T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

STERİL VÜCUT SIVILARININ AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİYLE TARANMASI VE DİREKT ÖRNEKTEN MALDI-TOF MS İLE MİKROORGANİZMA SAPTANMASI

DR. ESRA BARAN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL-2020

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

STERİL VÜCUT SIVILARININ AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİYLE TARANMASI VE DİREKT ÖRNEKTEN MALDI-TOF MS İLE MİKROORGANİZMA SAPTANMASI

DR. ESRA BARAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. Z. ARZU İLKİ

İSTANBUL-2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde bana her konuda yardımcı olan, her türlü sorunumu açabildiğim, beraber keyifli bir asistanlık süreci geçirdiğim, saygıdeğer tez danışman hocam Prof. Dr Z. Arzu İLKİ'ye, asistanlık eğitimim boyunca değerli katkılarından dolayı hocalarım, Prof. Dr Nurver Ülger Toprak, Prof. Dr M. Ufuk Hasdemir, Prof. Dr Nilgün Çerikçioğlu, Prof. Dr Ayşegül Karahasan ve Dr Öğr. Üyesi Burak Aksu'ya, kendisiyle beraber çok kısa çalışma fırsatı bulmuş olsam da tanışmış olmayı onur saydığım Prof Dr Güner Söyletir'e, tez çalışmam için örnek toplamamda bana yardımcı olan tüm asistan arkadaşlarım Dr Beyza Öncel, Dr Ebru Fidan, Dr Nurcan Duman, Dr Burçin Özalp, Dr Nazmiye Ünlü, Dr Büşra Kaya, Dr Uğur Küçüksu, Dr Bilgehan Ergan, Dr F. Mehmet Akıllı, Dr Turgut Bozan'a, aramızdan ayrılmış olsalar da her zaman desteklerini hissettiğim Uzm Dr Kübra Erdem, Uzm Dr Şerife Yılmaz ve Dr Aslıhan Özanat'a, birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım uzmanlarımız ve laboratuvardaki tüm ekip arkadaşlarıma, çalışmalarımı gerçekleştirirken cihazlarla ilgili her türlü sorumu bıkmadan yanıtlayan Sysmex ürün uzmanı Ramazan Ayaş ve bioMérieux kıdemli ürün uzmanı Ahmet Süel'e ;

Ayrıca her zaman yanımda olan, en büyük destekçim sevgili eşim Halil Baran'a, henüz dört yaşında olmasına rağmen bu zorlu süreçte olgunluğuyla kendisine hayran bırakan oğlum Furkan'a ve bugün bulunduğum konumun esas mimarları, desteğini asla esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2020 Dr Esra BARAN

İÇİNDEKİLER

İçindekiler Tablosu

TEŞEKKÜR ii

ÖZET iv

ABSTRACT vi

KISALTMALAR viii

TABLOLAR DİZİNİ ix

ŞEKİLLER DİZİNİ x

1. GİRİŞ-AMAÇ 1

1. GENEL BİLGİLER 4

2.1. STERİL VÜCUT SIVILARI 4

2.1.1. Beyin Omurilik Sıvısı 4

2.1.2. Periton sıvısı 6

2.1.3. Plevra 9

2.2. STERİL VÜCUT SIVILARINDA HÜCRE SAYIMI 11

2.2.1. Işık mikroskobu ile hücre sayımı 11

2.2.2. Otomatize yöntemler ile hücre sayımı 13

2.3. STERİL VÜCUT SIVILARINDA MİKROBİYOLOJİK TANI 15

2.3.1. Kültür 15

2.3.2. Moleküler yöntemler 15

2.3.3. Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) 16

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 20

3.1. GEREÇLER 20

3.1.1. Araçlar ve aygıtlar 20

3.1.2. Kimyasal maddeler 20

3.2. YÖNTEMLER 21

3.2.1. Hücre sayımı 21

3.2.2. Yöntem karşılaştırılması 22

3.2.3. Mikroskobi ve kültür 22

3.2.4. Direkt örnekten MALDI-TOF MS ile tanımlama 23

4. BULGULAR 27

4.1 DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLER 27

4.1 AKIM SİTOMETRİ (UF-5000) İLE BAKTERİ SAYIM SONUÇLARI 28

4.2. AKIM SİTOMETRİ (UF-5000) İLE LÖKOSİT SAYIM SONUÇLARI 28

4.3. MALDI-TOF MS SONUÇLARI 35

5. TARTIŞMA 45

KAYNAKLAR 53

ÖZET

Başlık: Steril vücut sıvılarının akım sitometi yöntemiyle taranması ve direkt örnekten MALDI-TOF MS ile mikroorganizma saptanması

Öğrencinin Adı: Dr Esra BARAN

Danışman Adı: Prof. Dr Z. Arzu İLKİ

Amaç: Çalışmamızın amacı Steril vücut sıvısı (SVS) örneklerini akım sitometrik bir yöntemle lökosit ve bakteri miktarı açısından değerlendirmek ve muhtemel patojenleri MALDI TOF MS (VITEK MS, bioMérieux, Fransa) ile örnekten hızla tanımlamaktır.

Gereç ve Yöntem: Steril bölge enfeksiyonu şüphesiyle Kasım 2018-Ocak 2020 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen SVS örnekleri çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın ilk bölümünde akım sitometrik yöntem olan Sysmex UF-5000 (Co., Kobe Japonya) ile örneklerde lökosit miktarı saptanıp, aynı örnekte referans yöntem olan Thoma lamıyla lökosit sayımı yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. İkinci kısmında kültür sonuçları ile UF-5000 bakteri sayımları arasındaki ilişki değerlendirilmiş, üçüncü aşamada ise kültür pozitif örnekler 8 saat beyin-kalp infüzyon buyyonda inkübe edildikten sonra MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır.

Bulgular: Çalışmamıza 498 beyin omurilik sıvısı (BOS), 109 periton ve 109 plevra sıvısı dahil edilmiştir. Örneklerin lökosit sayısı açısından akım sitometri ile manuel mikroskobi (MM) sonuçlarının kategorik uyumları Spearman korelasyonu ile analiz edilmiştir. Bunun sonucunda BOS için, yüksek düzeyde uyum (0,717), plevra ve periton örnekleri için ise sırasıyla 0,604, 0,659 şeklinde orta düzeyde uyum saptanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca pozitif kültüre sahip numuneler, negatiflere göre; gram boyalı preparatta bakteri görülen örnekler, görülmeyenlere göre yüksek bakteri sayımları gösterdi ($p<0,05$). Kültürde üreme saptanan örneklerin kısa inkübasyon sonrası %64,2'si MALDI-TOF MS ile doğru tanımlanırken, polimikrobiyal örneklerde patojen bakterilerden herhangi biri %46 oranında doğru tanımlanmıştır.

Sonuç: Sonuçlarımız akım sitometrik yöntemin BOS örneklerinde MM'ye alternatif olabileceğini düşündürmektedir. Periton ve plevra örneklerinde ise saptanan %100 duyarlılık, hastaların gereksiz yere antibiyotik almasını ve olası direnç gelişimini

engelleyecektir. Örnekten kısa inkübasyon sonrası direkt MALDI-TOF MS prosedürü ise SVS enfeksiyonlarına neden olan bakterilerin tanımlanmasını 8,5 saate düşürerek örneğin laboratuvara ulaştığı gün içinde tanımlanabileceğini göstermekte, bu da ciddi bir zaman kazancı sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Vücut sıvısı, hücre sayımı, UF-5000, MALDI-TOF MS, doğrudan tanımlama

ABSTRACT

Objectives: The aim of our study is to evaluate bacteria and white blood cell (WBC) analysis by flow cytometric method in sterile body fluids (BF) and to provide rapid identification possible pathogens of samples with MALDI TOF MS (VITEK MS, bioMérieux, Fransa).

Materials/methods: BF samples submitted to our laboratory with suspected sterile body fluid infection between November 2018 and January 2020 were included in the study. In the first part of the study WBC counts of samples were analyzed with Sysmex UF-5000 (Co., Kobe Japan) based on the principle of flow cytometry and the results were then compared with the reference method (i.e., manual microscopy), by counting in a Thoma chamber. In the second part, the relationship between culture results and UF-5000 bacterial count was evaluated, and in the third stage, culture positive samples were identified by MALDI-TOF MS after incubating in brain-heart infusion broth for 8 hours.

Results: In our study 498 cerebrospinal fluid (CSF), 109 peritoneal and 109 pleural fluids were included. The categorical agreement of flow cytometry and manual microscopy (MM) results was assessed by Spearman correlation for WBC. As a result, a high agreement (0.717) was detected for CSF, and a moderate agreement was found for pleural and peritoneual samples with 0.604 and 0.659, respectively ($p < 0.05$). In addition bacterial counting with flow cytometry was higher among culture positive samples and samples with a positive direct gram stain than culture negative samples and negative direct gram stain. Correct identification rate of MALDI-TOF MS after a short-term incubation, was 64.2% in monomicrobial samples and 46% in one of the pathogens of polymicrobial samples.

Conclusion: Our results show that the flow cytometric method can be an alternative to MM in CSF samples**.** Detection of 100% sensitivity in peritoneal and pleural samples will prevent unnecessary antibiotic treatment and possible resistance development. Direct identification procedure with MALDI-TOF MS after short-term

incubation reduces the identification of pathogen bacteria of BF infections to 8.5 hours. Thus, identification of the sample on the day it arrives at the laboratory saves a considerable amount of time.

Keywords: Body fluid, cell count, UF-5000, MALDI-TOF MS, direct identification

KISALTMALAR

SVS : Steril Vücut Sıvısı

MALDI-TOF MS : Matrix Assisted Laser Desorption / İonization - Time Of Flight Mass Spectrometry

BOS : Beyin omurilik sıvısı

LP : Lomber Ponksiyon

PMNL : Polimorfonükleer lökosit

WBC : White blood cell-Lökosit

PPE : Parapnömonik efüzyon

LDH : Laktat dehidrojenaz

EDTA : etilendiamintetraasetik asit

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

TNC : Toplam çekirdekli hücreler

MNL : Mononükleer hücre

% MNL : Mononükleer hücrelerin tüm lökositlere oranı

PMNL : Polimorfonükleer lökosit

%PMNL : Polimorfonükleer lökositlerin tüm lökositlere oranı

RBC : Eritrosit

EC : Epitel hücreleri

BACT : Bakteri

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

16S rRNA : 16S ribozomal RNA

m / z : kütle / şarj oranı

TOF : Time of flight

CI : Confidence interval = Güven aralığı

BKİB : Beyin-kalp infüzyon buyyon

BF : Body Fluid Mode

V-P : Ventrikülоperitoneal

LoQ : Limits of Quantitation

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Normal BOS bulguları.
Tablo 2: Peritonit için diyagnostik lökosit sınır değerleri.
Tablo 3: Plevral sıvının normal değerleri.
Tablo 4: Vücut sıvılarının korelasyon analizi için belirlenmiş kategori değerleri.
Tablo 5: Kültür üreme sonuçları ile direkt mikroskobi sonuçlarının karşılaştırılması.
Tablo 6: BOS örneklerinin lökosit sayımında manuel yöntem ile akım sitometrik yöntemin kategorik uyumlarının karşılaştırılması.
Tablo 7: Plevra örneklerinin lökosit sayımında manuel yöntem ile akım sitometrik yöntemin kategorik uyumlarının karşılaştırılması.
Tablo 8: Akım sitometrik yöntem (UF5000)'in plevra örneklerinde lökosit sayım performansı.
Tablo 9: Periton örneklerinin lökosit sayımında manuel yöntem ile akım sitometrik yöntemin (UF5000) kategorik uyumlarının karşılaştırılması.
Tablo 10: Akım sitometrik yöntem (UF5000)'in asit sıvısı örneklerinde lökosit sayım performansı.
Tablo 11: Akım sitometrik yöntem (UF5000)'in diyaliz sıvısı örneklerinde lökosit sayım performansı.
Tablo 12: Manuel yöntem ile akım sitometri yönteminin istatistiksel analiz sonuçları.
Tablo 13: Üremeli örneklerin SVS türüne göre ve mikroorganizma sayısına göre dağılımı.
Tablo 14: SVS'lerin patojen sayısı ve gram boyanma özelliklerine göre MALDI-TOF MS ile tanımlanma oranları.
Tablo 15: BOS örneklerinin direkt mikroskobi, kültür ve MALDI-TOF MS sonuçları.
Tablo 16: Periton örneklerinin direkt mikroskobi, kültür ve MALDI-TOF MS sonuçları.
Tablo 17: Plevra örneklerinin direkt mikroskobi, kültür ve MALDI-TOF MS sonuçları.
Tablo 18: Kültürde gram negatif basil üreyen SVS örneklerinin tür dağılımı ve MALDI-TOF MS ile doğru tanımlanma sayıları
Tablo 19: Kültürde gram pozitif mikroorganizma üreyen SVS örneklerinin tür dağılımı ve MALDI-TOF MS ile doğru tanımlanma sayıları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Thoma lamının şematik gösterimi.

Şekil 2: Sayım yapılacak örneğin hazırlanması.

Şekil 3: Flow sitometri yönteminin genel çalışma prensibi.

Şekil 4: MALDI-TOF MS genel çalışma prensibi.

Şekil 5: Direkt örnekten tanımlama prosedürü.

Şekil 6: Steril vücut sıvılarının tabi tutulduğu işlemlere göre dağılımı.

Şekil 7: BOS örneklerinin lineer regresyon grafiği.

Şekil 8: Plevra örneklerinin lineer regresyon grafiği.

Şekil 9: Periton örneklerinin lineer regresyon grafiği.

Şekil 10: SVS örneklerinin sıvı besiyerinden elde edilen spektrumları ile katı besiyerinden izole edilmiş bakteri kolonilerinden elde edilen spektrumlarının karşılaştırılması.

1. GİRİŞ-AMAÇ

Steril vücut sıvı (SVS)'larından; beyin omurilik sıvısı (BOS), periton ve plevra sıvılarının enfeksiyonları sıklıkla ciddi morbidite ve mortalite ile sonuçlanır. Bu nedenle, örneğin hızlı ve doğru mikrobiyolojik değerlendirmesi başarılı hasta yönetimi için önemlidir (1). Acil durumlarda sitometrik analiz (hücre sayımı ve hücre tiplendirilmesi), makroskopik değerlendirme, protein ve albümin ölçümü, serum ve BOS 'taki glukoz konsantrasyonu arasındaki oran, klinik karar vermede destekleyicidir (1, 2). Steril vücut sıvılarındaki hücresel elemanların sayımı ve sınıflandırılması için altın standart, optik mikroskop ile incelemedir, fakat değerlendirmenin uzun sürmesi, gözlemciler arası uyumsuzluk ve özel olarak eğitilmiş personel ihtiyacı bu yöntemi sınırlandırmaktadır (2).

Son yıllarda, sitometrik analiz için pek çok otomatik analizör de kullanılmaktadır (2-4). Akım sitometrik yöntemlerden biri olan UF-5000 (Sysmex Co., Kobe Japonya), Sysmex tarafından, vücut sıvılarında hücre ve oluşan partikülleri saptamaya yönelik yeni nesil otomatik analizörlerden biri olarak sunulmaktadır. Yapılan bir çalışmada 81 BOS örneği UF-5000 ve mikroskobik olarak hücre sayısı açısından değerlendirilmiş ve sonuçlar birbiri ile uyumlu bulunmuştur (4).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları açısından hızlı tanımlama arayışları içinde son yıllarda matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) proteomik teknikler arasında üzerinde en çok çalışılanlardan biridir.

Bakteri kolonilerinin ya da protein ekstraksiyonlarının MALDI-TOF MS ile iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profillerinin çıkarılması esasına dayanmaktadır. Bu profil spektralarına ait grafiksel görüntülerin sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür bazında tanımlanabilmektedir. Kültürde üremiş bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanma işlemi 1-

2 gün sürebilmektedir. MALDI-TOF MS yöntemi ile doğru şekilde tanımlayabilme oranında bir değişiklik olmadan bu süre 1 saate kadar inmektedir. Ayrıca MALDI-TOF MS yöntemi daha önceden 16S rRNA gen sekansı ile ayrılabilen yakın türlerin bile ayrımını başarıyla yapabilmektedir (5).

Rutin laboratuvarlarda koloniden çalışılan bu sistemle son yıllarda kan, idrar gibi direkt örneklerden bakteri saptamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (5, 6).

Literatürde idrar örneklerinde mikrolitrede 10^5 ve üzeri bakteri olduğunda direkt örnekten %91.8 doğru tanımlama yapabildiğini belirten çalışmalar vardır (6). Pozitif kan kültür şişelerinden de, pasaja gerek olmadan tanımlamaya dair çalışmalar önem kazanmaktadır. Bunun sebebi ise sepsis etkeninin kısa sürede belirlenebilmesi (günlere karşın saatler) ve moleküler temelli yöntemlere kıyasla maliyet etkin olmasıdır.

Steril vücut sıvılarından direkt MALDI-TOF MS ile tanımlama az bakteri ihtiva etmelerinden dolayı zor olmakla birlikte Hartmeyer ve arkadaşlarının bildirdiği bir olguda 46 yaşında dört haftadır devam eden kulak ağrısı olan erkek hasta bilinç bulanıklığı ve ateş ile hastaneye başvurmuş, muayenesinde ense sertliği saptanmıştır. Menenjit ön tanısıyla laboratuvara gönderilen BOS örneği bir protokol dahilinde hazırlanarak direkt MALDI-TOF MS ile *Streptococcus pneumoniae* olarak tanımlanmış daha sonra kültür ile doğrulanmıştır (7).

Segawa ve arkadaşlarının bildirdikleri diğer bir olguda menenjit şüpheli bir hastanın BOS'undan direkt MALDI-TOF MS yapılmış ve *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuç hastaya, hızlı tanı ve uygun tedavi şansı sağlamıştır (8).

