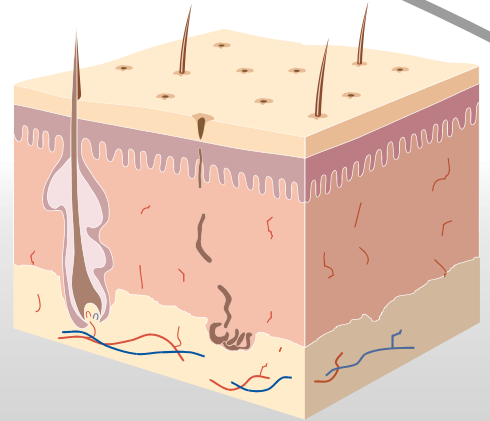
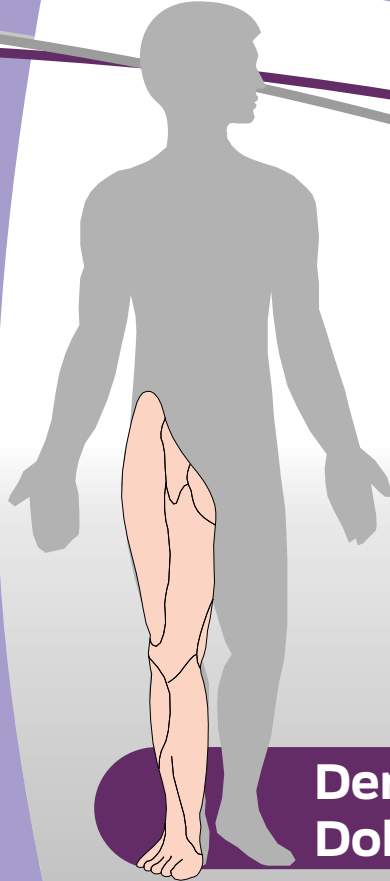




KLİNİK ÖRNEKTEN SONUÇ RAPORUNA UYGULAMA REHBERİ



**Deri, Deri Ekleri, Yumuşak
Doku Örnekleri - Göz Örnekleri**

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

Mayıs 2014, Ankara

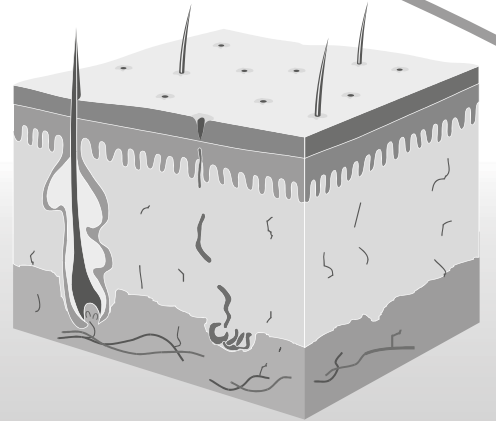
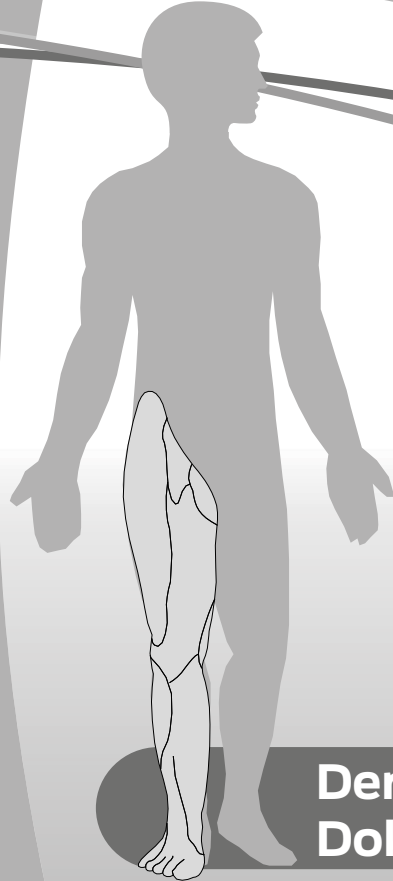
ISBN:....

