				
Antibiotics	Enterobacteriaceae (69)		Non-Enterobacteriaceae (128)	
	Major	Minor	Major	Minor
Carbapenems ^a	0	2	0	4
Inhibitor combinations ^b	0	18	0	11
Fluoroquinolones ^c	0	6	0	7
Aminoglycosides ^d	0	4	0	9
Third generation cephalosporins ^e	0	0	0	0
Monobactams	0	0	0	0
Total	0	30	0	31

Gram positive cocci 2064 organisms and antibiotic combinations				
Antibiotics	<i>Staphylococcus aureus</i> (43)		Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> (129)	
	Major	Minor	Major	Minor
Cefoxitin/Oxacillin	0	12	0	46
Vancomycin/Teicoplanin	0	18	0	33
Erythromycin	0	0	0	0
Clindamycin	0	0	0	0
Aminoglycosides ^d	0	0	0	0
Fluoroquinolones ^c	0	0	0	0
Amoxicillin/clavulanic acid	0	0	0	0
Total	0	30	0	79

- Gram negatiflerde %1.8, Gram pozitiflerde %%5.2 minör hata.

%1.8

Behera B. Ind J Med Microb 2010;28: 138-42.

Agreement of Direct Antifungal Susceptibility Testing from Positive Blood Culture Bottles with the Conventional Method for *Candida* Species

- Gram boyamasında maya görülen şişelerden direkt veya üremiş kolonilerden standard disk difüzyon veya E testle antifungal duyarlılık testi

	No. (%) of isolates with ^h :			
Organism	No errors	Minor errors	Major errors	Total
Disk diffusion ^b				
<i>C. albicans</i>	28	1 (3.4)	0	29
<i>C. tropicalis</i>	25	2 (7.4)	0	27
<i>C. parapsilosis</i>	25	2 (7.1)	1 (3.6)	28
<i>C. glabrata</i>	8	0	0	8
Non- <i>albicans Candida</i>	4	0	0	4
<i>C. lusitaniae</i>	4	0	0	4
<i>C. pelliculosa</i>	2	0	0	2
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i> ^d	2	0	0	2
Total for disk diffusion	98 (94.2)	5 ^e (4.8)	1 ^f (1.0)	104

Organism	No. (%) of isolates with ^h :			Total
	No errors	Minor errors	Major errors	
Etest ^c				
<i>C. albicans</i>	7	0	0	7
<i>C. tropicalis</i>	5	0	0	5
<i>C. parapsilosis</i>	9	0	0	9
<i>C. glabrata</i>	2	2 (50)	0	4
Non- <i>albicans Candida</i>	1	0	0	1
<i>C. pelliculosa</i>	2	0	0	2
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i> ^d	0	2 (100)	0	2
Total for Etest	26 (86.7)	4 ^g (13.3)	0	30

- Üremiş kan kültürü şişelerinden disk difüzyon veya E testle direkt antifungal duyarlılık testi, flukonazol ve vorikonazol için oldukça hızlı ve güvenilir bir yöntem

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Direkt Antibiyogram

Klinik yararı

- 191 monomikrobik Gram-negatif bakteriyemide Vitek 2C'yle direkt tanımlama ve antibiyogram, pasaj sonrası yapılan tanımlama ve antibiyogramla karşılaştırılmış
 - Tanımlamada uyum %99
 - Duyarlılıkta uyum %99 (%0.39 majör, %0.61 minör hata)
 - Sonuçlar alındıktan sonra hastaların %60'ında tedavi değişikliği yapılmış

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Direkt Antibiyogram

- Sorunlar: Standard inokulum olmaması ve polimikrobiyal infeksiyonlar
- Disk difüzyon testinin 6-8-12 saatlik inkübasyondan sonra okunması
 - Meropenem: ↑ karbapenemaz varlığı için yalancı pozitiflik
 - Sefoksitin: ↑ metisilin direnci için yalancı pozitiflik
 - Yeni sınır değerler tanımlanmalı
 - Kromozomal veya plazmid aracılı indüklenebilir direnç (*ampC* , *erm*) ???

Aklımızda Kalsın

- Pozitif kan kültürü şişelerinden direkt Gram boyaması, bakterilerin ve mayaların hızlı tanımlanmasında kullanılabilecek son derece hızlı ve özellikle hastayı konsülte eden İHKM uzmanının değerlendirmesi halinde oldukça güvenilir bir testtir ve hastalarda klinik sonuçların iyileşmesini sağlar
- Gram boyaması, özellikle kaynakları yeterli olmayan yerler için can simidi bir hızlı tanı testidir, bu nedenle daha fazla ilgi gösterilip, klinik yararını gösteren çalışmalar acilen yapılmalıdır 😊)