Bishop ve arkadaşları menenjit şüpheli hastalardan alınan BOS örneklerinin önce gram boyalı mikroskobik incelemelerini yapmış, pozitif saptanan 44 örneği çalışmaya dahil etmişlerdir. Bu örneklerde bulunan mikroorganizmalar direkt MALDI-TOF MS ile tanımlanmaya çalışılmıştır. Özellikle gram negatif basiller için MALDI-TOF MS'in hızlı tanımlamada yararlı olduğu sonucuna varmışlardır (9).

Çalışmamızda akım sitometri yöntemi ile; BOS, plevra, periton gibi steril vücut sıvılarında lökosit varlığı ve sayısı saptanarak referans yöntemle uyumunun değerlendirilmesi, kültür ve gram boyama sonucu ile otomatize bakteri sayımı arasındaki ilişkinin yönü araştırılmıştır. Diğer yandan SVS'lere kısa inkübasyonlu doğrudan tanımlama prosedürü uygulanarak patojen mikroorganizmanın MALDI-TOF MS ile tanımlanmasının geleneksel yöntemlerle karşılaştırılması ve örneğin laboratuvara ulaştığı gün patojen mikroorganizmanın tanımlanmasını sağlayacak hızlı bir tanımlama prosedürünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

Steril vücut sıvılarının enfeksiyonu sıklıkla ciddi mortalite ve morbidite ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle bu örneklerin mümkün olan en kısa sürede ve doğru mikrobiyolojik etkenin tanımlaması başarılı hasta tedavisinde önemlidir.

2.1. Steril Vücut Sıvıları

İnsan vücudunda, sürtünmeyi azaltmaya ve / veya çevreleyen ve hayati organları korumaya hizmet eden steril sıvı ile dolu birçok farklı kompartman vardır. Bu vücut sıvıları, hematojen yayılım ile, cerrahi sonrası veya travma yoluyla enfekte olabilir. Steril vücut sıvıları arasında beyin omurilik sıvısı, plevral sıvı, periton sıvısı, miyokard sıvısı, periton diyaliz sıvısı, vitreus sıvısı ve sinovyal sıvı bulunur (10).

2.1.1. Beyin Omurilik Sıvısı

BOS ventriküllerde bulunan koroid pleksus olarak adlandırılan vasküler yapılarda üretilir ve beyin fonksiyonları için yaşamsal önem taşır (11). BOS lomber ponksiyon (LP) adı verdiğimiz hasta yan yatar pozisyondayken ya da dik otururken, lokal anestezi altında 3. ve 4. ya da 4. ve 5. lomber vertebraların prosesus spinosusları arasından subaraknoid boşluğa bir omurilik iğnesinin sokulmasıyla alınır. Toplanan ilk tüp kimyasal analiz için, ikinci tüp gram boyama ve kültür için üçüncü tüp ise hücre sayımı ve tiplendirmesi için gönderilir (12).

Normal BOS'un hücresel bileşenleri arasında lenfositler, monositler ve nadiren nöroektodermal hücreler bulunur. Bu hücrelerin normal değerleri yaşa bağlıdır. Sağlıklı erişkinlerde hücrelerin üçte ikisinden fazlası lenfosittir.

Monositler ise çekirdekli hücrelerin yaklaşık %14'ünü oluşturur ve bu değer yenidoğanlarda %70'e yükselebilir. Nötrofiller normal BOS'ta mevcut değildir (Tablo 1). Normal BOS berrak ve renksizdir. Bulanıklık artmış eritrosit veya lökosit ile ilşkilidir.

Menenjit, BOS'ta anormal sayıda lökositle ve spesifik semptomlarla seyreden meninkslerin iltihabı olarak tanımlanır (13). Bakteriyel menenjitte nötrofil baskın lökosit artışı olurken, aseptik menenjitte lenfosit baskın lökosit artışı olur (14). Bu nedenle hücre tipinin belirlenmesi enfeksiyonun etkeni konusunda fikir verici olmakta ve ampirik tedaviye yol göstermektedir.

Ventrikülоperitoneal (V-P) şant cerrahisinin en sık görülen komplikasyonu şant enfeksiyonudur. Bu durum şant başarısızlığına neden olabilir ve artan kafa içi basınç ve hidrosefali belirtileriyle kendini gösterir. Çoğunlukla şant yerleştirilmesinden sonraki 6 ay içinde görülür ve patojen sıklıkla deri florası elemanlarıdır (15).

Tablo 1: Normal BOS bulguları.

Hacim	
Bebek	10-60 mL
Çocuk	60-100 mL
Yetişkin	57-286 mL
Renk	Berrak
Hücreler	
Eritrosit	
Yenidoğan	0-800/µL
1-3 Ay	0-50/µL
> 3 Ay	0-5/µL
Yetişkin	0-5/µL
Lökosit	
0-1 Ay	0-27/µL
2 Ay-16 Yaş	0-7/µL
Yetişkin	0-5/µL

Tablo 1: Normal BOS bulguları (devamı).

Lökosit Tipi	
Yenidoğan	
Lenfosit	%2-38/µL
Monosit	%50-94/µL
Histiosit	%1-9/µL
Nötrofil	%0-8/µL
Nöroektodermal	Nadir
Yetişkin	
Lenfosit	%63-99/µL
Monosit	%3-37/µL
Histiosit	Nadir
Nötrofil	%0-2/µL
Nöroektodermal	Nadir

2.1.2. Periton sıvısı

Periton karın iç yüzü ile abdominal organları örten tek sıra mezotel hücrelerinden oluşan seröz bir zardır (16). Periton boşluğu, yüzeyin nemini korumak için yaklaşık 100 mL sıvı içerir ve bu da iç organların hareketlerini kolaylaştırır. Normal periton sıvısı, düşük özgül ağırlığa (<1.016) ve düşük protein içeriğine (genellikle <3g / dL) sahip, <250 / mm3 lökosit içeren berrak sarıdır. Lökositler çoğunlukla mononükleer hücrelerden oluşur (17).

Peritonit, periton boşluğunun mikroorganizmalar, tahriş edici kimyasallar veya her ikisi ile kontaminasyonu sonucu olabilir. Enfektif peritonit, primer (spontan), sekonder veya tersiyer olarak kategorize edilmiştir. Periton diyalizine bağlı peritonit ayrı bir kategori olarak ele alınmaktadır. Peritonit için diyagnostik sınır değerleri Tablo 2'de özetlenmiştir (18).

Tablo 2: Peritonit için diyagnostik lökosit sınır değerleri.

	Asit sıvısı için Diyagnostik Sınır Değer	Periton Diyaliz Sıvısı için Diyagnostik Sınır Değer
Lökosit	>500/μL ya da >1000/μL	>100/μL
PMNL	>250/μL ya da >500/μL	>%50

2.1.2.1. Primer (Spontan) peritonit

Primer peritonit, monomikrobiyal bir enfeksiyondur ve her yaşta ortaya çıkabilir. Esas olarak sirozlu hastalarda görülür, siroz dışı nedenlere bağlı asitin spontan enfeksiyonu nadirdir. Enfeksiyon kaynağı karın dışından kaynaklanır ve hematojen, lenfatik veya transmural yol ile periton boşluğuna yayılır (19).

Siroz ve asitli, hastanede yatan hastalarda primer peritonit prevalansının % 10-30 arasında olduğu tahmin edilmektedir (20). Sirozlu hastalarda, enterik kaynaklı mikroorganizmalar patojenlerin %69'unu oluşturur. En sık etken *Escherichia coli*'dir, bunu *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* ve enterokoklar, diğer Enterobacterales üyeleri takip eder. *Pseudomonas* türleri nadiren görülür (17).

Tanı klinik şüphe olan hastanın asit sıvısından alınan örneğin kültüründe üreme olması ve asit sıvısında PMNL sayısının ≥ 250 hücre/mm³ olması ile konur (21). Bar-Meir ve arkadaşları sirotik hastalarda, spontan bakteriyel peritonit tanısında toplam beyaz kan hücresi (WBC) ve diferansiyel sayısının çok önemli olduğunu bildirmişlerdir (22).

2.1.2.2. Sekonder peritonit

Sekonder peritonit genellikle gastrointestinal veya genitoüriner mikroorganizmaların mukozal bariyer bütünlüğünün kaybına sekonder

peritonun kontaminasyonundan kaynaklanır. Batın içi enfeksiyonların yaklaşık %80-90'ını oluşturur. Birçok sebebi olabilir; peptik ülserin perforasyonu, gastrointestinal veya genitoüriner sistem hastalıkları veya yaralanmaları; batın içi organların travmatik perforasyonu; bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde tifo, tüberküloz, veya sitomegalovirüs ülserleri ile ilişkili spontan perforasyon; apandisit, divertikülit veya bağırsak neoplazmları; peritonun operatif kontaminasyonu veya cerrahi anastomoz bölgesinin bozulması; septik düşük, postoperatif uterus enfeksiyonu veya intrauterin bir cihazı karmaşıklaştıran endometrit; çocuklarda gonokokal salpenjit veya gonokokal vulvovajinit; süpüratif prostatit; batın içi apse rüptürü gibi (17). Tipik olarak polimikrobiyaldir, aerop ve anaerop bakterilerin birlikte bulunduğu gastrointestinal mikrobiotadan kaynaklanır. Karın ağrısı bu hastalardaki en belirgin semptomdur. Tedavide hastanın altta yatan patolojisine göre cerrahi yaklaşım ile kaynak kontrolü esastır (21).

2.1.2.3. Tersiyer peritonit

Tersiyer peritonit en az 48 saat tedaviye rağmen klinik olarak peritonit bulgularının devam etmesi veya tedaviden sonra yeniden gelişmesidir. Çoğunlukla organ disfonksiyonu eşlik eder. Kritik hastalığı olan veya bağışıklığı baskılanmış hastalar arasında daha yaygındır (17). Bozulmuş konak savunmasının bir sonucu olarak, çoğu zaman düşük virülanslı patojenler sorumludur. Bu nedenle, tersiyer peritonitin sorumlu patojenini tahmin etmek zordur. *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas*, *E. coli* ve Candida spp. sorumlu mikroorganizmaların başında gelmekle birlikte nadiren *Bacteroides fragilis* saptanır (23).

Tedavide hemodinamik resüssitasyon, antimikrobiyal tedavi ve cerrahi olarak kaynak kontrolü üç temel basamağı oluşturur (21).

2.1.2.4. Periton diyalizine bağlı peritonit

Peritonit, periton diyalizi uygulanan hastalarda %10-25 oranıyla sık görülen bir komplikasyondur (24). Diyaliz sıvısı boşaltıldığında bulanıksa veya

hastada karın ağrısı varsa peritonitten şüphelenilmelidir. Hücre sayımı ve mikrobiyolojik inceleme için diyalizat örnekleri alınmalıdır. Tanı bu sıvıda lökosit sayısının ≥ 100/mm³ bulunmasıyla konulur. Ancak lökosit sayısı, bekleme süresinden etkilenir, bu nedenle bekleyen örnekte nötrofillerin oranı %50'yi aşarsa da, peritonitin ampirik tedavisine başlanmalıdır (25). Etken olarak, %50'si gram-pozitif bakteriler, %15-20'sinde gram-negatif bakteriler sorumlu iken yaklaşık %4'ü polimikrobiyaldir. Uluslararası Periton Diyalizi Derneği (ISPD) kılavuzları, gram-pozitif ve gram-negatif organizmaları kapsayan ampirik antibiyotik rejimlerinin mümkün olan en kısa sürede başlanmasını önermektedir (26).

2.1.3. Plevra

Plevral boşluk, pariyetal ve visseral membranlar arasında yer alır ve her akciğeri çevreleyen küçük bir hacimde (<10 mL) seröz sıvı içerir. Sıvının hacmi, pariyetal membranlarda kan plazma ultrafiltratının oluşturulduğu ve visseral membranda emildiği dinamik bir işlemle kontrol edilir. Sıvı, membranlar arasındaki yüzey gerilimini etkili bir şekilde azaltan proteinleri barındırır. Plevral efüzyon, plevral boşlukta herhangi bir nedenle aşırı miktarda sıvı birikmesidir. Plevral efüzyonlar göğüs ağrısı, öksürük ve nefes darlığı semptomlarına neden olur ve fizik muayene ve / veya torasik görüntüleme ile tespit edilir. Torasentez, plevral efüzyonun hasta oturtulup hafif öne eğik pozisyondayken lokal anestezi sonrası skapula'nın alt ucunda, arka interkostal boşluktan ultrason eşliğinde girilerek alınması işlemidir (12).

Torasentez sonucu alınan efüzyon biyokimyasal incelemeler sonucunda transuda ve eksuda olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırmada üç kriter kullanılır (Light’s kriterleri):

- Plevral sıvı/serum protein oranı> 0.5
- Plevral sıvı/serum laktat dehidrojenaz (LDH) oranı> 0.6
- Plevral sıvı laktat LDH düzeyi serum referans aralığının üst sınırının üçte ikisinden fazla

Bu kriterlerden en az biri mevcutsa, sıvı hemen hemen her zaman bir eksudadır; hiçbiri yoksa transudadır (27). Light ve arkadaşları bu kriterlere ek olarak eksüdatif efüzyonlarda WBC'lerin >1000 / μL, transüdatif efüzyonlarda WBC'lerin <1000 / μL olma eğiliminde olduğunu saptamışlardır (28).

Efüzyon pnömoniye sekonder oluşmuşsa parapnömonik efüzyon (PPE) adını alır ve patogenezi üç evrede incelenebilir:

1. Komplike olmayan PPE: Pnömoninin 2 ila 5. günlerinde oluşur ve eksudatif özelliktedir. Efüzyondaki baskın hücre tipi nötrofildir. Tedavi verilmezse ikinci evreye ilerler.
2. Komplike PPE: Plevral sıvıda nötrofil sayısı gittikçe artar ve nötrofillerin parçalanması sonucu LDH seviyeleri genellikle 1000 IU/L üzerinde saptanır. Bakteriyel invazyon devam eder. Tedavi edilmezse üçüncü evreye ilerler.
3. Ampiyem: Torasentezle elde edilen efüzyon aşırı derecede pürülandır. Visseral plevrada fibrozis oluşabilir. Bu nedenle drenaj yapılmalıdır (16).

Komplike efüzyonları, komplike olmayan efüzyonlardan ayırt etmek için en yararlı testler düşük pH (<7.2) veya düşük glikozdur (<60mg / dL veya <3.33mmol / L) (12).

Efüzyondaki lökosit sayıları ve tipi enflamatuvar yanıtın durumunu yansıtır. Nötrofil baskınlığı olan bir plevral sıvı, enflamatuvar yanıtın erken evresi ile ilişkilidir; çeşitli bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan durumlarda bulunabilir. Aksine, lenfosit baskınlığı subakut veya kronik bir süreci gösterir (29).

İnsanlarda plevral sıvının normal referans aralıkları için sınırlı sayıda çalışma yapılmış olup hacim, hücre sayımları ve hücre tipleri analiz edilmiştir. Bu plevral sıvı çalışmalarının sonuçları Tablo 3'de gösterilmiştir (30).

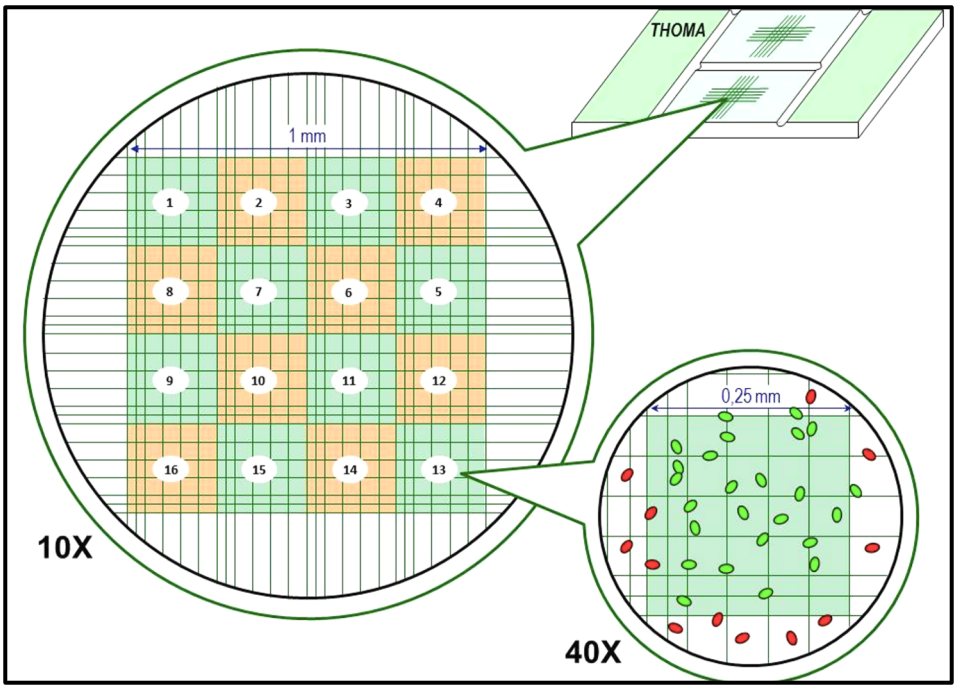
Tablo 3: Plevral sıvının normal değerleri.