Basım yeri:, Ankara

KLİMUD Kaynak No: 1



KLİNİK ÖRNEKTEN SONUÇ RAPORUNA UYGULAMA REHBERİ



**Deri, Deri Ekleri, Yumuşak
Doku Örnekleri - Göz Örnekleri**

KLİMUD-RHKK Üyeleri

Mehmet Baysallar

Selda Erensoy

Berrin Esen

Duygu Fındık

Pınar Zarakolu Köşker

Belkıs Levent

Cüneyt Özakın

Serap Süzük

Burçin Şener

Ayşın Zeytinöđlu

Deri, Deri Ekleri, Yumuşak Doku ve Göz Örnekleri Alt Çalışma Grubu Üyeleri

Başkan

Cüneyt Özakın

Yazıcı Üyeler

Alper Akçalı

Burcu Dalyan Cilo

Dilara Öđünç

Yasemin Öz

Nurver Ülger

Klinisyen Üyeler

Oral Öncül

Uygulayıcı Üyeler

Pınar Şamlıöğlu

Sezcan Sağlam

Okuyucu Üyeler

Feriha Cilli

Süleyha Hilmiöđlu Polat

Zeynep Ceren Karahan

Rehber Değerlendirme Grubu

Hakan Abacıöđlu

Ali Adilođlu

Selda Erensoy

Betiđül Öngen

İÇİNDEKİLER

- I. Sunuş
- II. Kısaltmalar/Tanımlamalar
- III. Biyogüvenlik Uygulamaları
 1. DERİ, DERİ EKLERİ ve YUMUŞAK DOKU ÖRNEKLERİ
 - 1.1. Giriş
 - 1.2. Deri, deri ekleri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında klinik örnek-mikroorganizma ilişkisi
 - 1.3. Sürüntü örnekleri
 - 1.3.1. Sürüntü örneklerinin alınması, taşınması, kabul veya ret kriterleri
 - 1.3.2. Sürüntü örneklerinin işlenmesi ve iş akışı
 - 1.3.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması
 - 1.4. Apse ve aspirat örnekleri (Aspirat örneği)
 - 1.4.1. Apse ve aspirat örneklerinin alınması, taşınması, kabul veya ret kriterleri
 - 1.4.2. Apse ve aspirat örneklerinin işlenmesi ve iş akışı
 - 1.4.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması
 - 1.5. Doku ve biyopsi örnekleri
 - 1.5.1. Doku ve biyopsi örneklerinin alınması, taşınması, kabul veya ret kriterleri
 - 1.5.2. Doku ve biyopsi örneklerinin işlenmesi ve iş akışı
 - 1.5.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması
 - 1.6. Dermatomikozlarda tanı için alınması gereken örnekler ve olası fungal etkenler
 - 1.6.1. Örneklerinin alınması, taşınması, kabul veya ret kriterleri
 - 1.6.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı
 - 1.6.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması
 - 1.7. Yanık yara enfeksiyonlarında tanı için alınması gereken örnekler ve olası etkenler
 - 1.8. Şarbon tanısı için alınması gereken örnekler
 - 1.8.1. Örneklerin alınması, taşınması ve saklanması
 - 1.8.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı
 - 1.8.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması
 - 1.9. Lepa tanısı için alınması gereken örnekler
 - 1.10. Isırık yaralarında tanı için alınması gereken örnekler
 - 1.10.1. Örneklerin alınması, taşınması, kabul veya ret kriterleri
 - 1.10.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı
 - 1.10.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

1.11. Diyabetik ayak ve dekübitüs ülserlerinde tanı için alınması gereken örnekler

1.11.1. Diyabetik ayak

1.11.2. Dekübitüs ülseri

1.11.2.1. Örneklerin alınması, taşınması, kabul veya ret kriterleri

1.11.2.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı

1.11.2.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

1.12. Kaynaklar

2. GÖZ ÖRNEKLERİ

2.1. Giriş

2.2. Klinik örnek-mikroorganizma ilişkisi

2.2.1. Örneklerin alınması, taşınması, kabul veya ret kriterleri

2.2.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı

2.2.3. Sonuçların raporlanması

2.3. Kaynaklar

I. SUNUŞ

Enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede klinik mikrobiyoloji laboratuvarları kilit bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların küresel yayılımının kolaylaşması, yeni tanımlanan ve/veya yeniden önem kazanan hastalık etkenleri, antimikrobiyal ilaç direncindeki hızlı artış, değişen hasta profili ve sık karşılaşılmayan fırsatçı enfeksiyonlar, mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulamaya yeni giren ileri tanı yöntemleri “Klinik Mikrobiyoloji” laboratuvarlarının önemini giderek arttırmaktadır.

Tıbbi (Klinik) Mikrobiyoloji uzmanının sorumluluğu; insanda mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların tanısı, ayırıcı tanısı, önlenmesi, tedavisinin yönlendirilmesi ve izlenmesini, antimikrobiyal ilaç direncinin izlenmesi amacıyla hastaya ait tüm biyolojik örneklerin incelenmesini; mikrobiyolojik, immünolojik ve moleküler testlerin seçimini, testlerin yapılmasını, sonuçların yorumlanmasını ve tıbbi konsültasyonu kapsamaktadır. Klinik mikrobiyoloji uzmanlarının rolü; klinisyenin bir enfeksiyon hastalığından şüphelenmesinden başlayıp o enfeksiyon ortadan kalkıncaya kadar devam etmektedir. Bu yaklaşımla mikrobiyoloji uzmanlığını kapsayan süreci; pre-preanalitik, preanalitik, analitik, postanalitik ve post-postanalitik süreçler başlığında değerlendirmek gerekir. Tüm bu süreçte klinik mikrobiyoloji uzmanının; doğru ve hızlı sonuç verebilecek, hasta güvenliğini ön planda tutarak sağlık hizmeti kalitesini artıracak ve maliyet etkin uygulamaları gözeterek bir yaklaşıma sahip olması gerekmektedir. KLİMUD tarafından çalışmalarına 2013 yılında başlanarak 2014 yılında tamamlanan ve üyelerinin kullanımına sunulan bu ve diğer “Klinik örnekten sonuç raporuna uygulama rehberleri”nde yukarıda anılan tüm süreçte bir klinik mikrobiyoloji uzmanının sahip olması gereken yetkinlikler için ihtiyaç duyacağı bilgilere sistematik bir yaklaşım sunulması amaçlanmaktadır.

Rehberlerin, mikrobiyoloji uzmanının sahip olacağı doğru ve güvenilir tanı yaklaşımı yanında klinisyen-mikrobiyolog işbirliğinin artırılmasına da katkı sağlaması hedeflenmekte böylece doğru tanı için en önemli unsurlardan biri olan klinik örneğin pre-pre analitik ve preanalitik süreçlerinin de yönetilmesi için bir kaynak olması amaçlanmaktadır. “Klinik örnekten sonuç raporuna uygulama rehberleri”nin, tıbbi/klinik mikrobiyoloji uzmanlarının uygulamalarında standart bir yaklaşımın oluşturulmasına da katkı sağlaması ve etkinliği kanıtlanmamış ya da etkisiz ve yanlış uygulamaların önlenmesi hedeflenmekte bu amaçla rehberlerde bir klinik örnekle ilgili yapılacak mikrobiyolojik işlemlere yönelik olarak, test isteminden sonucun raporlandırılmasına kadar geçen tüm aşamalar için kanıta dayalı yaklaşımlara da yer verilmektedir. KLİMUD Rehberlerinin, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) tarafından yürütülen Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS) çalışması kapsamında hazırlanan rehberler ile birlikte alandaki önemli bir boşluğu kapatacağını düşünüyoruz.

Hedef kitlesi birinci, ikinci ve üçüncü basamak sağlık kurum ve kuruluşlarında hizmet veren tüm tıbbi/klinik mikrobiyoloji uzmanları ile uzmanlık öğrencileri olan rehberlerimizin laboratuvarlarımızda yaygın bir şekilde kullanılması en büyük arzumuzdur. Son olarak, rehberlerimizin her zaman birlikte daha iyiyi bulma ilkesi ile periyodik olarak geliştirilerek güncelleneceğini de bilgilerinize sunar rehberin hazırlanmasında emeği geçen, katkı ve katılım veren tüm üyelerimize ve UMS'nin tamamlayıcı bir unsur olarak hazırlanmasına olanak sağlayan THSK yetkililerine sonsuz teşekkür ve şükranlarımızı sunarız.