Hacim	4.1-12.7 mL
Toplam Çekirdekli Hücre Sayısı	1395-3734/μL
Makrofaj	%64-80
Lenfosit	%18-36
Nötrofil	%0-1
Mezoteliyal Hücre	%0-2

2.2. Steril Vücut Sıvılarında Hücre Sayımı

2.2.1. Işık mikroskobu ile hücre sayımı

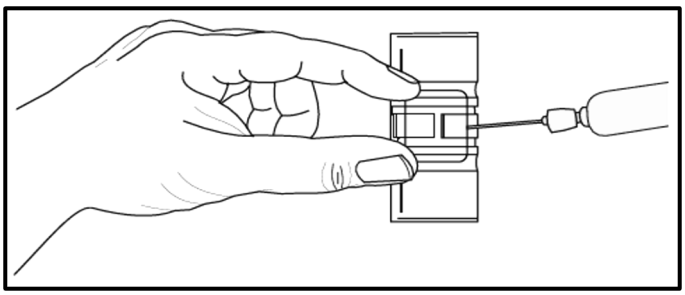
Steril vücut sıvılarının hücre sayımında altın standart yöntem Thoma, Neubauer, Burker ve Fuchs-Rosenthal gibi lamlarla ışık mikroskobu ile sayılmasıdır (1). Thoma lamı büyük merkezi bir kare içerir. Bu büyük kare 1 mm² alana sahip olup 16 orta büyüklükteki kareye bölünmüştür ve her biri 25 küçük kareye sahiptir (Şekil 1). Derinliği 0,1mm olan büyük karenin hacmi 0,1 mm³'tür.



Şekil 1: Thoma lamının şematik gösterimi.

Örneğin sayıma hazır hale getirilmesi:

Lamel lamın üzerine yerleştirilir ve Şekil 2‘de görüldüğü gibi lamelin kenarından incelenecek örnek yavaşça hücre sayım kamarasını doldurana kadar eklenir.



Şekil 2: Sayım yapılacak örneğin hazırlanması.

Lam mikroskop altına yerleştirilerek 10x objektifinde sayım alanı bulunur ve hücrelerin eşit dağılımından emin olunur. 40x objektifinde orta büyülükte karelerdeki tüm hücreler ile karenin üst ve sağ taraflarında olan hücreler sayılır. Bu yaklaşımı takiben, Şekil 1‘de gösterildiği gibi yeşil renkli hücreler sayılır, ancak kırmızı renkli hücreler sayılmaz.

Mikrolitredeki hücre sayısı Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) H56-P kılavuzuna göre aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$H\ddot{u}cre/\mu l = \frac{Sayılan\ H\ddot{u}cre}{sayım\ alanı \times lam\ derinliği \times dil\ddot{u}syon\ fakt\ddot{o}r\ddot{u}}$$

CLSI H56-P BOS’un hücre sayımı için antikoagülansız steril kap önerirken, seröz sıvıların (periton, plevra gibi) hücre sayımı ve tiplendirmesi için etilendiamintetraasetik asit (EDTA)’li antikoagülan tüplerinin kullanımını önermektedir (14). Plevral sıvılarda EDTA’ lı antikoagülan tüplerinin, yanlış

düşük WBC sayımlarına yol açabilecek hücre kümelenmesini azalttığı gösterilmiştir (12).

2.2.2. Otomatize yöntemler ile hücre sayımı

Vücut sıvısı hücre sayımı gerçekleştirmek için birkaç araç vardır ve bu cihazlar empedans, dijital görüntüleme akış sitometrisi, akış sitometri (flow sitometri), ışık saçılması, boyalar ve floresan veya bu teknolojilerin bir kombinasyonunu içerebilir. Otomatik cihazlardaki temel sorun düşük hücre seviyelerinde güvenilir sayımlar elde edilememesidir (CLSI H56-P).

2.2.2.1. Akım sitometri (Flow sitometri) yöntemi

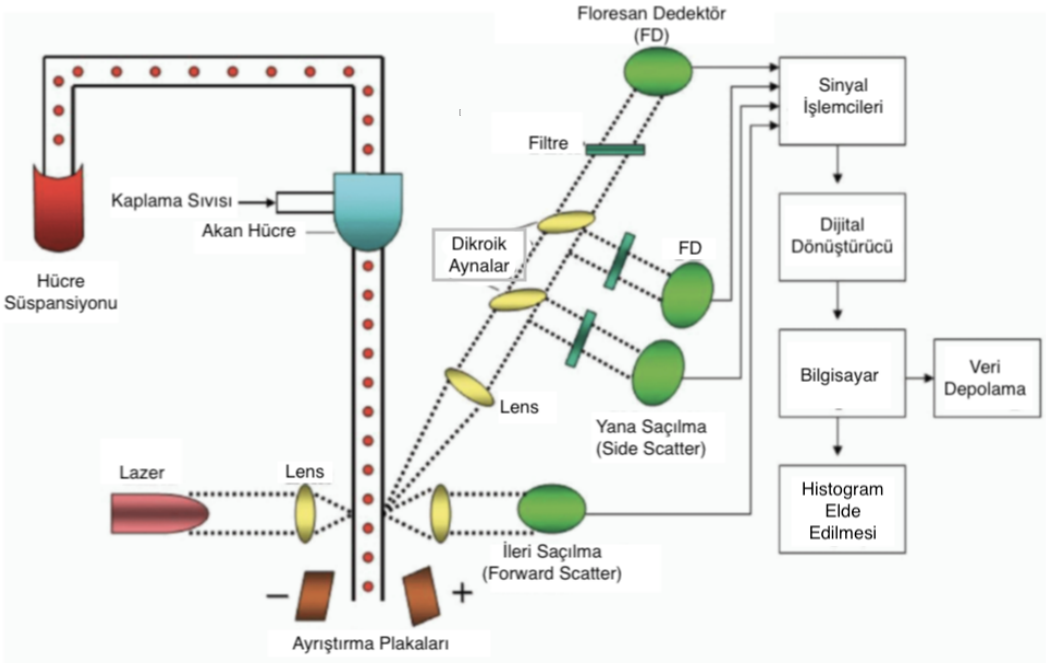
Flow sitometri, bir kanal içinde akan sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesidir. Bu yöntemle hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüleritesi değerlendirilir. Hedeflenen yapı önce floresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya kullanılarak işaretlenir (31). Süspansiyon içindeki her bir hücre veya partikül kanal boyunca ilerler, lazer demetinin içinden geçerken çeşitli saçılımlara ve floresan ışık yayılımına sebep olur. Işığın fotonları optik filtrelerden ve lenslerden geçtikten sonra, dedektörlere çarpar ve elektronlara dönüştürülür. Elektronik sinyaller veya voltaj darbeleri 1 ila 10 V arasında çeşitli büyüklüklerde analog sinyallerdir. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımları gösteren grafiktir (Şekil 3 (32)).

Temel olarak bir flow sitometri cihazından:

1-İleri saçılma grafiği (Forward scatter) ile yaklaşık büyüklüğü

2-Yana saçılma grafiği (Side scatter) ile yaklaşık granülitesi

3-Floresans grafiği ile hücrenin RNA ve DNA miktarı gibi kantitatif hücre içi ve yüzey özellikleri hakkında bilgiler ediniriz (31).



Şekil 3: Flow sitometri yönteminin genel çalışma prensibi.

Sysmex UF-5000 Vücut sıvısı modu:

UF-5000 laboratuvarımızda idrar örneklerinin analizi için kullanılan bir cihazdır. Flow sitometri prensibine dayanarak vücut sıvılarında analiz gerçekleştirir. Analiz için 600 µL vücut sıvısı örneği gerektirir. Analizör herhangi bir manuel numune ön işlemi gerektirmez ve saatte 20 vücut sıvısı örneği çalışabilir. İdrar modundan vücut sıvısı moduna geçildiğinde, otomatik olarak bir durulama yapar ve ardından idrar örneklerinden taşınmasını önlemek için bir arka plan kontrolü gerçekleştirir. Vücut sıvısı modunda numune taşınmasını önlemek için numune analizinden önce otomatik bir durulama daha yapar (4). Vücut sıvılarındaki yedi parametreye dair mikrolitredeki kantitatif sayım sonuçlarını verir. (Toplam çekirdekli hücreler-TNC, lökosit-WBC, mononükleer hücre-MNL, mononükleer hücrelerin tüm lökositlere oranı-% MNL, polimorfonükleer hücre-PMNL, polimorfonükleer

hücrelerin tüm lökositlere oranı % PMNL, eritrosit-RBC, epitelyal hücreler-EC ve bakteriler-BACT)

2.3. Steril Vücut Sıvılarında Mikrobiyolojik Tanı

Steril vücut sıvılarının enfeksiyonları yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olduğundan mikrobiyolojik laboratuvar testleri hasta bakımında çok önemlidir. Bu nedenle örnek laboratuvara ulaşır ulaşmaz işleme alınmalıdır. Mikroorganizmaların doğru ve hızlı tanımlanması enfeksiyon kontrolü ve antimikrobiyal tedaviye önemli oranda katkı sağlar. Aynı zamanda hızlı teşhis antimikrobiyal direncin yayılmasını ve gereksiz antibiyotik kullanılmasını önler (33).

2.3.1. Kültür

Kültür steril bölge enfeksiyonlarının mikrobiyolojik etkenlerinin tanımlanmasında hâlâ standart yöntem olma özelliğini korumaktadır. Laboratuvara ulaşan örneklerin kültürü, alınan vücut bölgesiyle ilişkili olarak üremesi en muhtemel mikroorganizmaya göre seçilen besiyerlerine inoküle edilerek yapılır. Genellikle besiyerleri, geniş bir bakteri yelpazesini destekleyen koyun kanlı agar veya çukulata agar ve gram negatif bakteriler için seçici olan MacConkey agar olarak tercih edilir. Steril vücut sıvıları kültür ekiminden önce düşük bir organizma yüküne sahip olabileceğinden santrifüjleme veya başka bir şekilde konsantre etme gibi ek işlem gerektirebilir. Ekimden sonra plaklar, yine şüphelenilen potansiyel bakteriyel patojenlerin büyümesini destekleyen koşullar altında inkübe edilir (10).

2.3.2. Moleküler yöntemler

Steril vücut sıvılarındaki düşük mikroorganizma yükü, antimikrobiyal ilaçların kullanımı veya kültüre edilemeyen bakteri varlığı mikroorganizmaların izolasyonunda zorluklara neden olabilir. Son yıllarda, moleküler tespit yöntemlerinin hızlı ve hassas olması rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmasını sağlamıştır (34).

Moleküler teknikler arasında patojene özgü, multipleks ve geniş aralıklı yöntemler bulunur. Patojene özgü tekniklerin klinik yararlılığı, farklı enfeksiyon türlerinde potansiyel olarak yer alan patojenlerle sınırlıdır. Multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time PCR) ise bir genin büyük miktarlarda kopyasını üreterek patojenlerin hızlı tanımlanmasını kolaylaştırır ve rutin kullanım için umut verici bir yaklaşımdır. Kan ve kan dışındaki klinik örnekler için, bu testler muhtemel patojen mikroorganizmaların tespiti için büyük bir potansiyel göstermektedir. Multipleks PCR'ın sınırlılığı spektrumunda bulunmayan mikroorganizmaların tespit edilememesidir (35).

16S ribozomal RNA (16S rRNA) geni bakteriyel ribozomun 30S alt biriminin RNA bileşenini kodlar ve tüm bakterilerde mevcuttur. Bu nedenle 16S rRNA'nın PCR amplifikasyonu yoluyla saptanması, taksonomik çalışmalar ve bakteri türlerinin tanımlanması için kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda klinik örneklerden 16S rRNA'nın dizi analizi ile patojen organizma tanımlanması, yüksek enfeksiyon şüphesi olup kültür yapılamayan bakteriler için, örnekleme öncesi antibiyotik kullanımı olan hastalar için faydalı olduğu bulunmuştur (34).

2.3.3. Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS)

Klinik örneklerden bakterilerin hızlı ve doğru tanımlanması, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının kritik bir fonksiyonudur. Tarihsel olarak mikrobiyal kesin tanımlama kültüre, biyokimyasal testlere, antijenik tahlillere veya hedefe özgü moleküllere bağlıydı. Günümüzde MALDI-TOF MS ve sekans tabanlı tanımlama gibi modern teşhis yöntemleri ön plandadır. Yüksek analitik duyarlılığı ile MALDI-TOF MS, mikrobiyal tanımlama için yararlıdır. Klinik örneklerden bakteri, mantar ve mikobakterilerin kesin olarak tanımlanması için gereken süreyi önemli ölçüde azaltır. Numune hazırlamanın basit ve tekrarlanabilir nitelikte olması ve sonuçların doğrudan

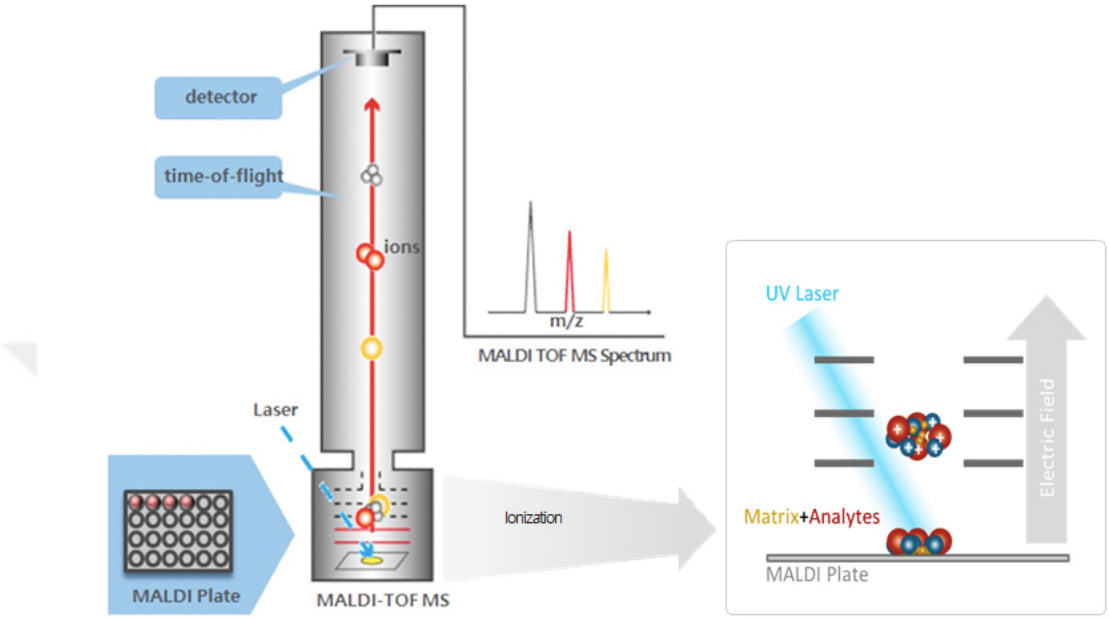
laboratuvar bilgi sistemine aktarılabilir olması MALDI TOF MS'ni rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarının vazgeçilmezi haline getirmiştir (36).

Çalışma Prensibi:

MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlanması, klinik numune içindeki proteinlerin iyonizasyonuna bağlıdır. Tanımlanmak istenen katı besiyerinde üremiş koloni ya da klinik materyalden elde edilmiş protein ekstraksiyonu metal hedef plakası üzerinde bulunan kuyucuklara yayılır. Üzeri matriks adı verilen enerji emici, vakumda iyonlar oluşturmak için kolayca buharlaşabilen, düşük buhar basıncına sahip organik bir bileşik çözeltisi ile kaplanır. Matriks kuruyup kristalleştiğinde, numune de birlikte kristalleşir. Plaka daha sonra MALDI-TOF MS cihazına yüklenir Matriks içindeki numune, lazer ışını ile otomatik bir modda iyonize edilir. Lazer ışını ile desorpsiyon ve iyonizasyon, numunedeki analitlerden tek başına protonlanmış iyonlar üretir. Protonlanmış iyonlar daha sonra sabit bir potansiyelde hızlandırılır, burada bunlar kütle / şarj oranlarına (m / z) göre birbirlerinden ayrılır. Yüklü analitler daha sonra uçuş zamanı (TOF) analizörleri kullanılarak tespit edilir ve m / z oranına bağlı olarak iyonların uçuş tüpündeki zamanı ölçülür. TOF bilgisine dayanarak, numunedeki analitler için peptit kütle parmak izi adı verilen karakteristik bir spektrum üretilir. Elde edilen bilinmeyen mikroorganizmanın spektrumu veritabanında bulunan bilinen parmak izleri ile karşılaştırılarak tanımlama yapılır (Şekil 4). Mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması için esas olarak ribozomal proteinleri temsil eden 2-20 kDa m / z kütle aralığı kullanılır (37).

Hasta yönetimi açısından hızlı tanımlama istenen klinik durumlarda; doğrudan kan kültüründen, idrar, BOS gibi klinik örneklerden de analiz yapılır (38). Wang ve arkadaşları idrar yolu enfeksiyonu şüphesi olan hastaların idrar örneklerinin ilk olarak flow sitometri prensibiyle çalışan UF-1000i (Sysmex Co., Kobe Japonya) cihazı ile analizini gerçekleştirip, neden olan bakterileri MALDI-TOF MS ile tanımlamayı amaçladıkları bir çalışma yapmıştır. UF-1000i ile negatif örnekler elimine edilmiş, pozitif örnekler ileri

tanımlama için MALDI-TOF MS ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak MALDI-TOF MS ile kombine edilen UF-1000i analizi, % 94.3 geleneksel yöntemlerle tutarlı sonuçlar üretmiş ve % 94.8 doğru sonucu vermiştir (39)



Şekil 4: MALDI-TOF MS genel çalışma prensibi

Direkt örnekten yapılan analizlerde tanımlama öncesinde protein ekstraksiyonu gibi bazı hazırlık aşamaları bulunmaktadır. Bu yöntemlerin rutin laboratuvarlarda uygulanabilmesi için hazırlık aşamasının kısa ve herkes tarafından yapılabilir olması sarttır. Simon ve arkadaşlarının pozitif kan kültür şişelerinden direkt tanımlamaya yönelik yaptıkları çalışmada protein ekstraksiyon süresinin kısa olması ve yüksek tanımlama oranları elde edilmesinden dolayı kan kültür şişelerinden direkt MALDI-TOF MS ile tanımlama rutin laboratuvar uygulamalarına dahil edilmiştir. Bu uygulama katı besiyerinden tanımlamaya göre 12-24 saat daha kısadır (40)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09.2018.833 protokol kodlu ve 07.12.2018 tarihli izni ile yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Araçlar ve aygıtlar

- Tek kanallı otomatik pipetler (Ratiolab, Almanya)
- Tek kullanımlık pipet uçları 1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)
- 1,5 ml; 2 ml lik mikrotüpler (Ratiolab, Almanya)
- (-20 °C) Dondurucu (Uğur, Türkiye)
- (-80 °C) Dondurucu (Ratiolab, Almanya)
- Vorteks (IKA, ABD)
- Santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge, Almanya)
- Etüv (WTC-Binder, Danimarka)
- Anoxomat (MART Microbiology B. V., Hollanda)
- Sysmex UF-5000 (Co., Kobe Japonya)
- MALDI-TOF MS (VITEK MS, bioMérieux, Fransa)
- VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa)

3.1.2. Kimyasal maddeler

- Deiyonize su
- Formik asit (Merck Kimya, Almanya)
- Asetonitril (Merck Kimya, Almanya)
- Absolute etanol (Tekkim Kimya, Türkiye)
- α-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA-matriks solüsyonu)
- Beyin-Kalp infüzyon buyyon (Biolife, BMV kimya, Türkiye)

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına Aralık 2018-Ocak 2020 tarihleri arasında gönderilen 498 BOS, 109 periton ve 109 plevra sıvısı örnekleri çalışmaya dahil edildi. Periton ve plevra için tekrarlayan örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Dren, göğüs tüpü ve şanttan alınan örnekler ile aynı hastanın farklı mikroorganizma saptanan örnekleri çalışmanın kapsamı içindedir.

3.2. Yöntemler

Enfekte olduğu düşünülen steril vücut sıvıları laboratuvara ulaştığında üç porsiyona ayrıldı. Birincisi hücre sayımı ve kültür işlemleri, ikincisi akım sitometrik yöntem (Sysmex UF-5000) ile otomatize hücre sayımı için kullanıldı. Bir mL'lik üçüncü kısım daha sonra örnekten tanımlama prosedürüne tabi tutulmak üzere mikrotüplere konularak -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.1. Hücre sayımı

Örneklerin ilk porsiyonundan yaklaşık 5 µL Thoma lamının hücre sayım kamarasına koyularak mikroskobun 40x objektifinde hücre sayımı gerçekleştirildi ve hesaplamalar sonucu mm^3 teki sayısı verildi. Daha sonra ikinci porsiyondan 600 µl örnek steril mikrotüp içine pipetlendi ve Sysmex UF-5000 vücut sıvısı modu ile analiz edildi. Analiz sonucunda TNC, WBC, MNL, % MNL, PMNL, % PMNL, RBC, EC ve bakteriler ile ilgili kantitatif sonuçlar elde edildi. Optik mikroskopta saydığımız mm^3 teki hücre sayısı UF-5000'deki WBC sonucuna karşılık gelmekteydi. Üreticinin önerdiği gibi her gün bir yüksek ve bir düşük pozitif kontrol ile ölçüm yapılarak uygun aralıkta olması halinde çalışmalar gerçekleştirildi.

Manuel mikroskobi sonucu ile UF-5000 lökosit ölçüm sonuçlarının birbiri ile uyumunu göstermek için Spearman Korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için numuneler, numune tipine göre belirlenen sınır değerleri ile beş gruba ayrılmıştır (Tablo 4)(41). Kategorik uyum vücut sıvısındaki hücre

sayımı sonuçlarının klinik önemi ile regresyon analizinden daha fazla bağlantılıdır. Örneğin; manuel yöntemle 600 WBC saydığımız bir BOS örneğinin otomatik analizörde 1000 ölçülmesiyle gözlemlenen uyumsuzluk regresyon analizini etkiler, ancak klinik olarak anlamlı değildir. Her iki sonuç da aynı klinik anlamlılık kategorisine aittir.

Tablo 4: Vücut sıvılarının korelasyon analizi için belirlenmiş kategori değerleri.

		Hücre/µL		
	KATEGORİ	**BOS**	**ASİT SIVISI**	**PLEVRAL SIVI**
Lökosit (WBC)	1	<10	<100	<200
	2	10-80	100-250	200-500
	3	80-190	250-1.000	500-1.000
	4	190-500	1.000-10.000	1.000-2.000
	5	>500	>10.000	>2.000

3.2.2. Yöntem karşılaştırılması

İstatistiksel analiz için, IBM SPSS sürüm 17.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanıldı. Manuel yöntem ile akım sitometrik otomatize sistemin lökosit açısından kategorik uyumunu ve öngörü ölçütünü göstermek için Spearman Korelasyon analizi ve Anova regresyon analizi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık %90 güven aralığına göre (CI) hesaplanmış olup $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Akım sitometrik yöntem (UF-5000) ile ölçülen bakteri değeri bağımlı, kültür ve gram boyama sonuçları bağımsız değişkenler olarak tanımlandı. Bağımsız değişkenlerin gruplar arası dağılımı, iki bağımsız değişkenin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirildi. Elde edilen fark, p değeri <0.05 ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.3. Mikroskobi ve kültür

Örneklerden sitosantrifüj ile iki adet preparat hazırlanarak birisi gram boyama yöntemi ile boyandı; ikinci preparat ise yedek olmak üzere boyasız olarak kaldırıldı. Gram boyalı preparatlar lökosit varlığı / farklılaşması; bakteri varlığı, bakterinin boyanma özellikleri ve morfolojisi bakımından değerlendirildi. Diyaliz sıvısı olarak gönderilen periton örnekleri önce 50 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi daha sonra üst kısım atılarak dip kısımdan preparat hazırlama ve diğer işlemleri yapıldı.

Kültür işlemleri için periton ve plevra sıvıları dört katı besiyerine ekildi (%5 koyun kanlı agar, Mac Conkey Agar, Çukulata agar, Brucella agar) ve zenginleştirici sıvı besiyeri olarak da tiyoglikolatlı buyyon kullanıldı. BOS ise iki katı besiyerine ve tiyoglikolatlı buyyona ekildi (%5 koyun kanlı agar, Çukulata agar). %5 koyun kanlı agar, Mac Conkey Agar, Çukulata agara ekili örnekler aerop ortamda beş günlük, Brucella agara ekili örnekler ise anaerop ortamda (anaerop jar veya anaerop kabin) yedi günlük inkubasyona kaldırıldı. Petrilerde üreme olması durumunda mikroorganizmalar konvansiyonel yöntemlerle ve MALDI-TOF MS ile tanımlandı. Katı besiyerinde üreme olmayıp sadece sıvı besiyerinde üreme olan örnekler için eğer bulanıklık varsa besiyerinden gram boyama yapılarak mikroskopta değerlendirildi. Mikroorganizma görülmesi durumunda ise sıvı besiyerinden Çukulata agara ve Brucella agara ekim yapılarak iki günlük aerop (çukulata agar) ve anaerop ortamda (Brucella agar) inkubasyona kaldırıldı. Kültür plaklarında üreyen koloniler MALDI-TOF MS (Vitek, bioMérieux, Fransa) ile tanımlandı. MALDI-TOF MS tanımlama sonucu şüpheli olan örneklerde mikroorganizmanın biyokimyasal özelliklerine dayalı tanımlama yapan VITEK®2 Compact (bioMérieux, Fransa) cihazı kullanıldı.

3.2.4. Direkt örnekten MALDI-TOF MS ile tanımlama

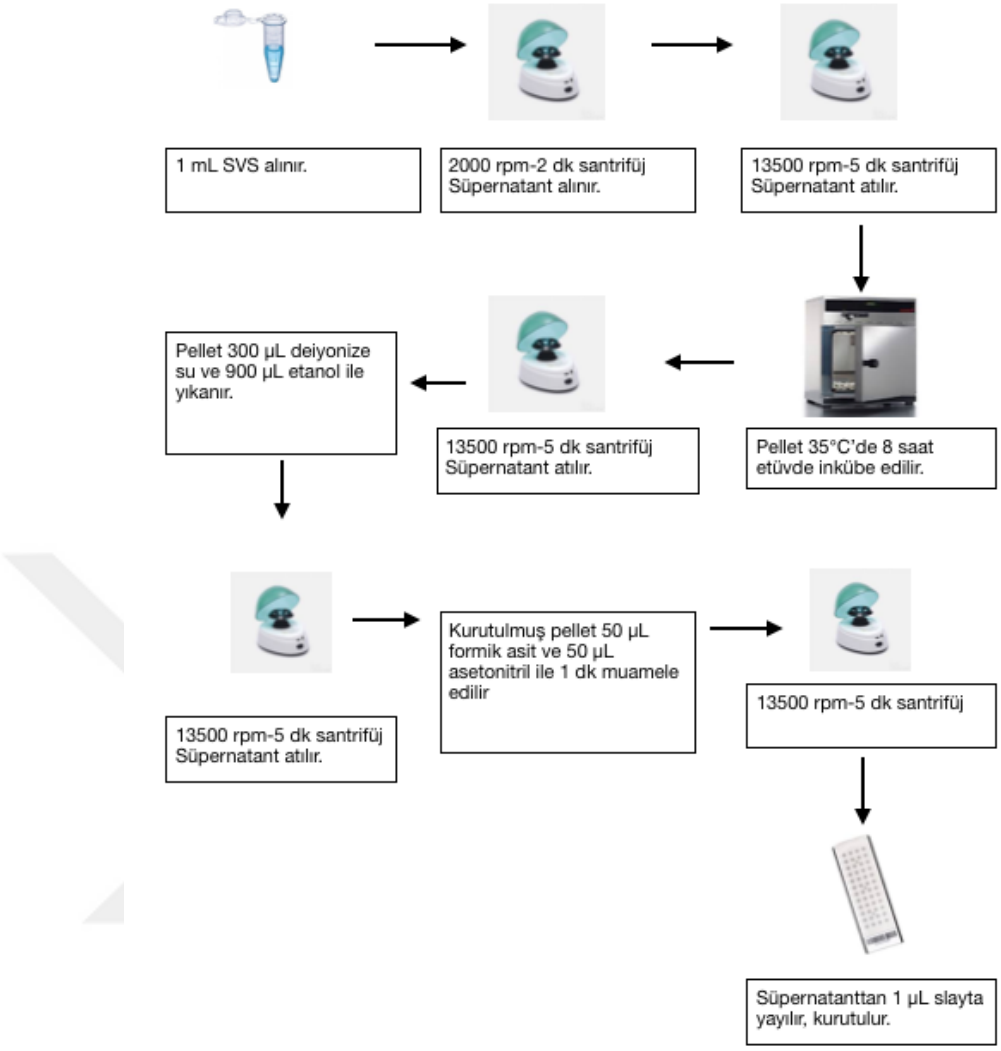
Direkt örnekten MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılırken öncesinde insan hücrelerinin eliminasyonu ve bakteri proteinlerinin elde edilmesi

gerekmektedir. Literatürde bu amaç için uygulanan farklı prosedürler bulunmakla birlikte temel iş akış basamakları hepsinde şu şekildedir (42):

1. Düşük devir santrifüj ile hücresel elemanların uzaklaştırılması
2. Lizis basamağı
3. Yüksek devir santrifüj ile bakteri pelletinin eldesi
4. Yıkama basamağı
5. Formik asit muamelesi (Tercihen)

Laboratuvara ulaşan örneklerden kültürde üreyip etken olduğu düşünülenler, -80℃ derin dondurucudan çıkarıldı ve tedricen çözdürüldü. Daha önceki çalışmalarla minimum 6 saatlik inkübasyonun bakteri konsantrasyonunda 2 ila 4 log artış sağladığı saptandığından (43) aerop bakteriler için beyin-kalp infüzyon buyyon (BKİB) da 8 saatlik inkübasyon tercih edilmiştir. Anaerop bakteri üremesi olan 3 SVS örneği BKİB'e süspanse edildikten sonra jara koyuldu. Jar içi Anoxomat (MART Microbiology B. V., Hollanda) ile anaerop hale getirildikten sonra etüvde 10 saat inkübe edildi. Çözdürülen örneklere aşağıda belirtilen kısa inkübasyonlu doğrudan tanımlama prosedürü uygulandı (Y. Duman, 2016, XXXVII. TMC Kongresi, sözlü bildiri).

1) 1 mL örnek 2000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
2) Süpernatant alınarak 13500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
3) Süpernatant atıldı ve pellete 1 mL BKİB eklendi.
4) 35℃ etüvde 8 saat inkübe edildi.
5) İnkübasyon sununda 13500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
6) Pellet 300 µL deiyonize su ve 900 µL absolute etanol ile yıkandıktan sonra 13500 rpm'de 5 dk tekrar santrifüj edildi.
7) Süpernatant atılıp pellet kurutulduktan sonra 50 µL %70 formik asit ve 50 µL asetonitril eklendi. 1 dakika beklendi.
8) 13500 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
9) Süpernatanttan 1 µL slayta koyuldu ve kuruduktan sonra matriks (CHCA) damlatıldı.
10) Kuruduktan sonra MS cihazına tanımlama için yüklendi (Şekil 5)



Şekil 5: Direkt örnekten tanımlama prosedürü.

İnkübasyonu dolan SVS pelleti içeren tüm BKİB'lere ekstraksiyon prosedürü uygulanmadan önce 10 µL'lik kalibre özeyle koyun kanlı agara sayım plağı yöntemiyle ekim yapılarak çözdürülen örneklerdeki bakterilerin canlılığı kontrol edildi.

Prosedür sonrası örnekler, VITEK® MS IVD sistemi (bioMérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. Hedef plakaların *E. coli* ATCC 8739 kullanılarak kalite kontrolü sağlandı ve kalibre edildi. Örnekler, 2.000 - 20.000 Da kütle aralığında MALDI-TOF MS ile 100 ölçüm sonuçları esas alınarak kütle spektrumları elde edildi. Bu spektrumlar VITEK MS v3.2 veri tabanı kullanılarak analiz edildi ve Myla v4.7.1 ara yazılım kullanılarak tanımlandı.

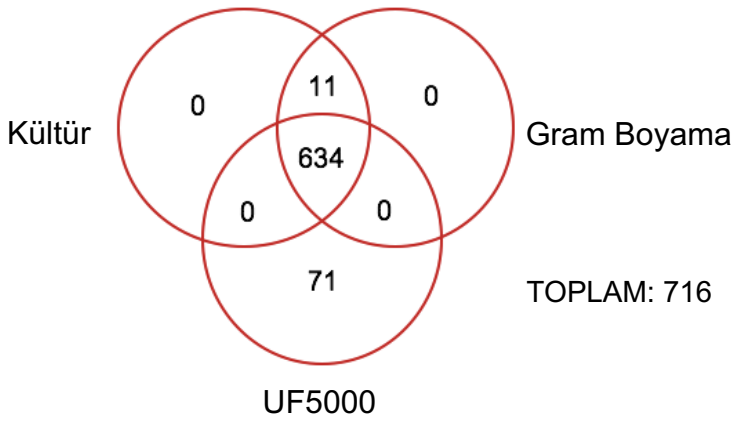
Tek bir organizmanın veri tabanı spektrumu ile eşleşmenin ≥% 60'lık güven değerinde olması, tür düzeyinde iyi bir tanımlama olduğunu göstermiştir (44). Kısa süreli inkübasyon sonrası protein ekstraksiyon yöntemiyle MALDI-TOF-MS kullanılarak tanımlanan bakteriler, gece boyunca inkübe edilerek katı besiyerinden izole edilmiş kolonilerin tanımlanmasına dayanan referans yöntemle karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1 Demografik ve Klinik Özellikler

Çalışmamıza 498 BOS, 109 plevra ve 109 periton sıvısı toplam 716 SVS örneği dahil edildi. BOS, periton ve plevra sıvısı örnekleri için yaş ortalamaları sırasıyla 23,9, 44,7 ve 53,7 olarak saptandı. Cinsiyet dağılımı birbirine yakın olup %50,3'ü kadın hastalara aitti. BOS örneklerinde çocuk hastalardan gelen örnekler daha fazla iken (%54,2), periton ve plevra sıvıları için erişkin hastalar (sırasıyla %74,2, %91,5) ağırlıktaydı.

Dahil edilen örneklerin kimi zaman çeşitli sebeplerle (miktar yetersizliği, örnek viskozitesi vs) kültür, gram boyama ve UF-5000 ile analizi aynı anda mümkün olmamıştır. Örneklerin hangi işlemlere tabi tutulduğunun dağılımı Şekil 6'da özetlenmiştir. Otomatize sistem sayımı, gram boyalı mikroskobik inceleme ve kültür ekimlerinin aynı anda gerçekleştirildiği 634 örneğin 110 (%17,3)'u kültürde üremiştir. Gram boyamanın duyarlılığı %48,1, özgüllüğü %98,6 olarak saptanmıştır (Tablo 5).



Şekil 6: Steril vücut sıvılarının tabi tutulduğu işlemlere göre dağılımı.

Tablo 5: Kültür üreme sonuçları ile direkt mikroskobi sonuçlarının karşılaştırılması.

		KÜLTÜR		
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	TOPLAM n (%)
DİREKT İNCELEME (Gram Boyama)	Negatif *	517(99)	57(51,8)	574(90,5)
	Pozitif *	7(1)	53(48,2)	60(9,5)
	TOPLAM	524(82,6)	110(17,4)	634

Duyarlılık: %48,1, **Özgüllük:** %98,6, **Pozitif Prediktif Değer:** %88,3, **Negatif Prediktif Değer:** %90, *: Negatif= Gram boyalı preparatta mikroorganizma görülmedi, Pozitif= Gram boyalı preparatta mikroorganizma görüldü.