KLİMUD Yönetim Kurulu
Nisan, 2014

II. BU REHBERİ NASIL KULLANACAKSINIZ?

“Klinik örnekten sonuç raporuna uygulama rehberleri” nin mikrobiyoloji uzmanlarımıza, örneğin alınışından raporlanma aşamasına kadarki tüm süreçlerin yönetilmesinde yardımcı bir kaynak olması amaçlanmaktadır. Bu amaçla rehberin ilk bölümünde genel olarak örneğin alındığı sistem, sık karşılaşılan enfeksiyonları ve bu enfeksiyonların etkenleri ile ilgili çok özet bir bilgilendirme yapılmaktadır. Bu bölümün ardından; her sistemin ilgili örneğinin alınması, taşınması, saklanması, işlenmesi ve raporlandırılması süreçleri okuyucuyu yormadan kolayca bilgiye ulaşmasının hedeflendiği tablolar ve iş akış şemaları kullanılarak özetlenmektedir. Tablo ve iş akış şemaları arasında yer alan “**bilgi not**”ları konu ile ilgili olarak bilinmesi gereken en önemli noktalara, “**uyarı**” kutucukları ise özellikle uygulamada dikkatli olunması gereken süreçlere vurgu yapmakta olup bu amaçla tüm rehberde aşağıda yer alan simgeler kullanılmaktadır. Rehberin en başında yer alan “**biyogüvenlik uygulamaları**” sadece hatırlatıcı olup konuya özgü rehberlerde yer alan tüm önlemlerin özenle uygulanmasına dikkat çekilmektedir.

Rehber boyunca kullanılan simgeler ve anlamları aşağıda gösterilmektedir.



Bilgi simgesi

İlgili örnek ve/veya enfeksiyon hakkında mutlaka bilinmesi gereken bilgi



Uyarı-dikkat çekme simgesi

Önemli mesajlar/uygulamalar



Raporlama simgesi

İlgili örneğin raporlanmasında kullanılan farklı şablonlar

III. KISALTMALAR

BI	: Bakteriyolojik indeks
DAÜ	: Diabetik ayak ülseri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EZN	: Erlich Ziehl-Neelsen
KOH	: Potasyum hidroksit
KVLB agar	: Kanamisin-vankomisin kanlı agar
NaOH	: Sodyum hidroksit
NNA	: Non-nutrient agar
PBS	: Fosfat tamponlanmış saline
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
THIO	: Tiyoglikolatlı sıvı besiyeri

IV. BİYOGÜVENLİK

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında klinik örneklerin ve izolatların işlenmesi sırasında mutlaka iyi laboratuvar uygulamalarına dikkat edilir. Başta aerosol oluşturan işlemler olmak kaydıyla tüm işlemler sırasında asgari **Biyogüvenlik düzey (BGD) II önlemleri** alınır.

Fiziksel önlemler

- * Laboratuvarlara giriş/çıkışlar sınırlandırılır.
- * Laboratuvarların girişinde biyogüvenlik işareti bulunur.
- * Laboratuvarlar ile ofis alanları birbirinden ayrılır.

İyi/Güvenli laboratuvar uygulamaları

- * Laboratuvarda çalışılırken mutlaka uygun kişisel koruyucu donanım (KKD) giyilir ve laboratuvar alanı terk edilmeden önce çıkarılır.
- * Aerosol oluşturan tüm işlemler Sınıf II Biyolojik güvenlik kabininde yapılır.
- * Enfeksiyöz atıklar usulüne uygun bir şekilde bertaraf edilir ve buna ilişkin kayıtlar tutulur.
- * Çalışma alanları ve cihazlar usulüne uygun bir şekilde temizlenir, düzenli bakım, kontrol ve kalibrasyonları yapılır.
- * Laboratuvarda kazalarına ilişkin prosedürlerin varlığı ve kayıtlarının tutulduğu kontrol edilir.
- * Çalışan sağlığına yönelik prosedürlerin varlığı ve kayıtlarının tutulduğu kontrol edilir.

Yüksek riskli patojenlerle çalışma

Mikobakteri, fransisella, brusella ve küf mantarları gibi etkenlerle çalışılırken **BGD II önlemlerine ek olarak** aşağıdaki önlemler de alınır.

- * Mikobakteri ile ilgili çalışmalar için ayrı bir laboratuvar alanı bulunması gerekirken diğer söz konusu etkenler için bu söz konusu değildir.
 - * Bu alanın girişi; çift kapılı, kendiliğinden kapanan bir kapı sistemi ile sınırlanır.
 - * Laboratuvar alanında tek yönlü hava akımı sağlanır, aynı anda hava girişi ve çıkışının olmamasına dikkat edilir.
 - * Bu alanda, normal laboratuvar alanlarında giyilenden ayrı bir KKD kullanılır, ek olarak FFP2 düzeyinde maske kullanılır. KKD bütün işlemler sırasında giyilir.
- * Bu etkenlerle çalışılırken, BGD 2 önlemlere ek olarak BGD 3 düzeyi uygulamalar gerçekleştirilir. Bu uygulamalar arasında önü kapalı ve kolları manşetli önlük, çift eldiven, respiratuvar sayılabilir (detaylı bilgi için bkz. UMS Laboratuvar Güvenliği Rehberi).
- * Bütün atıklar dekontamine edilir.



Yüksek riskli bir patojen ile enfeksiyon hastalığı olma ihtimali olan hastalara, aerosol oluşturacak herhangi bir girişim yapılacağı zaman mutlaka uygun KKD kullanılır. İşlem sonrası tüm malzemeler dekontamine edilir.

1. DERİ, DERİ EKLERİ ve YUMUŞAK DOKU ÖRNEKLERİ

1. 1. Giriş

Deri, insan için sadece bir örtü değil, değişik ve çok çeşitli fonksiyonları olan bir organdır. Estetik görevi yanında, altında yer alan doku ve organları dış ortam koşullarından koruyarak homeostazisi sağlamakta da görevli bir yapıdır. Deri embriyolojik olarak ektoderm, mezoderm ve nöroektodermden köken alan hücresel yapılar içermektedir.

Deri organlarımız içinde hem ağırlık, hem de hacim bakımından en büyüğüdür. Ağırlığı, yetişkin bir kişide ortalama 15-20 kg'a kadar ulaşırken, yüz ölçümü 1.80-2 m² arasında değişmektedir. Deri her yerde aynı kalınlıkta değildir. Genel olarak kalınlığı 0.5-2 mm arasında değişiklik göstermektedir. El içi ve ayak tabanında bu kalınlık 4-6 mm'ye kadar çıkarken, göz kapaklarında 0.1 mm'ye kadar incelmektedir.

Deri histolojik olarak epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Deri ekleri olarak isimlendirilen keratinize özellikteki kıllar ve tırnaklar ile salgısal özellikteki ter ve yağ bezleri dermis tabakasından kaynaklanmaktadır.

Yumuşak doku, vücudumuzdaki organ ve diğer yapıları çevreleyen, bağlayan ve destek olan kemik dışı yapılara denir. Yumuşak doku; tendon, fasiya, fibröz doku, yağ, sinovyal, kas, sinir ve kan damarlarından oluşur. Kısaca deri ve iskelet dışındaki mezenşimal dokulardır.

Deri, deri ekleri ve yumuşak doku enfeksiyonları: impetigo, fronkült, ektima, fronkül, karbonkül, erizipel, selülit, apse, miyozitis, cerrahi yara enfeksiyonları, özellikli bir konak olan yanık hastalarındaki yanık yara enfeksiyonları, dermatomikozlar, şarbon ve lepra'yı içermektedir. Yukarıda basedilen deri, deri ekleri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında tanı için; enfeksiyon bölgesinden alınan sürüntü, apse, aspirat, doku ve biyopsi örnekleri ile kıl, tırnak örnekleri değerlendirilmektedir. Bu rehber bölümünde deri, deri ekleri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tanısı için örneklerin seçilmesi, alınma teknikleri, laboratuvara kabulleri ve muhtemel etkenlere göre analiz edilmesi, elde edilen verilerin değerlendirilerek raporlanması basamakları için gerekli bilgiler sunulmuştur.

1. 2. Deri, deri ekleri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında klinik örnek-mikroorganizma ilişkisi

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tanısı için uygun örnekler ve olası etken mikroorganizmalar Tablo1’de sunulmaktadır.

Tablo 1.2 Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında tanı amaçlı kullanılan örnekler ve olası etkenler.

Enfeksiyon hastalığının adı	Örnek türü	Olası etkenler
İmpetigo	Aspirat/doku/ biyopsi*	Bakteri
		<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , Grup C ve G streptokok (nadir), Grup B streptokok (yenidoğanda)
Fronkült	Aspirat/doku/ biyopsi*	Bakteri
		<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
		Virus
		Herpes simplex
Ektima	Aspirat/doku/ biyopsi*	Mantar
		<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> türleri
Fronkül ve karbonkül	Aspirat/doku/ biyopsi*	Bakteri
Erizipel	Aspirat/doku/ biyopsi*	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i>
		Bakteri
Selülit	Aspirat/doku/ biyopsi*	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , Grup C,G,B streptokoklar
		Bakteri
Apse	Aspirat /doku	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , Grup C ve G streptokok (nadir), Grup B streptokok (yenidoğanda nadir), <i>S. aureus</i> (çok nadir)
		Bakteri
		<i>S. aureus</i> , diğer aerop ve anaerop bakteriler, maya mantarları (<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i>), küf mantarları, aerobik aktinomiçesler.
Miyozitis	Doku/Biyopsi/ Aspirat	Mantar
		<i>Candida spp</i>
		Bakteri
Şarbon	Sürüntü/ Biyopsi/ Aspirat/Kan kültürü **	<i>S. aureus</i> , Grup A streptokoklar, nadiren Grup B,C,G streptokoklar, <i>S. pneumoniae</i> , Gram negatif basiller, anaerobik bakteriler (<i>Fusobacterium necroporum</i> , <i>Clostridium spp...</i>), Nadiren <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. haemophilum</i>
		Bakteri
Lepra	Deri biyopsi (lezyon kenarından), nazal sürüntü	<i>Bacillus anthracis</i>
		Bakteri
		<i>M. leprae</i>