4.1 Akım sitometri (UF-5000) ile Bakteri Sayım Sonuçları

Akım sitometri yöntemini BOS, periton ve plevra gibi çeşitli SVS'lerde UF-5000 kullanarak bakterilerin hızlı tespiti için bir tarama yöntemi olarak değerlendirdik. Katı besiyerinde ya da zenginleştirme buyyonundaki üreme ve doğrudan gram boyama ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırdık. Örneklerin akım sitometrik yöntemle elde edilen bakteri yoğunlukları ile kültür sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür. Pozitif bir kültüre sahip numuneler, negatif olanlara göre istatistiksel olarak daha yüksek bakteri sayımları gösterdi ($z= -7,433$, $p<0,05$). Aynı anlamlı farklılık UF-5000 bakteri sayımları ile gram boyalı preparatta bakteri görülen örneklerde de saptanmıştır ($z= -6,209$, $p<0,05$).

4.2. Akım sitometri (UF-5000) ile Lökosit Sayım Sonuçları

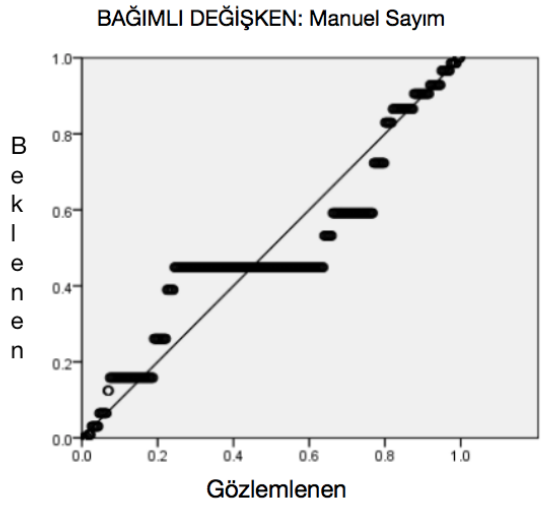
Çalışmamıza dahil ettiğimiz 320 hastanın 498 BOS örneklerinin 235'i (%47,1) LP yapılarak, 263'ü (%52,9) hastaların mevcut şant kateterlerinden alınmıştır. Lökosit sayımı için otomatize sistem ile manuel yöntemin kategorik

uyumlarının karşılaştırılması Tablo 6'da gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre sayımların %59,6'sı birbiriyle uyumlu, %0,8 major hatalı saptanmıştır.

Tablo 6: BOS örneklerinin lökosit sayımında manuel yöntem ile akım sitometrik yöntemin (UF5000) kategorik uyumlarının karşılaştırılması.

		Sysmex UF5000					
	Kategori	1	2	3	4	5	Toplam
Manuel Mikroskobi	1	197	58	10	3	4	272
	2	28	54	17	11	5	115
	3	0	15	15	10	3	43
	4	1	0	12	10	11	34
	5	0	1	3	9	21	34
	Toplam	226	128	57	43	44	498

BOS örnekleri için Spearman korelasyonu 0.717 olarak bulunmuştur. Bu değer yüksek düzeyde uyumu temsil etmektedir. Korelasyon katsayısının pozitif olması manuel mikroskobi ile otomatize sistem arasındaki ilişkinin aynı yönlü olduğunu gösterir. Lineer regresyon grafiğinden de görüldüğü üzere değişkenler arasındaki ilişki pozitif yönlü ve doğrusaldır (Şekil 6). Regresyon denklemine (y = 0.564 + 0.708x) göre otomatize sayım ile manuel sayım arasındaki fark bir birimde 0.708'dir. Testin anlamlılık değeri (p) <0,05 olduğundan fark rastlantısal değildir. Determinasyon katsayısı R^2=0.565 bulunmuştur



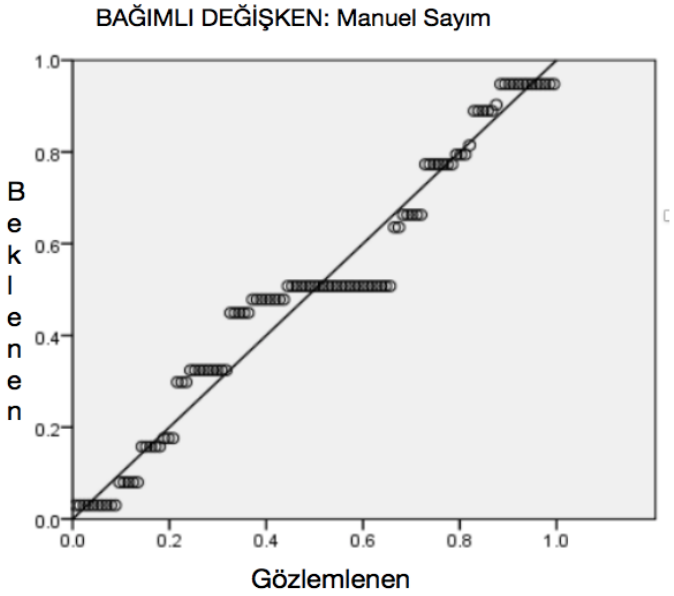
Şekil 7: BOS örneklerinin lineer regresyon grafiği.

Hastanemiz kliniklerinden malignite, çeşitli kronik hastalıklar ya da pnömoni sonrası plevral efüzyon gelişen hastalardan 109 plevra sıvısı örneği gönderilmiştir. Hasta kayıtları incelendiğinde örneklerden 57'sinin (%52,2) torasentezle, 52'sinin (%47,8) drenaj sistemleriyle alındığı bilgisine ulaşılmıştır. Bu örneklerin manuel lökosit sayımları ve eş zamanlı UF5000 sayımları yapılmıştır. Her iki yöntemin kategorik uyumlarının karşılaştırılması Tablo 7'de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre sayımların %45,8'i birbiriyle uyumlu, %9,2 major hatalı saptanmıştır.

Tablo 7: Plevra örneklerinin lökosit sayımında manuel yöntem ile akım sitometrik yöntemin (UF5000) kategorik uyumlarının karşılaştırılması.

		Sysmex_UF5000					
	Kategori	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	Toplam
Manuel Mikroskobi	**1**	24	9	3	5	10	51
	2	1	5	8	3	5	22
	3	0	1	3	2	5	11
	4	0	0	0	5	7	12
	5	0	0	0	0	13	13
	Toplam	25	15	14	15	40	109

Plevra örnekleri için Spearman korelasyonu 0.604 olarak bulunmuştur. Bu değer orta düzeyde ilişkiyi temsil etmektedir. Korelasyon katsayısının pozitif olması manuel mikroskobi ile otomatize sistem arasındaki ilişkinin aynı yönlü olduğunu gösterir. Lineer regresyon grafiğinden de görüldüğü üzere değişkenler arasındaki ilişki pozitif yönlü ve doğrusaldır (Şekil 7). Regresyon denklemine ($y = 0.436 + 0.542x$) göre otomatize sayım ile manuel sayım arasındaki fark bir birimde 0.542'dir. Testin anlamlılık değeri (p) $<0,05$ olduğundan fark rastlantısal değildir. Determinasyon katsayısı $R^2=0.372$ bulunmuştur.



Şekil 8: Plevra örneklerinin lineer regresyon grafiği.

Plevra sıvı enflamasyonunun diyagnostik sınır değeri göz önüne alınarak (1000 × 10^6 / L) tanısal doğruluğunu belirlemek amacıyla duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri hesaplanmıştır (Tablo 8).

Tablo 8: Akım sitometrik yöntem (UF5000)'in plevra örneklerinde lökosit sayım performansı

		DİREKT MİKROSKOBİ (Lökosit/ µL)		
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	TOPLAM n (%)
SYSMEX UF5000 (Lökosit/ µL)	Negatif	54 (64,2)	0 (0)	54 (49,5)
	Pozitif	30 (35,8)	25 (100)	55 (50,5)
	TOPLAM	84 (77,1)	25 (22,9)	109

Duyarlılık: %100, **Özgüllük:** %64,2, **Pozitif Prediktif Değer:** %45,4, **Negatif Prediktif Değer:** %100

Çalışmamıza dahil edilen 109 periton sıvısı örneği; malignite, çeşitli sirotik hastalıklar ya da böbrek yetmezliğine bağlı asit gelişen hastalardan kültür için laboratuvarımıza gönderilmiş numunelerdir. Bu örneklerden 30 tanesi (%27,5) periton diyalizi ilişkili peritonit düşünülen hastalardan diyaliz sıvısı olarak gelmiş ve ona göre işleme alınmıştır. Numunelerin manuel WBC sayımları ve eş zamanlı UF5000 sayımları yapılmıştır. Her iki yöntemin kategorik uyumlarının karşılaştırılması Tablo 9'da gösterilmiştir. Bu karşılaştırmaya göre sayımların %50,4'ü birbiriyle uyumlu saptanmış olup majör hata saptanmamıştır.

Tablo 9: Periton örneklerinin lökosit sayımında manuel yöntem ile akım sitometrik yöntem (UF5000) kategorik uyumlarının karşılaştırılması.

		Sysmex UF5000					
	Kategori	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	Toplam
Manuel Mikroskobi	**1**	31	11	4	9	0	55
	2	1	8	7	4	0	20
	3	1	3	4	4	3	15
	4	0	1	1	9	5	16
	5	0	0	0	0	3	3
	Toplam	33	23	16	26	11	109

Enfektif peritonitte lökosit sayısı 500 / µL üzeri olduğunda, periton diyalizine bağlı peritonitte ise 100 / µL üzeri olduğunda tanıyı destekler niteliktedir. Bu nedenle duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri ayrı ayrı hesaplanmştır (Tablo 10 ve Tablo 11).

Periton sıvısı örnekleri için Spearman korelasyonu 0.659 olarak bulunmuştur. Bu değer orta düzeyde ilişkiyi temsil etmektedir. Korelasyon katsayısının pozitif olması manuel mikroskobi ile otomatize sistem arasındaki ilişkinin aynı yönlü olduğunu gösterir. Lineer regresyon grafiğinden de görüldüğü üzere değişkenler arasındaki ilişki pozitif yönlü ve doğrusaldır (Şekil 8). Regresyon denklemine (y = 0.465 + 0.589x) göre otomatize sayım ile manuel sayım arasındaki fark bir birimde 0.589'dur. Testin anlamlılık

değeri (p) <0,05 olduğundan fark tesadüfi değildir. Determinasyon katsayısı R^2=0.451 bulunmuştur.

Tablo 10: Akım sitometrik yöntem (UF5000)'in asit sıvısı örneklerinde lökosit sayım performansı.

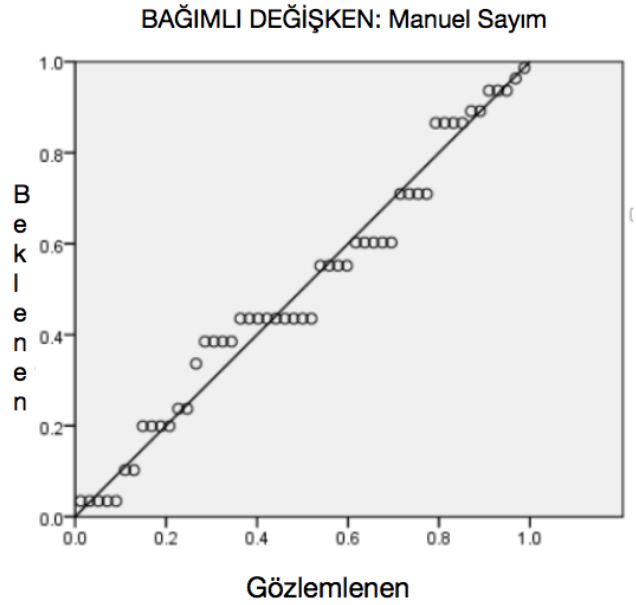
		DİREKT MİKROSKOBİ (Lökosit/ µL)		
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	TOPLAM n (%)
SYSMEX UF5000 (Lökosit/ µL)	Negatif	48 (77,5)	1(5,9)	49 (62)
	Pozitif	14 (22,5)	16 (94,1)	30 (38)
	TOPLAM	62 (78,5)	17 (21,5)	79

Duyarlılık: %94,1 **Özgüllük:** %77,4 **Pozitif Prediktif Değe**r: %53,3 **Negatif Prediktif Değer:** %97,9

Tablo 11: Akım sitometrik yöntem (UF5000)'in diyaliz sıvısı örneklerinde lökosit sayım performansı.

		DİREKT MİKROSKOBİ (Lökosit/ µL)		
		Negatif n (%)	Pozitif n (%)	TOPLAM n (%)
SYSMEX UF5000 (Lökosit/ µL)	Negatif	13 (81,2)	0 (0)	13 (43,3)
	Pozitif	3 (18,8)	14 (100)	17 (56,7)
	TOPLAM	16 (53,3)	14 (46,7)	30

Duyarlılık: %100 **Özgüllük:** %81,2 **Pozitif Prediktif Değer:** %82,3 **Negatif Prediktif Değer:** %100



Şekil 9: Periton örneklerinin lineer regresyon grafiği.

Sonuç olarak UF5000'nin steril vücut sıvılarının lökosit sayımında manuel yöntemle uyumu şu şekildedir (Tablo 12):

- BOS için yüksek derecede uyum
- Plevra için orta derecede uyum
- Periton için orta derecede uyum

Tablo 12: Manuel yöntem ile akım sitometri yönteminin istatistiksel analiz sonuçları.

Örnek Tipi	n	Parametre	SK	RD	R^2	Anlamlılık
BOS	498	WBC	0,717	y= 0.564 + 0,708x	0,565	p<0,05
Plevra	109	WBC	0,604	y= 0.436 + 0.542x	0,372	p<0,05
Periton	109	WBC	0,659	y= 0.465 + 0.589x	0,451	p<0,05

n=Dahil edilen örnek sayısı, SK=Spearman Korelasyon değeri, RD=Regresyon denklemi, R^2=Determinasyon katsayısı

4.3. MALDI-TOF MS Sonuçları

Çalışmamıza dahil edilen 716 steril vücut sıvısı (SVS) örneğinin 110'unda kültürde üreyen mikroorganizmanın; türüne, bu mikroorganizmaya yönelik antibiyotik tedavisi alıp almadığına ve klinisyen görüşüne göre kesin enfeksiyon etkeni olup olmadığına karar verildi. Kesin etken olarak düşünülen üremeli örnekler kısa süre inkübasyonlu doğrudan tanımlama prosedürüne tabi tutuldu. Kültür pozitif örneklerin 97'si (%88,1) monomikrobiyal üreme, 13'ü (%11,9) polimikrobiyal üreme (=2 mikroorganizma) gösterdi. Bu üremeli kültürlerin örnek dağılımı Tablo 13' de gösterilmiştir.

Tablo 13: Üremeli örneklerin SVS türüne göre ve mikroorganizma sayısına göre dağılımı.

	Monomikrobiyal n	Polimikrobiyal n	Toplam n (%)
BOS	36	2	38 (34,6)
Plevra sıvısı	24	5	29 (26,4)
Periton sıvısı	37	6	43 (39)
Toplam	97	13	110 (100)

Monomikrobiyal üreme gösteren SVS örneklerinin 29'u (duyarlılık %29,8) doğru, 2 (%1) örnek ise yanlış tanımlanmıştır. Bu örneklerden 66'sı (%68,2) tanımlanamamıştır. Polimikrobiyal örneklerden 6'sında (%46,1) üreyen mikroorganizmalardan biri doğru tanımlanmış, yanlış tanımlanan ya da iki patojenin birden tanımlandığı örnek olmamıştır. Çalışılan SVS örneklerinde üreyen gram negatif basillerin 11'i (%28,9) doğru tanımlanırken 2'si (%5) yanlış tanımlanmıştır. Gram pozitif mikroorganizmalarda ise 18'i (%30,5) doğru tanımlanmakla birlikte yanlış tanımlanan patojen olmamıştır (Tablo 14).

Tablo 14: SVS'lerin patojen sayısı ve gram boyanma özelliklerine göre MALDI-TOF MS ile tanımlanma oranları.

	Direkt MALDI-TOF MS ile Tanımlanan Patojen Sayısı n (%)
Monomikrobiyal (n=97)	29 (29,8)
Gram - mikroorganizma (n=38)	11 (28,9)
Gram + mikroorganizma (n=59)	18 (30,5)
Polmikrobiyal (n=13)	6 (46,1)
Toplam (n=110)	35 (31,8)

BOS örneklerinde MALDI-TOF-MS, cins ve tür düzeyinde gram negatif basillerin 2 / 6'sını (duyarlılık %33,3) doğru şekilde tanımladı (*Enterobacter aerogenes* ve *K. pneumoniae*). Kültüründe *Prevotella denticola* üreyen hastanın örneği her ne kadar anaerop koşullarda inkübe edilmiş olsa da tanımlanamamıştır.

Otuz gram pozitif mikroorganizmadan 8'i (duyarlılık %26,6) doğru şekilde tanımlanmıştır. Toplum kökenli menenjiti olan iki hastadan birinde *S. pneumoniae,* MALDI-TOF-MS ile doğru bir şekilde tanımlanmıştır. Diğer numune ise katı besiyerinde üremeyip sadece sıvı besiyerinde üremiştir. Bu da başlangıç mikroorganizma yükünün düşük olduğunu veya antibiyotik baskısı altında olduğunu göstermektedir. Bir numunede *Listeria monocytogenes*'i ve V-P şant enfeksiyonu düşünülen, kültürde polimikrobiyal üremesi olan iki hastada mikroorganizmalardan hiçbirini tanımlanamadı (Tablo 15).

Tablo 15: BOS örneklerinin direkt mikroskobi, kültür ve MALDI-TOF MS sonuçları.