Deri tüberkülozları	Derideki ülserin sağlam doku ile sınırından alınan biyopsi örneği	Bakteri <i>M. marinum, M. ulcerans, M. haemophilum</i>
Cerrahi yara enfeksiyonları	Doku/ Biyopsi/ Aspirat/Kan kültürü	Bakteri <i>S. aureus</i> , KNS, Grup A,B,C,G streptokoklar, diğer streptokoklar, Enterokoklar, <i>Acinetobacter</i> spp, <i>Pseudomonasaeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , florada ve çevrede bulunan aerobik anaerobik bakteriler, Nadiren: <i>Mycoplasma hominis, Legionella pneumophila, Mycobacterium</i> spp (hızlı üreyenler) Mantar <i>Candida</i> spp
Yanık yara enfeksiyonları	Doku/ Biyopsi/ Aspirat/Kan kültürü ***	Bakteri <i>S. aureus</i> , koagülaz negatif stafilokoklar, <i>P. aeruginosa, Acinetobacter</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp, <i>Bacteroides</i> spp ve diğer anaeroplara, <i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Proteus</i> spp, <i>Aeromonas hydrophila</i> Virus Herpes simplex virus, Cytomegalovirus, Varicella-zoster virus Mantar <i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Alternaria</i> spp, <i>Zygomycetes</i>
Diyabetik Ayak enfeksiyonları	Debridman sonrası ülser tabanından kazıntı veya doku-kemik biyopsi örneği veya aspirat örneği	Bakteri <i>S. aureus, S. epidermidis, E. coli, K. pneumoniae, Proteus</i> spp, <i>P. aeruginosa, Acinetobacter</i> spp, <i>Peptostreptococcus, Peptococcus, Finegoldia magna</i>
Dekübit yara enfeksiyonları	Debridman sonrası ülser tabanından kazıntı veya doku biyopsi örneği veya aspirat örneği	Bakteri <i>S. aureus, Proteus mirabilis</i> , Grup D streptokoklar, <i>Escherichia coli, Staphylococcus</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Corynebacterium</i> spp, <i>Bacteroides</i> spp Mantar <i>Candida</i> spp
Miçetom	Doku/Aspirat/ Biyopsi örneği	Bakteri <i>Actinobaculum, Actinomyces, Pseudramibacter, Eubacterium, Mogibacterium</i> **** <i>Mycobacterium leprae, Nocardia asteroides, Nocardia brasiliensis</i> , diğer <i>Nocardia</i> türleri, <i>Nocardiopsis dassonvillei, Streptomyces</i> türleri. Mantar <i>Actinomadura</i> spp., <i>Madurella</i> spp., <i>Pseudoallescheria boydii</i> , diğer mantarlar.
Hayvan ısırıkları	Doku/biyopsi/ aspirat	Bakteri Hayvan ısırıkları: <i>Actinobacillus</i> spp, <i>Capnocytophaga</i> spp, <i>Erysipelothrix rhusiopathiae, Pasteurella</i> spp, <i>Streptobacillus</i> spp, <i>Mycobacterium fortuitum, M. kansasii, S. intermedius, Bergeyella zoohelcum, Propionibacterium</i> spp, <i>Filifactor</i> spp, <i>Moraxella</i> spp, <i>Neisseria</i> spp, <i>Kingella</i> spp, <i>P. fluorescens, Halomonas venusta</i> , CDC Group EF-4, CDC NO-1, <i>Peptococcus</i> spp, Streptokoklar, Stafilokoklar, <i>Moraxella</i> spp, Saprofit <i>Neisseria</i> türleri ve anaerobik bakteriler.

İnsan ısırıkları	Doku/biyopsi/ aspirat	Bakteri
		İnsan ısırıkları: Viridans streptokoklar, Stafilokoklar, <i>Haemophilus</i> türleri, <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , diğer <i>Fusobacterium</i> türleri, <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Prevotella</i> türleri, <i>Porphyromonas</i> türleri
		Virus
		Herpes, Hepatit B, Hepatit C, HIV

*Genellikle ampirik tedavi edilir. Yanıt yoksa veya altta yatan hastalığı olanlarda;

** 1) Vezikülün tepe kısmı enjektörle delinir ve 2-3 eküvyon ile örnek alınır.

2) Eskar kenarı kaldırılır eküvyon döndürülerek eskar altındaki vezikül sıvısı alınır. 2-3 eküvyon kullanılır.

3) Ülser tabanına eküvyon sürülerek örnek alınabilir.

4) Vezikül ve varsa eskardan biyopsi alınır. 3 eküvyon Gram boyama, kültür, yapılabiliyorsa PCR testleri için.

*** Yara sürüntü örneği, doku (punch biyopsi), anaerobik bakteriler için doku biyopsi ve aspirat, mantar enfeksiyonlarında doku biyopsi örneği, viruslar için doku biyopsi veya aspirat örneği, bakteri ve mantar enfeksiyonları için kan kültürü.

**** **Apse:** *Actinobaculum*, *Actinomyces*. **Sellülit:** *Actinomyces*, *Pseudramibacter*. **Nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonu:** *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Mogibacterium*.

1.3. Sürüntü örnekleri

1.3.1.Yara sürüntü örneklerinin alınması, taşınması saklama koşulları, kabul/ret ölçütleri

Önce debride edilmelidir. Yara yeri serum fizyolojik ile temizlenir (her seferinde yeni steril gazlı bezle silinir). Tüm yüzeysel eksuda ve nekrotik materyal temizlenir. Lezyon kuru ise eküvyon serum fizyolojik ile nemlendirilir. Sinüs ağzı bulunan ve tünel oluşturan yaralarda aynı temizlik yapıldıktan sonra eküvyon ucu sinüs ağzından aseptik şartlarda tünel içine sokulur ve en derin noktasına temas ettirilerek sürüntü örnekleri alınır. Ülseröz lezyonların eşlik ettiği yaralar, yanık enfeksiyonlarında sürüntü kültürleri yerine nekrotik doku altında ülserin canlı doku ile birleşim yerine yakın geçiş bölgesinden ya da canlı dokudan biyopsi örnekleri ile kantitatif kültür almak daha uygundur. Kantitatif kültür sonucu canlı dokuda $>10^5$ CFU/gr bakteri varlığı enfeksiyon tanısı koydurur. Enfekte bölgeye sürtülen eküvyon kendi etrafında 5 kez döndürülerek örnek alınır. Gram boyama için, aerop kültür, anaerobik kültür, mantar kültürü için ayrı eküvyonlar kullanılmalıdır. Eküvyon, transport besiyeri içinde gönderilir ise hem aerobik hem anaerobik bakterilerin saklanması, hem de Gram boyama için uygun olacaktır.

Mikobakteri kültürü amacıyla alınmış, travma sonrası ilk 48 saat içinde alınmış ya da enfeksiyon gelişmemiş insan ısırıklarında ısırık anında alınmış sürüntü örnekleri laboratuvara kabul edilmez. Tek eküvyon ile gelen örnekten çoklu istem (bakteri, mantar...) yapılmış ise klinisyen ile görüşülüp en önemli test öğrenilip, diğerlerine "örnek miktarı yetersiz" notu yazılır.