Örnek No (BOS)	**Mikroskobi (Lökosit)**		**Mikroskobi Bakteri**	**Kültür Sonucu**	**MALDI-TOF MS Sonucu**
	PMNL	**Diğer**			
1	Nadir	-	-	*Enterobacter cloacae* complex	X
2	-	OY lenfosit	gram (+) kok	*Enterococcus faecalis*	X
3	OY	-	gram (-) basil	*Enterobacter aerogenes*	*Enterobacter aerogenes*
4	Nadir	OY lenfosit	-	*Enterococcus gallinarum*	X
5	OY	-	gram (-) basil	*Klebsiella pneumoniae*	X
6	Yoğun	-	gram (-) basil	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*
7	OY	OY lenfosit	-	*Listeria monocytogenes*	X
8	OY	-	-	*Staphylococcus haemolyticus*	X
9	OY	-	gram (+) kok	*Staphylococcus haemolyticus*	X
10	-	-	gram (+) kok	*Staphylococcus epidermidis*	*Staphylococcus epidermidis*
11	OY	OY MNL	-	*Staphylococcus epidermidis*	X
12	OY	-	gram (+) kok	*Staphylococcus epidermidis*	*Staphylococcus epidermidis*
13	OY	OY MNL	-	*Staphylococcus epidermidis*	X
14	-	-	-	*Staphylococcus epidermidis*	X
15	OY	-	-	*Staphylococcus epidermidis*	X
16	Nadir	-	-	*Staphylococcus epidermidis*	*Staphylococcus epidermidis*
17	Nadir	-	gram değişken kok	*Staphylococcus epidermidis*	X

Örnek No (BOS)	Mikroskobi (Lökosit)		Mikroskobi Bakteri	Kültür Sonucu	MALDI-TOF MS Sonucu
	PMNL	Diğer			
18	Nadir	-	gram (+) kok	*Staphylococcus epidermidis*	X
19	OY	OY lenfosit	-	*Staphylococcus epidermidis*	X
20	OY	OY MNL	-	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus*
21	Nadir	-	-	*Staphylococcus aureus*	X
22	OY	-	gram (+) kok	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus*
23	OY	-	gram (+) zincir kok	*Staphylococcus aureus, Streptococcus dysagalactiae*	X
24	OY	OY lenfosit	gram (-) basil	*Pseudomonas aeruginosa*	X
25	OY	-	gram (-) basil	*Prevotella denticola*	X
26	OY	-	gram (+) kok	*Streptococcus pneumoniae*	*Streptococcus pneumoniae*
27	OY	-	-	*Staphylococcus epidermidis*	X
28	-	-	gram değişken kok	*Streptococcus mitis/oralis*	*Streptococcus mitis/oralis*
29	-	-	-	*Enterococcus faecium**	*Enterococcus faecium*
30	OY	-	-	*Staphylococcus epidermidis**	X
31	OY	OY lenfosit	-	*Staphylococcus epidermidis**	X
32	OY	OY MNL	-	*Staphylococcus aureus**	X
33	Nadir	-	-	*Staphylococcus epidermidis**	X
34	Nadir	-	-	*Staphylococcus epidermidis**	X
35	Yoğun	Nadir lenfosit	-	*Staphylococcus epidermidis**	X
36	-	-	-	*Streptococcus parasanguinis**	X
37	-	-	-	*Streptococcus pneumoniae**	X

Örnek No (BOS)	Mikroskobi (Lökosit)		Mikroskobi Bakteri	Kültür Sonucu	MALDI-TOF MS Sonucu
	PMNL	Diğer			
38	Nadir	-	-	*C. krusei ve Enterococcus faecium**	X

Nadir: <1 lökosit, Az: 1-5 lökosit, OY (Orta yoğun): 6-10 lökosit, Yoğun: >10 lökosit, *Katı besiyerinde üremeyip sıvı besiyerinde üreyenler, X: Tanımlanamadı

MALDI-TOF-MS periton örneklerinde, gram negatif basillerin 6 / 20 'sını (duyarlılık %30) cins ve tür düzeyinde doğru şekilde tanımladı. Bir hastada *A. baumanii*, *Candida krusei* olarak yanlış tanımlandı. Diğer *Acinetobacter* üremesi olan periton örnekleri ise tanımlanamadı. Periton diyalizi ilişkili peritonit düşünülen bir hastanın örneğinde kültürde üretilen *Stenotrophomonas maltophilia* tanımlanamamıştır. 17 gram pozitif mikroorganizmadan 7'si (duyarlılık %41,1) doğru şekilde tanımlanmıştır. *S. aureus ve Enterococcus* spp 3 / 5 oranlarıyla periton sıvısı örnekleri için en çok doğru tanımlanan gram pozitif mikroorganizmalardır. Polimikrobiyal üremesi olan 6 örneğin 5'inde (%83,3) iki patojenden biri tanımlanmıştır (Tablo 16).

Tablo 16: Periton örneklerinin direkt mikroskobi, kültür ve MALDI-TOF MS sonuçları.

Örnek No (Periton)	Mikroskobi (Lökosit)		Mikroskobi Bakteri	Kültür Sonucu	MALDI-TOF MS Sonucu
	PMNL	Diğer			
1	Nadir	-	gram (-) diplokok	*Acinetobacter baumanii*	X
2	Nadir	-	gram (+) kok	*Acinetobacter baumanii*	*C.krusei*
3	Nadir	-	gram (-) basil	*Acinetobacter lwoffii*	X
4	OY	-	-	*Bacteroides fragilis*	X
5	OY	-	gram (+) basil	*Corynebacterium striatum, Escherichia coli*	*Escherichia coli*
6	OY	-	gram (+) kok	*Enterococcus avium, Escherichia coli*	*Enterococcus avium*

Örnek No (Periton)	Mikroskobi (Lökosit)		Mikroskobi Bakteri	Kültür Sonucu	MALDI-TOF MS Sonucu
	PMNL	Diğer			
7	-	-	gram (-) basil	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
8	Nadir	-	-	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
9	OY	-	-	*Escherichia coli*	X
10	OY	-	-	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
11	Nadir	-	-	*Escherichia coli*	X
12	Nadir	-	gram (-) basil	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
13	Yoğun	-	gram (-) basil	*Escherichia coli*	X
14	Nadir	-	-	*Escherichia coli*	X
15	OY	-	gram (-) basil	*Escherichia coli, Clostridium sporogenes*	*Escherichia coli*
16	Yoğun	-	gram (+) kok, gram (-) basil	*Escherichia coli, Enterococcus faecalis*	X
17	OY	-	gram (-) basil, gram (+) kok	*Enterococcus faecalis*	*Enterococcus faecalis*
18	OY	-	gram (+) kok	*Enterococcus faecalis*	*Enterococcus faecalis*
19	OY	OY MNL	gram (+) kok, gram (-) basil	*Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus*	*Enterococcus faecalis*
20	Nadir	-	gram (+) zincir kok	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus faecium*
21	Yoğun	OY MNL	-	*Enterococcus faecium*	X
22	OY	-	-	*Klebsiella pneumoniae*	X
23	Nadir	-	gram (-) basil	*Klebsiella pneumoniae*	X
24	OY	-	gram (-) basil	*Klebsiella pneumoniae*	*Klebsiella pneumoniae*
25	OY	-	gram (+) kok	*Staphylococcus haemolyticus*	X
26	Nadir	-	-	*Staphylococcus haemolyticus*	*S.haemolyticus*
27	-	-	-	*Staphylococcus warneri*	X
28	Yoğun	-	-	*Staphylococcus aureus*	X
29	OY	OY MNL	-	*Staphylococcus aureus*	*S. aureus*
30	Yoğun	-	gram (+) kok	*Staphylococcus aureus*	X
31	-	-	-	*Staphylococcus aureus*	*S. aureus*

Örnek No (Periton)	Mikroskobi (Lökosit)		Mikroskobi Bakteri	Kültür Sonucu	MALDI-TOF MS Sonucu
	PMNL	Diğer			
32	OY	-	gram (+) kok	*Staphylococcus aureus*	*S. aureus*
33	OY	-	gram (-) basil	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*
34	OY	-	-	*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*	*E. coli*
35	OY	-	-	*Pseudomonas putida*	X
36	OY	-	-	*Pseudomonas aeruginosa*	X
37	Yoğun	-	-	*Stenotrophomonas maltophilia*	X
38	Nadir	-	-	*Sphingomonas melonis*	X
39	Nadir	-	-	*Streptococcus anginosus*	X
40	-	-	-	*Enterococcus faecalis**	X
41	OY	OY lenfosit	-	*Staphylococcus epidermidis **	X
42	Az	-	-	*Streptococcus salivarius**	X
43	Nadir	-	-	*Staphylococcus epidermidis **	X

Nadir: <1 lökosit, Az: 1-5 lökosit, OY (Orta yoğun): 6-10 lökosit, Yoğun: >10 lökosit, *Katı besiyerinde üremeyip sıvı besiyerinde üreyenler, X: Tanımlanamadı

Plevra örneklerinin MALDI-TOF-MS, gram negatif basillerin 3 / 12 'ü (duyarlılık %25) cins ve tür düzeyinde doğru şekilde tanımlamıştır (*E. coli, E. cloacae* complex*, A. baumanii*). Bir hastada *A. baumanii*, *Citrobacter koseri* olarak yanlış tanımlanmıştır. Kültüründe *Enterobacter hormachei* üreyen bir plevra örneği *E. cloacae* complex olarak tanımlanmış olup *E. hormachei*'nin kompleks üyesi olmasından dolayı bu tanımlama doğru kabul edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu üç plevrit vakasında hiçbiri tanımlanamamıştır. 12 gram pozitif mikroorganizmadan 3'ü (duyarlılık %25) doğru şekilde tanımlanmıştır. Polimikrobiyal üremesi olanların sadece 1 / 5'inde iki patojenden biri tanımlanmıştır (Tablo 17).

Tablo 17: Plevra örneklerinin direkt mikroskobi, kültür ve MALDI-TOF MS sonuçları.

Örnek No (Plevra)	**Mikroskobi (Lökosit)**		**Mikroskobi Bakteri**	**Kültür Sonucu**	**MALDI-TOF MS Sonucu**
	PMNL	**Diğer**			
1	Nadir	-	gram (-) diplokok	*Acinetobacter baumanii*	*Acinetobacter baumanii*
2	OY	-	gram (-) kokobasil	*Acinetobacter baumanii*	*Citrobacter koseri*
3	-	OY lenfosit	gram (-) basil	*Acinetobacter baumanii, Enterococcus faecium*	X
4	Yoğun	-	-	*C. Striatum*	X
5	OY	-	gram (+) basil	*Acinetobacter baumanii, C. striatum*	X
6	OY	OY MNL	gram (+) basil	*Enterobacter cloacae complex*	X
7	Yoğun	-	gram (-) basil	*Escherichia coli*	X
8	YOK	-	-	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
9	OY	-	gram (-) basil	*Escherichia coli*	X
10	Nadir	-	-	*Escherichia coli*	X
11	Nadir	-	gram (+) zincir kok	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus faecium*
12	Nadir	-	-	*Enterococcus faecium*	X
13	OY	-	gram (+) zincir kok	*Enterococcus faecium, KNS*	*Enterococcus faecium*
14	OY	-	-	*Enterobacter hormachei*	*Enterobacter cloacae complex*
15	Nadir	-	gram (-) basil	*Enterobacter cloacae complex, Pseudomonas aeruginosa*	X
16	Yoğun	-	-	*S. haemolyticus*	X
17	OY	-	gram (+) kok	*S. haemolyticus*	X
18	OY	-	gram (+) kok	*Staphylococcus aureus, Escherichia coli*	X
19	OY	-	-	*Staphylococcus epidermidis*	*Staphylococcus epidermidis*
20	-	Nadir lenfosit	-	*Staphylococcus epidermidis*	X
21	OY	-	-	*Staphylococcus hominis*	X

Örnek No (Plevra)	Mikroskobi (Lökosit)		Mikroskobi Bakteri	Kültür Sonucu	MALDI-TOF MS Sonucu
	PMNL	Diğer			
22	Yoğun	-	gram (+) kok	*Staphylococcus aureus*	X
23	OY	-	gram (+) kok	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus*
24	Yoğun	-	gram (+) kok	*Staphylococcus aureus*	X
25	Yoğun	-	gram (-) basil	*Pseudomonas aeruginosa*	X
26	Az	-	gram (-) basil	*Pseudomonas aeruginosa*	X
27	OY	-	-	*Pseudomonas aeruginosa*	X
28	OY	-	-	*Parvimonas micra*	X
29	OY	-	gram (-) basil	*Prevotella oralis*	X

Nadir: <1 lökosit, Az: 1-5 lökosit, OY (Orta yoğun): 6-10 lökosit, Yoğun: >10 lökosit, X: Tanımlanamadı, KNS: Koagülaz negatif *Staphylococcus*

Tüm SVS örneklerinde kültürde üreyen gram negatif mikroorganizmaların (n=38) ve gram pozitif mikroorganizmaların (n=59) tür dağılımı ve MALDI-TOF MS ile doğru tanımlanma sayıları sırasıyla tablo 18 ve 19'da gösterilmiştir.

Tablo 18: Kültürde gram negatif basil üreyen SVS örneklerinin tür dağılımı ve MALDI-TOF MS ile doğru tanımlanma sayıları

	Doğru Tanımlanan izolat sayısı
Gram negatif basiller (n=38)	**11 (%28,9)**
Escherichia coli (n=12)	5
Klebsiella pneumoniae (n=5)	2
Enterobacter cloacae complex (n=2)	0
Enterobacter aerogenes (n=1)	1
Enterobacter hormachei (n=1)	1
Sphingomonas melonis (n=1)	0
Pseudomonas aeruginosa (n=6)	1

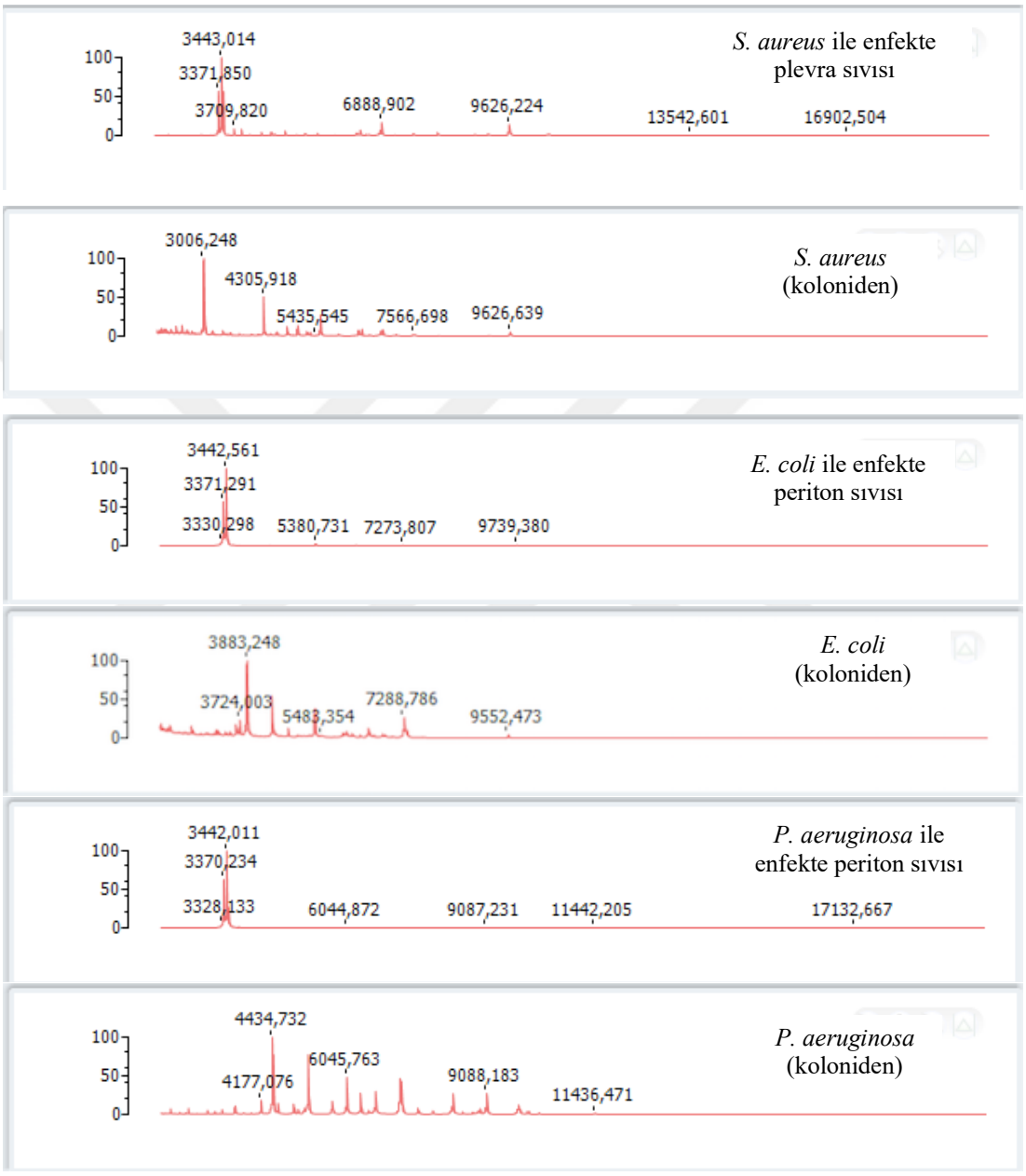
	Doğru Tanımlanan izolat sayısı
Pseudomonas putida (n=1)	0
Acinetobacter baumanii (n=4)	1
Acinetobacter lwoffii (n=1)	0
Stenotrophomonas maltophilia (n=1)	0
Anaerop bakteriler (n=3)	0

Tablo 19: Kültürde gram pozitif mikroorganizma üreyen SVS örneklerinin tür dağılımı ve MALDI-TOF MS ile doğru tanımlanma sayıları

	Doğru Tanımlanan izolat sayısı
Gram pozitif bakteriler (n=59)	**18 (%30,5)**
Staphylococcus aureus (n=12)	6
Staphylococcus epidermidis (n=20)	2
Staphylococcus haemolyticus (n=6)	1
Staphylococcus hominis (n=1)	0
Staphylococcus warneri (n=1)	0
Enterococcus faecalis (n=4)	2
Enterococcus faecium (n=5)	3
Enterococcus gallinarum (n=1)	0
Gram pozitif basiller (n=2)	0
Streptococcus pneumoniae (n=2)	1
Alfa hemolitik streptokoklar (n=4	1
Anaerop bakteriler (n=1)	0

Aynı bakteri türlerine bakıldığında, enfekte SVS örneklerinin inoküle edildiği sıvı besiyerinden elde edilen spektrumların, katı besiyerinden izole edilmiş bakteri kolonilerinden elde edilenlerden büyük ölçüde farklı olduğu görülmüştür (Şekil 10).

Bakteriyel ortam açısından eşitsizlik bu gözlemi ve standart VITEK MS veri tabanı tek koloni analizlerinden üretildiği için tanımlanma oranlarının düşüklüğünü kısmen açıklamaktadır.



Şekil 10: SVS örneklerinin sıvı besiyerinden elde edilen spektrumları ile katı besiyerinden izole edilmiş bakteri kolonilerinden elde edilen spektrumlarının karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Manuel mikroskobi incelemesi steril vücut sıvılarında hücrelerin sayılması için altın standarttır. Bununla birlikte çeşitli metodolojik hatalar yöntemin doğruluğunu ve hassasiyetini engeller. Bunlar arasında sayma kamarası doldurma hataları, pipetleme hataları, olası seyreltme hataları, örnek taşması ve mikroskop kontaminasyonu, lamın sürekli kullanımına bağlı kısıtlamalar (cam aşınmasına bağlı artefaktların varlığı, yıkama ve kurutmak için zaman kaybı) sayılabilir. Ayrıca doğru hücre sayım sonuçları için eğitimli personel ihtiyacı vardır.

Akım sitometri ile vücut sıvısı mikroskopisinin otomasyonu, daha hızlı sonuç, artan üretkenlik ve maliyet azaltma, daha az emek ve daha düşük bir uzmanlık seviyesi, daha iyi tekrarlanabilirlik gibi bir dizi avantaj sağlayabilir.

Tüm vücut sıvıları arasında BOS hücre sayımının otomatize yapılması, diğer vücut sıvıları için kullanılan diyagnostik sınır değerlerinden çok daha düşük olan 'normal aralıktaki' sayılara kadar sayılmasını gerektirdiği için en zordur (18). Buoro ve arkadaşlarının yaptığı UF1000i-BF (Co., Kobe Japonya) ve manuel mikroskopi arasındaki karşılaştırmada, WBC sayımı için iyi bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. UF1000i-BF'nin, WBC sayısı <30 × 10^6 / L olan örneklerde gözlenen hafif pozitif yanlılığına rağmen, anormal WBC sayılarını doğru bir şekilde kategorize edebilmiştir. WBC sayıları tanısal doğrulukta da mükemmel saptanmış olup 4,5 × 10^6 / L eşik değerinde, UF1000i-BF'nin normal ve patolojik WBC sayılarını (> 5 × 10^6 / L) ayırt etmek için oldukça duyarlı (%100) ve spesifik (%97,4) olduğu kanıtlanmıştır (45). Literatürdeki çalışmalar, BOS örneklerinde hücre sayımlarının gerçekleştirilmesi için UF1000i-BF kullanımının güvenilir bir strateji olabileceğini düşündürmektedir (2, 45, 46). Ancak, UF1000i-BF'nin WBC diferansiyel sayımını sağlayamaması dezavantajı olmuştur (43).

Bir başka nokta da otomatik analizörlerin manuel sayıma kıyasla daha fazla numune hacmi aspire etmesidir. Bu, bir yandan hassasiyeti ve doğruluğu

artırmak için daha fazla hücrenin sayılmasıyla avantaj iken diğer yandan çoğunlukla düşük hacimlerde alınabilen steril vücut sıvıları açısından dezavantaj haline gelmektedir. Bu noktalar UF-5000 vücut sıvısı modu ile aşılmaya çalışılmıştır.

Seghezzi ve arkadaşları lökositler için, UF-5000 vücut sıvısı modunun bir numunedeki kantitatif olarak belirlenebilen en düşük konsantrasyon değerini (LoQ) daha önce tarif edilen analizörlere (yani Sysmex UF1000i-BF, XE-5000-BF ve XN-BF) benzer (1.9 × 10^6 hücre / L) bulmuş ve tanısal performansı, düşük hücre sayımlarında (20 × 10^6 hücre / L'nin altında) bile çok iyi bulmuşlardır (4). Çalışmamızda hücre farklılaşması değerlendirilmemiştir.

BOS'un kabul edilen referans aralıkları son derece düşüktür. Yayınlanan referans aralıkları manuel yöntemlerle oluşturulmuştur ve referans aralığı çalışmalarının nasıl yapıldığına dair zayıf belgelere rağmen yaygın olarak kabul edilmektedir. Otomatik analizörlerle yapılan çeşitli korelasyon çalışmaları BOS örneklerinde, WBC sayıları düşük olduğunda pozitif bir sapma göstermiştir. Bu yanlılığın nedeni hücresel olmayan partiküllerden (kristaller, bakteriler, yağ kürecikleri ve maya) kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, bazı araştırmacılar, düşük hücre sayısına sahip numunelerin otomatik analizden hariç tutulmasını tavsiye etmişlerdir (47). Diğerleri ise otomatik yöntemler için yeni referans aralıklarının belirlenmesi gerekebileceğini öne sürmüşlerdir (48). Jonge ve arkadaşlarının Sysmex XE-5000 BF kullanarak yaptığı bir çalışmada ortopedik, jinekolojik, cerrahi ve ürolojik ameliyat öncesi spinal anestezi uygulanan erişkin hastalarda (nörolojik öyküsü bulunmayan) normal BOS (n = 87) referans aralığının <7 × 10^6 WBC / L olduğu bildirilmiştir (49). Hematolojik maligniteli, serebral kanama ve enfeksiyon şüphesi olan hastaların (çocuk ve erişkin) dahil edildiği bir başka çalışmada 20 - 30 × 10^6 WBC / L (n = 200) arasında değerler bulunmuştur (50). Çalışmamızda BOS örneklerinde WBC sayıları için Sysmex UF5000-BF ile manuel mikroskobi kategorik uyumunun çok iyi olmasına karşın duyarlılık düşük (yetişkin ve çocuk hastalarda sırasıyla %56, %67) saptanmıştır. Bu durumun literatürdeki referans değer çalışmaları göz

önüne alındığında dahil edilen hastalardaki heterojeniteden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Nitekim çocuk hastalarda duyarlılığın daha yüksek saptanması bunu destekler niteliktedir.

UF5000 ile yapılan bir çalışmada otomatik analizöre özgü sınır değer (yani, WBC ve TNC için sırasıyla 6 ve 7 × hücre / L) uygulandığında, özgüllüklerin sırasıyla 0.87 ve 0.82'den 0.96 ve 0.93'e yükseldiği görülmüştür (4).

Sonuç olarak otomatik BOS WBC sayımlarının yorumlanması için homojen gruplarda belirlenmiş referans değerlere ihtiyaç duyulmakla birlikte, manuel yöntemle çok iyi uyum göstermiş olması merkezi sinir sistemi enfeksiyonu şüphesi olan hastaların takip ve tedavisi için hızlı sonuç sağlayarak yararlı olacağını düşündürmektedir. Hemorajik BOS örneklerinde sayım öncesi lökosit miyarı ile ön işlem gerektiğinden, lökosit miktarı yüksek örneklerde dilüsyon gerektirdiğinden analizörün zaman avantajı bu tarz örneklerde daha da ön planda çıkmaktadır.

Plevral sıvı ve asit sıvısının otomatik analizörle hücre sayımı birçok açıdan zorlayıcıdır. Bunlardan birincisi kanda bulunandan çok daha düşük konsantrasyonlarda WBC sayımları için doğruluk beklenmektedir. İkincisi ise vücut sıvılarında normal ve “aktif” veya dejenere olmuş mezotel hücreleri, makrofajlar, katı tümörlerden gelen neoplastik hücreler, lenfomalar ve lösemiler gibi daha geniş bir hücre yelpazesine rastlanılmasıdır. Diğer bir zorluk, bu sıvılar bazı durumlarda pıhtı içerebilir veya çok viskoz olabilir.

Akım sitometrik yöntem temelli analizörlerde, seröz sıvılarla yapılan çalışmalarda WBC sayılarını manuel mikroskobiye kıyasla yüksek (3×10^6 / L’ye karşın 2184×10^6 / L) ölçtüğü belirlenmiştir. Pozitif yanlılığın kullanılan teknolojiye bağlı olarak, bakteri ve maya kümelenmelerinin WBC’ye eş değer sinyal üretebildiğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (51-53). Plevral sıvı örneklerindeki ölçümlerimizde 10 örnekte bu tarz bir yükseklik (majör hata) saptandı. UF-5000’in plevral sıvı örneklerinde oldukça duyarlı (%100) olduğu görülmüştür. Yüksek duyarlılık negatif sonuca sahip hastaların gereksiz yere antibiyotik almasını ve olası direnç gelişimini engelleyecektir. UF-5000’in seröz sıvılardaki performansına ilişkin yapılan bir çalışmada TNC LoQ

değerinin 24 × 10^6 / L olarak bulunması seröz sıvılarda tarama amaçlı kullanılabileceğini göstermiştir (54). G. E. Bignardi'nin vücut sıvılarında flow sitometrik yöntemle lökosit sayım performansını değerlendirdiği derlemesinde 14 farklı analizör ile yapılan çalışmalar dahil edilmiş olup otomatize sistem ile referans yöntem arasında iyi uyum olduğu şeklinde genel bir sonuca ulaşmıştır (18). Bizim çalışmamızda plevral sıvılarda UF5000 kullanılarak yapılan analizde lökosit sayımının manuel yöntemle orta derecede uyumlu olduğu görülmüştür. Bu sonuç Sysmex XN-350 ile yapılan analizle uyumludur (54).

Periton sıvısı lökosit sayımı için idrar analizörlerini kullanma fikri on altı yıl öncesine dayanmaktadır. Penders ve arkadaşları daha önce Sysmex UF-100 cihazının performansını 135 periton diyaliz sıvısıyla değerlendirmiş ve 0.825 korelasyonu ile lökosit sayısı için mükemmel bir uyum bulmuştur (55). Sonrasında UF-1000i'nin vücut sıvısı modunun değerlendirildiği bir çalışmada WBC analizinin yeterince doğru olduğu ve manuel mikroskobinin dezavantajlarını ortadan kaldıracağı gözlemlenmiştir (53). Bununla birlikte, hücre tipine veya örnek tipine bağlı olarak otomatik metotları ve manuel mikroskobik metotları karşılaştıran doğruluk değerlendirmelerinde bazı tutarsızlıklar vardır (48). Başka bir çalışmada 45 periton sıvısı örneğinde, daha düşük uyum (0,48 Kappa indeksiyle) saptanmıştır (41). Bizim çalışmamızda ise periton sıvısı örnekleri için 0.659 Spearman korelasyonu ile orta düzeyde uyum saptanmıştır. Mevcut analizörün duyarlılığı (%100) göz önüne alındığında bu değerin kabul edilebilir olduğu görülmektedir.

Bazı çalışmalarda manuel analizin tek bir gözlemci veya birkaç gözlemci tarafından yapılıp yapılmadığı belirtilmemektedir. Halbuki manuel yöntemin standart olarak kabul edilebilmesi için sonuçlar gözlemci değişikliğinden etkilenmemelidir. Bu sebeple bizim çalışmamızda, manuel gözlemler çalışma boyunca aynı kişi tarafından yapılmıştır. Manuel tekniğin gözlemciler arası değişkenliği, onun bir referans yöntem olarak kullanımını geçersiz kılacaktır.

Çalışmamızda periton sıvısı örneklerinde plevral örneklerde olduğu gibi pozitif yanlılığın olması literatürdeki diğer çalışmalarda da gözlenmiştir (56). Seröz sıvıların, kendilerine özgü biyolojik matris bileşimi, makrofajlar ve

mezotelyal hücreler gibi hücresel elementlerin varlığı; yanlış bir şekilde yükselmiş WBC olarak ortaya çıkabilir. Bu hücrelerin lökositlerden (10-20 µm) daha büyük (15–21 µm) olmasına rağmen, yanlışlıkla lökosit olarak sayılmalarına neden olan bir çakışma penceresi vardır. Bu hücre tipleri WBC sayımından çıkarılmalıdır, TNC sayımına dahil edilmelidir. Buna rağmen tanısal doğruluğu göz önüne aldığımızda periton diyaliz sıvıları ve asit sıvılarında sırasıyla %100 ve %94,1 değerleriyle mükemmel duyarlılık göstermiş olup, %81,2 ve %77,4 özgüllük göstermiştir. Sonuçlarımız UF1000i ile gerçekleştirilen bir çalışmanın sonuçları (duyarlılık %100, özgüllük %78-83) ile uyumluydu (53).

Çalışmamızda akım sitometri SVS'lerde hücre sayımı için iyi korelasyon gösterirken, bakteriyel kültür ile de iyi bir korelasyon gösterdi. Üreme saptanan kültür pozitif örneklerin, kültür negatiflere göre istatistiksel olarak daha yüksek bakteri sayılarının olduğunun saptanmıştır. Bu sonuçlar 2019 yılında yapılan bir çalışmayla uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmada 240 bakteri / µL'lik bir sınır değer uygulanarak %95 özgüllükle kültür pozitifliğini tahmin edebildiğini gösterildi (57). Saito ve arkadaşlarının farklı SVS'ler üzerinde akım sitometri prensibine dayalı bir analizörle gerçekleştirdikleri çalışmada örnek tipine göre 40-100 bakteri / µL arasında bir sınır değer uygulayarak % 84.4 duyarlılık ve% 86.0 özgüllükle kültür pozitifliğini göstermişlerdir (58). Ayrıca gram boyama sonuçları ile birlikte kullanılan bakteri sayımları kültür pozitifliği açısından ek bilgiler sağlayabilir.

Yüksek mikrobiyal konsantrasyonlu SVS örnekleri için MALDI-TOF MS ile doğrudan tanımlama başarı sağlayabilir. Daha düşük bakteri konsantrasyonuna sahip örnekler için ise çalışmamızda olduğu gibi doğrudan tanımlamadan önce kısa bir inkübasyon adımı ile tanımlama şansı arttırabilir.

MALDI-TOF MS, tüm dünyada kültür ortamından izole edilen mikroorganizmaların tanımlanması için kullanılsa da teknoloji hasta numunelerini doğrudan analiz edebilir, kültür ihtiyacını atlayabilir, patojen tanımlama süresini en az 12 ila 48 saat azaltabilir ve klinik numunede patojenlerin protein varlığını veya yokluğunu tespit edebilir, polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı yöntemlerin yerine veya bunlara ek olarak kullanılabilir.

Bununla birlikte MALDI-TOF MS'nin geniş mikroorganizma protein veri tabanlarına sahip olmaması ve yüksek maliyeti sebebiyle on yıl öncesine kadar direkt klinik örneklerden mikroorganizma tanımlaması için kullanımı sınırlı olmuştur. Daha sonraları, çeşitli laboratuvarlar mikroorganizmaların doğrudan kan kültürlerinden (59, 60) ve idrardan (61, 62) farklı protein ekstraksiyon yöntemleriyle tanımlanmasını hedefleyen çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Doğrudan SVS örneklerinden bakterilerin tanımlanması için MALDI-TOF MS'nin kullanımı kan ve idrar örneklerine göre daha sınırlı sayıda çalışma ile araştırılmıştır. SVS örnekleriyle yapılan ilk çalışma toplum kaynaklı menenjit şüphesi olan bir hastanın BOS örneğinden *S. pneumoniae* tanımlanmasıdır (7). Kan kültürü pozitif sinyal veren şişelerden yapılmış çalışmalarda gram negatif mikroorganizmalar için %90 doğru tanımlama, gram pozitif mikroorganizmalar için %80 civarında doğru tanımlama elde edilmiştir (42). MALDI-TOF MS ile başarılı mikroorganizma tanımlaması için, slaytta bakteri konsantrasyonunun yaklaşık 10^4–10^6 koloni oluşturan birim (kob) (8) hatta bazı türler için minimum 10^8 kob (43) olması gerekmektedir. Kan kültür şişelerinden tanımlama oranlarının yüksek olması, şişenin pozitif sinyal verdiğinde 10^8 kob/ml bakteri ihtiva etmesiyle yakından ilişkilidir. Segawa ve arkadaşlarının yayınladığı, beyin cerrahi operasyonu sonrası gelişen menenjit olgusunda patojen olan *K. pneumoniae* başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Bu olguda gram boyalı preparatta gram negatif basillerin görülmesi BOS içindeki bakteri konsantrasyonunun minimum 10^5 kob/mL olduğunu göstermektedir (8). Tanımlama oranlarını artıran bir diğer faktör başlangıç numune hacminin fazla olmasıydı (63). Bazı yazarlar tarafından önerilen 15 mL'lik başlangıç hacmi (64) periton diyalizi sıvısında mümkün olsa da diğer SVS'ler için mümkün değildir.