Tablo 1.3.1 Yara sürüntü örneklerinin alınması, taşınması, saklama koşulları, kabul /ret ölçütleri

Örneğin alınmasına ilişkin özellikler	Etken	Transfer özellikleri	Saklama koşulları	Kabul /ret kriterleri (Özel durumlar)
Önce debride edilmelidir. Yara yerindeki tüm yüzeysel eksüda SF ile temizlenir. Lezyon kuru ise eküvyon SF ile nemlendirilir. Enfekte bölgeye sürülen eküvyon kendi etrafında 5 kez döndürülerek örnek alınır.	Aerobik bakteriler	Transport besiyerinde, oda sıcaklığı, ≤ 2 saat	≤ 24 saat Oda sıcaklığı	Örnek <i>Mycobacterium</i> spp kültürü için alınmış ise, Travma sonrası ilk 48 saat içinde alınmış ise, İnsan ısırtıklarında ısırtık anında alınmış ise örnek reddedilir.
	Anaerobik bakteriler	Anaerop taşıma sistemi, oda sıcaklığında ≤ 2 saat	Anaerop taşıma sisteminde, oda sıcaklığında saklanmalı	
	Mantar	Transport besiyeri veya steril örnek kabı, oda sıcaklığında ≤ 2 saat	Oda sıcaklığında	

1.3.2.Sürüntü örneklerinin işlenmesi ve iş akışı

Kültür ve gram boyama için en az iki eküvyon ile örnek alınmalıdır. Test istemine göre eküvyon sayısı artırılabilir. Eğer örnek tek eküvyon ile gelmiş ise ve anaerobik kültür de yapılacaksa önce anaerobik plaklara ekim yapılmalıdır. Eküvyon 1-2 ml serum fizyolojik veya sıvı besiyerine konulup, vortekslelendikten sonra besiyerlerine ekim yapılır, sonra Gram boyama için preparat hazırlanır. Yara sürüntü örneklerinin ekilebileceği besiyerleri, inkübasyon koşulları ve değerlendirme kriterleri Tablo 1.3.2.'de sunulmuştur.

Tablo 1.3.2 Yara sürüntü örneklerinin işlenmesi ve iş akışı

Kültür						
Üremesi beklenen mikroorganizma	Standart besiyeri	İnkübasyon			Değerlendirme sıklığı	Önerilen asgari düzeyde tanımlama
		Sıcaklık (°C)	Atmosfer	Süre		
A,B,C ve G grubu beta hemolitik streptokoklar	KKA	35-37	%5 CO ₂	24-48 saat	24. saat 24 saatte üreme olmamış ise 48. saat	Lancefield grubu düzeyinde
<i>S. aureus</i>	KKA	35-37	%5 CO ₂	16-24 saat	24. saat 24 saatte üreme olmamış ise 48. saat	Tür düzeyinde

<i>N. gonorrhoeae</i>	Çikolata agar, Thayer Martin veya GC selektif agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	48. saatte	Tür düzeyinde
<i>H. influenzae</i>	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	24. saat 24 saatte üreme olmamış ise 48. saat	Tür düzeyinde
HACEK*	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	5 gün	48. saat ve 5.gün	Tür düzeyinde
<i>Nocardia</i> ve aerobik aktinomiçesler	KKA, çikolata agar, BCYE agar (Thayer Martin agar)	35, (BCYE agar 30)	Aerop	En az 2 hafta	İlk hafta süresince her gün, sonra 14.gün	Cins düzeyinde
<i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i>	Sistin tellüritli kanlı agar, Tinsdale agar, fosfomisin ve glikoz 6 fosfat içeren kanlı agar	35-37	Aerop	48 saat	24. saat 24 saatte üreme olmamış ise 48. saat	Tür düzeyinde
<i>P. aeruginosa</i>	Mac Conkey agar	35-37	Aerop	16-24 saat	24. saat	Tür düzeyinde
<i>Enterobacteriaceae</i>	Mac Conkey agar	35-37	Aerop	16-24 saat	24. saat	
<i>Chromobacterium</i>	Mac Conkey agar	35-37	Aerop	16-24 saat	24. saat	Tür düzeyinde
<i>Aeromonas</i>	KKA, Mac Conkey agar, CIN	35-37	Aerop	16-24 saat	24. saat	Tür düzeyinde
<i>Vibrio</i>	TCBS, KKA	35-37	Aerop	16-24 saat	24. saat	Tür düzeyinde
Anaerobik kok ve basiller	Sürüntü için: Anaerobik kanlı agar (CDC anaerop kanlı agar veya Brucella kanlı agar), KVLB agar Brucella kanlı agar Neomisin vankomisin selektif agar, Fenil etil alkollü agar, KVLB, THIO	35-37	Anaerop	5-7 gün	48. saatte ve 5. gün ve 7.gün	Tür düzeyinde
<i>Candida</i> türleri	SDA	35-37	Aerop	5 gün	48. saat ve 5.gün	Tür düzeyinde
<i>Actinomyces</i> türleri	Anaerobik kanlı agar (Kvitamini ve hemini içeren)	35-37	Anaerop	5-7 gün	48. saat ve 5.gün ve 7. gün	Tür düzeyinde

*HACEK: *Haemophilus* spp, *Actinobacillus* spp, *Capnocytophaga* spp, *Eikenella* *corrodens*, *Kingella* spp

1.3.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

Yara sürüntü kültürlerinin değerlendirilmesinde, sürüntü örneğinin niteliği önemlidir. Geleneksel olarak gram boyalı preparatta lökosit görülmesine karşın yassı epitel hücresi az sayıda olan veya mevcut olmayanlar ya da steril bölgeden alınmış olan örnekler değerli kabul edilir. Bu örneklerin kültürlerinde direkt boyalı preparatta gözlenen bakteri morfolojisi ile uyumlu potansiyel patojenlerin üremesi durumunda, üreyen ≤ 3 farklı potansiyel patojen mikroorganizma etken kabul edilerek tanımlama ve duyarlılık testleri yapılır.

Bağışık yetmezliği veya diyabeti olan hastalarda, açık yaradan alınan örneklerin gram yöntemiyle incelenmesinde lökosit görülenler kaliteli örnek olarak değerlendirilir. Eğer örnekte lökosit yok, orta ya da çok sayıda yassı epitel hücresi var, klinik bulgular enfeksiyonla uyumlu değil ise bu örnekler değerli kabul edilmez. Bu durumda kültürde >3 farklı mikroorganizma üremesi varsa tanımlama ve duyarlılık testi yapılmayıp 'Karışık flora elemanları üredi' şeklinde raporlanır.

Yara sürüntü örneklerinin kültür ve mikroskopik incelemelerinin değerlendirilmesi ve raporlanması Tablo 1.3.3'de özetlenmektedir.