Çalışmanın başında protein ekstraksiyon protokol optimizasyonu ve MALDI-TOF MS'nin tanımlama konsantrasyonunu belirlemek için denemeler gerçekleştirildi. Denemeler sonucunda MALDI-TOF MS'nin gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmalar için tanımlama sınırı 10^8 kob/mL olarak saptandı. Hasta örnekleriyle doğrudan MALDI-TOF MS ile tanımlama çalışmalarımızda başarı sağlanamaması, SVS'lerin başlangıçta 10^4 kob/mL

bakteri içermesi ve bu konsantrasyonun MALDI-TOF MS tespit limitinin çok altında olması besiyeri ortamında bir inkübasyon adımını zorunlu kılmıştır. İnkübasyon sonunda tanımlama oranları gram negatif bakterilerde %28,9, gram pozitif bakterilerde %30,5'di. Sayım plağı ekim petrileri incelendiğinde 52 SVS (%47,2) örneğinde ya üreme yoktu ya da ≤10^4 kob/mL ile tanımlama sınırının altındaydı. Sonuç olarak bu örneklerde tanımlama sağlayacak kaliteli bir protein spektrumu elde edilmemesi beklenen bir durum olmuştur. Bu örnekler hariç tutulduğunda doğru tanımlama oranları monomikrobiyal üremeli tüm örneklerde %64,2'ye, gram negatif bakterilerde %57,8'e ve gram pozitif bakterilerde %53,1'e yükselmiştir. Bu oranlar gram boyama sonucu pozitif olan 44 BOS örneğiyle gerçekleştirilmiş MALDI-TOF MS'in direkt örnekten tanımlama duyarlılığını değerlendiren bir çalışmanın tüm monomikrobiyal üremeli örneklerdeki tanımlama yüzdesinden (%38,6) ve gram pozitif üremeli örneklerin tanımlama yüzdesinden (%9) yüksektir (9). Her ne kadar dondurma işleminin bakteriye zarar vermediği bilinse de SVS örneklerinin olduğu gibi dondurucuya kaldırılmasının bakteri üremesini inhibe ettiği ve sıvı besiyerine ekim yapmanın bakteri üremesini sağlamak için yeterli olmadığı yönünde kanaatimiz oluşmuştur. Bu durum UF5000 ile elde ettiğimiz bakteri sayım sonuçları ile tanımlama oranları arasındaki ilişkiyi saptamamıza da engel olmuştur. Ancak, *S. epidermidis* üremesi olan bir örnekte sayım plağında üreme olmadığı halde MALDI-TOF MS ile doğru tanımlama elde edilmiştir. İlgili türün beklenen üreme şekli göz önüne alındığında (küme oluşturma), en olası açıklama, öze ile alınan miktarda bakterinin kaçırılmış olmasıdır.

Kısa inkübasyon stratejilerinin anaerobik bakterileri tanımlamada daha az başarılı olduğu bilinmektedir (65). Bu nedenle anaerop üremesi olduğu bilinen 3 örnek uygun koşullarda ve aerop mikroorganizmalardan daha uzun süre inkübe edildi. İnkübasyon sonu ekimlerinde üreme olmaması bakterilerin ölmüş olabileceğini bu nedenle tanımlanamamış olduğunu düşündürmekteydi. Çalışmamıza dahil edilen BOS örneklerinden birinde *L. monocytogenes* üremiş, MALDI-TOF MS ile tanımlanamamıştır. İnkübasyon sonrasında sayım plağında 10^5 kob/mL bakteri ürediği gözlenmiştir. Bu

konsantrasyon literatürde de vurgulandığı gibi *Listeria*'nın bir numuneden tanımlanması için gerekli tespit sınırı(yaklaşık 10^7-10^8 kob/mL)'nın altında kalmaktadır (66). Sayım plağında ≥10^5 kob/mL üremesi olup tanımlanamayan 4 örnek aşırı visköz özellikteydi. Bu örneklerde lökositler elimine edilemediğinden tanımlama sağlanamadı. Bu tarz örnekler için katı besiyerinde kısa süreli inkübasyon tanımlama oranlarını artırabilir. Çalışmamıza üreme olmayan örnekler dahil edilmemiş olup özgüllük değerlendirilmemiştir.

Enfekte SVS örneklerinin inoküle edildiği sıvı besiyerinden elde edilen spektrumların, katı besiyerinden izole edilmiş bakteri kolonilerinden elde edilenlerden farklı olduğu görülmüştür. Pinault ve arkadaşları idrar örneklerinden kültür olmaksızın tanımlama çalışmalarında benzer bulguya rastlamışlardır. Bu nedenle 1000 farklı enfekte idrar örneğinden oluşturulmuş özel bir MALDI-TOF spektrum veri tabanı hazırlayarak performansını değerlendirmişlerdir. Urinf adı verdikleri veri tabanı için, 4.000-16.000 Da m / z aralığını kullanarak alfa defensin gibi savunma proteinlerinin spektral gürültüsünü azaltmayı hedeflemişlerdir. Standart veri tabanıyla %50 doğru tanımlama elde edilirken ve Urinf veri tabanıyla %90'lara varan doğru tanımlama elde edilmiştir. Ayrıca 10^4 kob/mL bakteri sayımına sahip idrar örneklerinin tanımlanma oranı %26'dan %74'e yükselmiştir (67).

Sonuç olarak SVS'lerin başlangıç bakteri konsantrasyonunun düşük olması, direkt örnekten ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen spektrumların tek koloniden elde edilmiş veri tabanı spektrumları ile uyuşmaması özel veri tabanı ihtiyacını göstermektedir. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında böyle bir veri tabanı SVS'ler için de umut vadetmektedir. Üstelik her yeni tanımlanan mikroorganizma ile geliştirilebilir özellikte olması bu yaklaşımın bir diğer yararı olacaktır.

Bu çalışma SVS enfeksiyonlarına neden olan bakterilerin tanımlanmasını 24-48 saatten 8,5 saate düşürdüğünü ve örneğin inoküle edildiği gün tanımlanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, laboratuvardaki uygulama ile ilgili olarak, en çok zaman alan adımlar (8 saat inkübasyon, 15

dakikalık santrifüjler) uygulamalı zaman gerektirmez ve bu da tekniği mevcut klinik laboratuvar iş akışlarında kolayca uygulanabilir hale getirir.

Sonuç olarak çalışmamızdaki her iki yöntemde, gerek laboratuvardaki iş gücü kullanımını daha efektif hale getirmesi, gerek bu kadar kritik enfeksiyonlar açısından klinisyenlere aynı gün içinde bakteri varlığını ve hatta patojeni belirleyerek antibiyotik tedavisi açısından yol gösterici olması anlamında önemli fayda sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Buoro S, Gustinetti R, Dominoni P, Alessio MG, Filisetti P, Luca MG, et al. Analytical evaluation of Sysmex UF-1000i for flow cytometric analysis of peritoneal fluid. Clin Biochem. 2012;45(15):1263-5.
2. Buoro S, Ottomano C, Esposito SA, Gherardi P, Alessio MG, Crippa A, et al. Analytical and Clinical Evaluation of Sysmex Uf1000i for Automated Screening of Cerebrospinal Fluids. Journal of Medical Biochemistry. 2013;33(2):191-6.
3. Glasser L, Murphy CA, Machan JT. The clinical reliability of automated cerebrospinal fluid cell counts on the beckman-coulter LH750 and iris iQ200. American Journal of Clinical Pathology. 2009;131(1):58-63.
4. Seghezzi M, Manenti B, Previtali G, Alessio MG, Dominoni P, Buoro S. Preliminary evaluation of UF-5000 Body Fluid Mode for automated cerebrospinal fluid cell counting. Clin Chim Acta. 2017;473:133-8.
5. Yilmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktas H. Applications of MALDI-TOF MS in microbiological identification. TAF Preventive Medicine Bulletin. 2014;13:1.
6. Dingle TC, Butler-Wu SM. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. Clin Lab Med. 2013;33(3):589-609.
7. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Bocher S, Damkjaer Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and Brucella species identified in less than half an hour. Scand J Infect Dis. 2010;42(9):716-8.
8. Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. Clin Chim Acta. 2014;435:59-61.
9. Bishop B, Geffen Y, Plaut A, Kassis O, Bitterman R, Paul M, et al. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid bacterial identification in patients with smear-positive bacterial meningitis. Clin Microbiol Infect. 2018;24(2):171-4.
10. Doern CD, Forbes BA. Bacteriology. In: Rifai N, PhD, editor. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. sixth ed: Elsevier; 2018. p. 1736-.e42.
11. Vanderah TW, Gould DJ. Ventricles and Cerebrospinal Fluid. Nolte's The Human Brain. 5. 7 ed2016. p. 103-25.
12. Block DR, Florkowski CM. Body Fluids. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Sixth ed: Elsevier; 2018. p. 925-.e35.
13. Meningitis. Am Fam Physician. 2017;96(5):Online.
14. Institute CaLS. Body Fluid Analysis for Cellular Composition; Propsed Guidelines. CLSI document H56-P, Clinical and Laboratory Standard Institute. 2005.
15. Dorsett M, Liang SY. Diagnosis and Treatment of Central Nervous System Infections in the Emergency Department. Emerg Med Clin North Am. 2016;34(4):917-42.
16. Dizbay M. Bronş, Akciğer, Plevra ve Mediasten Enfeksiyonları. In: WılkeTopcu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 4 ed: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017. p. 841-4.

17. Levison ME, Bush LM. Peritonitis and Intraperitoneal Abscesses. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 12014. p. 935-59.e4.
18. Bignardi GE. Flow cytometry for the microscopy of body fluids in patients with suspected infection. J Clin Pathol. 2015;68(11):870-8.
19. Kliegman RM, Lye PS, Bordini BJ, Toth H, Basel D. Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis: Elsevier; 2017. Chapter 398, 2147-8.e2 p.
20. Mowat C, Stanley AJ. Review article: spontaneous bacterial peritonitis--diagnosis, treatment and prevention. Aliment Pharmacol Ther. 2001;15(12):1851-9.
21. Kepenekçi İ, Demirer S, Başkan S. Apandisit, divertikülit ve peritonitler. In: Topcu AW, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017. p. 1050-59.
22. Bar-Meir S, Lerner E, Conn HO. Analysis of ascitic fluid in cirrhosis. Dig Dis Sci. 1979;24(2):136-44.
23. Brannigan E, Wong P, Leaper D. Abdominal and other surgical infections. Antibiotic and Chemotherapy: Elsevier; 2010. p. 483-501.
24. Warady B, Bakkaloglu S, Newland J, Blaauw M, Verrina E, Neu A, et al. Consensus Guidelines for the Prevention and Treatment of Catheter-related Infections and Peritonitis in Pediatric Patients Receiving Peritoneal Dialysis: 2012 Update. Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis. 2012;32 Suppl 2:S32-86.
25. Davies SJ, Wilkie ME. Complications of Peritoneal Dialysis. In: Feehally J, DM, editor. Comprehensive Clinical Nephrology. Sixth ed: Elsevier; 2019. p. 1114-23.e1.
26. Yamada A, Kasahara K, Ogawa Y, Samejima K, Eriguchi M, Yano H, et al. Peritonitis due to Moraxella osloensis: A case report and literature review. J Infect Chemother. 2019;25(12):1050-2.
27. Roberts JR. Thoracentesis. Roberts and Hedges' Clinical Procedures in Emergency Medicine and Acute Care. 7 ed: Elsevier; 2019. p. 181-95.e1.
28. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC, Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. Ann Intern Med. 1972;77(4):507-13.
29. Conner BD, Lee YCG, Branca P, Rogers JT, Rodriguez RM, Light RW. Variations in pleural fluid WBC count and differential counts with different sample containers and different methods. Chest. 2003;123(4):1181-7.
30. Noppen M, De Waele M, Li R, Gucht KV, D'Haese J, Gerlo E, et al. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162(3 Pt 1):1023-6.
31. Kanev M, Muranlı FG. Flow sitometri ve kullanım alanları. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2016;20(1):33-8.
32. Sun, Tsieh. Principles of Flow Cytometry. Flow Cytometry and Immunohistochemistry for Hematologic Neoplasms. 1st ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 4-14.
33. Akram A, Maley M, Gosbell I, Nguyen T, Chavada R. Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management. Int J Infect Dis. 2017;57:144-9.

34. Serife S, Nurver Ulger T, Can I, Guner S. Evaluation of direct 16S rRNA PCR from clinical samples for bacterial detection in normally sterile body sites. The Journal of Infection in Developing Countries. 2019;13(11).
35. Grif K, Heller I, Prodinger WM, Lechleitner K, Lass-Flörl C, Orth D. Improvement of Detection of Bacterial Pathogens in Normally Sterile Body Sites with a Focus on Orthopedic Samples by Use of a Commercial 16S rRNA Broad-Range PCR and Sequence Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(7):2250.
36. Wolk DM, Clark AE. Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry. Clinics in Laboratory Medicine. 2018;38(3):i-564.
37. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology. 2015;6(791).
38. Wolk DM, Clark AE. Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry. Clin Lab Med. 2018;38(3):471-86.
39. Wang XH, Zhang G, Fan YY, Yang X, Sui WJ, Lu XX. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. J Microbiol Methods. 2013;92(3):231-5.
40. Simon L, Ughetto E, Gaudart A, Degand N, Lotte R, Ruimy R. Direct Identification of 80 Percent of Bacteria from Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Using a 10-Minute Extraction Protocol. J Clin Microbiol. 2019;57(2).
41. Aguadero V, Cano-Corres R, Berlanga E, Torra M. Evaluation of biological fluid analysis using the sysmex XN automatic hematology analyzer. Cytometry B Clin Cytom. 2018;94(5):680-8.
42. Faron ML, Buchan BW, Ledeboer NA. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. J Clin Microbiol. 2017;55(12):3328-38.
43. Van Driessche L, Bokma J, Deprez P, Haesebrouck F, Boyen F, Pardon B. Rapid identification of respiratory bacterial pathogens from bronchoalveolar lavage fluid in cattle by MALDI-TOF MS. Sci Rep. 2019;9(1):18381.
44. Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. J Clin Microbiol. 2012;50(8):2568-76.
45. Buoro S, Apassiti Esposito S, Alessio M, Crippa A, Ottomano C, Lippi G. Automated Cerebrospinal Fluid Cell Counts Using the New Body Fluid Mode of Sysmex UF-1000i. J Clin Lab Anal. 2016;30(5):381-91.
46. Maleb A, Bouayadi O, El Malki J, Rifai S, Lamrabat S, Benaissa E, et al. Cytological examination of cerebrospinal fluid: Sysmex UF-1000i versus optical microscopy. Anal Biochem. 2020;589:113501.
47. Glasser L, Murphy CA, Machan JT. The clinical reliability of automated cerebrospinal fluid cell counts on the Beckman-Coulter LH750 and Iris iQ200. Am J Clin Pathol. 2009;131(1):58-63.
48. Sandhaus LM. Body fluid cell counts by automated methods. Clin Lab Med. 2015;35(1):93-103.

49. de Jonge R, Brouwer R, de Graaf MT, Luitwieler RL, Fleming C, de Frankrijker-Merkestijn M, et al. Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. Clin Chem Lab Med. 2010;48(5):665-75.
50. Sandhaus LM, Ciarlini P, Kidric D, Dillman C, O'Riordan M. Automated cerebrospinal fluid cell counts using the Sysmex XE-5000: is it time for new reference ranges? Am J Clin Pathol. 2010;134(5):734-8.
51. Penders J, Fiers T, Dhondt AM, Claeys G, Delanghe JR. Automated flow cytometry analysis of peritoneal dialysis fluid. Nephrol Dial Transplant. 2004;19(2):463-8.
52. Langlois MR, Delanghe JR, Steyaert SR, Everaert KC, De Buyzere ML. Automated flow cytometry compared with an automated dipstick reader for urinalysis. Clin Chem. 1999;45(1):118-22.
53. Fleming C, Brouwer R, van Alphen A, Lindemans J, de Jonge R. UF-1000i: validation of the body fluid mode for counting cells in body fluids. Clin Chem Lab Med. 2014;52(12):1781-90.
54. Cho J, Oh J, Lee SG, Lee YH, Song J, Kim JH. Performance Evaluation of Body Fluid Cellular Analysis Using the Beckman Coulter UniCel DxH 800, Sysmex XN-350, and UF-5000 Automated Cellular Analyzers. Ann Lab Med. 2020;40(2):122-30.
55. Penders J, Fiers T, Dhondt AM, Claeys G, Delanghe JR. Automated flow cytometry analysis of peritoneal dialysis fluid. Nephrology Dialysis Transplantation. 2004;19(2):463-8.
56. Fleming C, Russcher H, Lindemans J, de Jonge R. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. Clin Chem Lab Med. 2015;53(11):1689-706.
57. Rubio E, Zboromyrska Y, Bosch J, Fernandez-Pittol MJ, Fidalgo BI, Fasanella A, et al. Evaluation of flow cytometry for the detection of bacteria in biological fluids. PLoS One. 2019;14(8):e0220307.
58. Saito T, Iinuma Y, Takakura S, Fujihara N, Inoue J, Hamaguchi Y, et al. Feasibility of flow cytometry for the detection of bacteria from body fluid samples. J Infect Chemother. 2005;11(5):220-5.
59. Bazzi AM, Rabaan AA, El Edaily Z, John S, Fawarah MM, Al-Tawfiq JA. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. Journal of Infection and Public Health. 2017;10(3):308-15.
60. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. Clin Microbiol Infect. 2010;16(11):1631-8.
61. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology. 2010;48(6):2110.
62. Kim Y, Park KG, Lee K, Park Y-J. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens From Urine Samples Using the Vitek MS System Based on Matrix-

Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. alm. 2015;35(4):416-22.
63. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. Clin Microbiol Infect. 2016;22(6):561.e1-6.
64. Huang B, Zhang L, Zhang W, Liao K, Zhang S, Zhang Z, et al. Direct Detection and Identification of Bacterial Pathogens from Urine with Optimized Specimen Processing and Enhanced Testing Algorithm. J Clin Microbiol. 2017;55(5):1488-95.
65. Bryson AL, Hill EM, Doern CD. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight: The Revolution in Progress. Clin Lab Med. 2019;39(3):391-404.
66. Jadhav S, Sevior D, Bhave M, Palombo EA. Detection of Listeria monocytogenes from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. J Proteomics. 2014;97:100-6.
67. Pinault L, Chabrière E, Raoult D, Fenollar F. Direct Identification of Pathogens in Urine by Use of a Specific Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Spectrum Database. J Clin Microbiol. 2019;57(4).