Tablo 1.3.3 Yara sürüntü örneklerinin sonuçlarının değerlendirilmesi ve raporlanması

Üreyen mikroorganizma	Değerlendirme	Rapor
<i>S. pyogenes</i>	Sayı ne olursa olsun bildirmeli	<i>S. pyogenes</i> üredi
<i>S. agalactiae</i>	Sayı ne olursa olsun bildirmeli	<i>S. agalactiae</i> üredi
Grup C, G streptokoklar	Sayı ne olursa olsun bildirmeli	Grup C streptokok veya Grup G streptokok üredi
<i>S. aureus</i>	Sayı ne olursa olsun bildirmeli	<i>S. aureus</i> üredi
<i>P. aeruginosa</i>	Sayı ne olursa olsun bildirmeli	<i>P. aeruginosa</i> üredi
<i>C. perfringens</i>	Sayı ne olursa olsun bildirmeli	<i>C. perfringens</i> üredi
<i>B. anthracis</i>	Sayı ne olursa olsun bildirmeli	<i>B. anthracis</i>
KNS	1. Ancak invazif örneklerde tek tip mikroorganizma izole edildi ise, tekrarlayan üreme varsa, örnek kaliteli ise, direkt yaymada PNL varsa klinisyenle görüş alışverişi yapılarak raporlanır. 2. Çok sayıda epitel hücresi varsa veya kültürde karışık üreme varsa	1. Koagülaz negatif stafilokok üredi 2. Normal deri flora elemanları üredi
Viridans streptokoklar veya enterokoklar	1. İnvazif örneklerde, tek veya baskın mikroorganizma ya da PNL çok ise cins düzeyinde raporlanır. 2. Karışık kültürlerde veya baskın üreme yoksa	1. Viridans grup streptokok üredi <i>Enterococcus</i> spp üredi. 2. Normal deri flora elemanları üredi
Gram pozitif basil	1. <i>Listeria</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>C. diphtheria</i> , <i>C. ulcerans</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Actinomyces</i> tanımlanır. 2. Yukarıda belirtilen mikroorganizmaların dışındaki gram pozitif basiller genellikle cilt kontaminasyonudur. İnvazif örneklerde, tek veya baskın mikroorganizma ya da PNL çok ise cins düzeyinde raporlanır. Bu özellikleri taşııyorsa	1. <i>Listeria</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>C. diphtheria</i> , <i>C. ulcerans</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Actinomyces</i> üredi 2. Normal deri flora elemanları üredi

<i>Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia</i> spp	Abdominal apselerden alınan örneklerde bildirilmeli	<i>Salmonella</i> üredi. <i>Shigella</i> üredi. <i>Campylobacter</i> üredi. <i>Yersinia</i> spp üredi.
<i>Enterobacteriaceae</i> ailesi	Baskın veya orta-çok sayıda ürediyse; Sadece 1 veya 2 tür üredi veya baskınsa ve yayma enfeksiyonu destekliyorsa	Ör: <i>E. coli</i> üredi
<i>Enterobacteriaceae</i> ailesi	Az sayıda ve baskın değilse veya 2'den fazla tür varsa	Karışık gastrointestinal sistem florası üredi
<i>Brucella, Haemophilus, Pasteurella, Francisella</i>	Sayı ne olursa olsun bildirilir	<i>Brucella</i> üredi, <i>Haemophilus</i> üredi, <i>Pasteurella</i> üredi, <i>Francisella</i> üredi
<i>Aeromonas, Vibrio, Candida</i>	Sayı ne olursa olsun bildirilir Baskın şekilde ulaşılmış ise	<i>Aeromonas</i> üredi, <i>Vibrio</i> üredi C.albicans tür düzeyinde raporlanır.

Yara sürüntü örneklerinin kültür sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer ölçüt ise Q skoru'dur. Q skorunun değerlendirme ölçütleri Tablo 1,3,4'de sunulmaktadır. Genel kavram olarak bu skorlama sonucunda kaliteli örnekte en fazla 3 farklı potansiyel patojen üremesi olduğunda tanımlama ve duyarlılık testleri yapılır. Düşük kaliteli örnekte ise 3 ten daha az sayıdaki mikroorganizma tanımlanır.

Tablo 1.3.4 Q Skorlama ölçütleri

		Yassı Epitel Hücresi				
		Hücre sayısı X10 her alanda	1-9	10-24	≥25	
		Skor	0	-1	-2	-3
Nötrofil	Hücre sayısı X10 her alanda	0	3	0	0	0
	1-9	+1	3	0	0	0
	10-24	+2	3	1	0	0
	≥25	+3	3	2	1	0

Değerlendirme sonucunda Q skoru sıfır bulunduğu üreyen bakterilere tanımlama yapılmaz. Q skor 1'de üreyen en fazla bir, Q Skor 2'de en fazla iki farklı, Q Skor 3'de ise en fazla üç farklı bakteri tanımlanır. Q skoru, kültürde üreyen farklı potansiyel patojen sayısından büyük ise üreyen etkenlerin hepsi tanımlanır ve antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılır. Eğer Q skoru, kültürde üreyen potansiyel patojen sayısından küçük ise tanımlama ve duyarlılık testi açısından karar vermek için gram boyalı preparata bakılır. Kültürde üreyip Gram boyalı preparattada görülebilen tüm potansiyel patojenlere tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılırken, görülemeyenler sadece tanımlanır.

1.4. Apse ve aspirat örnekleri (Aspirat örneği)

Tablo 1.4.1. Apseler örneklerinde enfeksiyonlara göre olası etkenler

Tanı amacıyla apse örneklerinin incelendiği enfeksiyon tabloları ve bunlarda olası etken mikroorganizmalar Tablo 6'da sunulmaktadır.

Tablo 1.4.1 Apseler örneklerinde enfeksiyonlara göre olası etkenler

Enfeksiyon	Olası etkenler
Fronkül	<i>S. aureus</i>
Karbonkül	<i>S. aureus</i>
Deri apsesi (Koltuk altı, aronişi, meme, el, baş, boyun, gövde)	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Propionibacterium</i> spp, <i>Peptostreptococcus</i> spp, <i>Candida</i> spp
Deri apsesi (Perineal, vulvovaginal, skrotal, perianal, kalça)	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Propionibacterium</i> spp, <i>Peptostreptococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp.
Deri apsesi (İntravenöz ilaç kullanıcıları)	Oral streptokoklar, <i>Streptococcus anginosus</i> group, <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella</i> spp, <i>Porphyromonas</i> spp, <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium</i> spp, <i>Candida</i> spp
Yumuşak doku apsesi	<i>Pasteurella</i> , <i>Actinobacillus</i> spp, <i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Cardiobacterium</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Kingella species</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Candida</i> , Küf mantarı
Diş apsesi	Alfa hemolitik Streptokoklar, Anaerobik Gr(-) basiller, Anaerobik Streptokoklar, <i>S. anginosus</i> group, <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , Spiroketler, <i>Actinomyces</i> spp
Perirektal apse	Anaerob bakteriler, <i>Enterobacteriaceae</i> , Streptokoklar, <i>S. aureus</i>
Pilonidal apse	Anaerob bakteriler, <i>Enterobacteriaceae</i> , Beta hemolitik Streptokoklar, <i>S. aureus</i>
Psoas apsesi	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacteroides</i> spp, <i>S. aureus</i> , Streptokoklar, <i>M. tuberculosis</i>
Baş saçlı derisi apsesi	Anaerob bakteriler, Beta hemolitik Streptokoklar, <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , Enterokoklar, KNS, Dermatofitler, Kandidalar

1.4.2. Apseler ve aspirat örneklerinin alınması, taşınması, kabul/ veya ret ölçütleri

Cerrahi işlem ile alınan dokular ve enjektör ile alınan aspirasyon örnekleri mikrobiyolojik kültür için en değerli örneklerdir.

Bütünlüğü bozulmuş deriden alınan apse örneklerinin değerlendirilmesi, bu tür alanlarda çok sayıda mikroorganizmanın kolonize olmasından dolayı zordur.

Örnek almadan önce yapılacak cilt temizliği kontaminasyon riskini azaltır.

Aspirasyon örneği alınmadan önce %2 klorheksidin veya %10 povidon iyot ve arkasından %70 alkol ile cilt temizliği yapılmalıdır.

Mikrobiyolojik inceleme için pürülan materyalin enjektör ile aspire edilerek alınması anlamlı sonuç elde edilmesi için önemlidir.

Örneğin biyopsi ya da aspirasyonla alınamadığı durumlarda, lezyonun dip kısmındaki eksudadan eküvyon ile örnek alınabilir. Eküvyon ile alınan örnekler mikrobiyolojik inceleme açısından değeri düşük örneklerdir.

1.4.2.1. Örnek alınması:

Örnekler antimikrobik tedavi başlanmadan önce alınmalıdır.

Sürüntü örnekleri dışındaki örnekler sızdırmaz taşıyıcı kaplar içerisinde taşınmalıdır.

Örnek sayısı ve örnek alma sıklığı hastanın klinik durumuna göre belirlenmelidir.

1.4.2.1.1. Kapalı apse

- * Apseler içeriği bir enjektör yardımıyla aspire edilir.
- * Aspirasyonla yeterli miktarda örnek alınamıyorsa, apsenin içine steril SF enjekte edilebilir ve daha sonra aspirasyon işlemi tekrarlanır.
- * İdeal olarak en az 1mL püy örneği alınmalıdır.

1.4.2.1.2. Püy

- * Lezyonun en derin bölgesinden püy veya eksuda steril enjektör ile aspire edilir.
- * Drenaj ya da eksizyon sonrası lezyonun tabanından biyopsi örneği alınır.

1.4.2.1.3. Sürüntü örneği

- * Doku ya da aspirasyon materyali alınmadığında kullanılır.
- * Yüzeysel ölü dokular steril SF ile yıkanarak uzaklaştırılır.
- * Yara yüzeyi çok kuruyorsa steril SF ile nemlendirilmiş iki adet eküvyon ile örnek alınır.
- * Püy yada inflamasyonlu bölge üzerinde beş kez döndürülerek örnek alınır.
- * Eküvyonla alınan örneklerde, materyal eküvyona iyice emdirilmelidir.
- * Eküvyonla alınan sürüntü örnekleri anaerobik kültür için uygun değildir.

1.4.2.2. Örneklerin taşınması

- * Sürüntü örnekleri dışındaki örnekler sızdırmaz taşıyıcı kaplar içerisinde taşınmalıdır.
- * Aksi belirtilmedikçe bakteri ve mantar kültürü için alınan sürüntü örnekleri kömür tozlu Amies taşıma besiyerinde taşınmalıdır.
- * Anaerobik kültür için alınan örnekler dış ortamla olabildiğince az temas edecek şekilde, en kısa sürede ve mümkünse anaerop taşıma besiyerinde laboratuvara gönderilmelidir. Taşıma besiyeri olarak Cary-Blair besiyeri, içinin havası boşaltılarak N, CO₂ ve H gaz karışımı içeren tüpler de kullanılabilir. Enjektörle alınmış apse içeriği, enjektör içindeki hava çıkarıldıktan sonra enjektörün ucu hava geçirmeyecek şekilde kapatılarak laboratuvara gönderilebilir.
- * Örneklerin mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılması ve işleme alınması gerekmektedir.
- * Aspirasyon ve doku örneklerinin 30 dakika içinde laboratuvara ulaştırılması idealdir.
- * Örnek miktarı, kabul edilebilir taşıma süresini etkiler. Büyük hacimli pürülan materyallerde anaerop mikroorganizmalardaha uzun süre canlı kalabilirler.
- * Örneklerin işleme alınmasında gecikme olarsa örnekler oda sıcaklığında bekletilir, buzdolabına konulmaz. Düşük sıcaklıklarda oksijen daha iyi çözündüğünden anaeroplara zarar görebilir.

1.4.2.3. Ret Ölçütleri

- * Taşıma kabı hasar gördüğü için sterilitesi bozulmuş veya kabın dışına sızmış,
- * Önerilen süre içerisinde ve uygun sıcaklıkta gönderilmemiş,
- * Örnek tüpü veya kabının üzerinde hasta bilgileri yazılı olmayan,
- * Hastaya ait uygun bir istek formu düzenlenmemiş,
- * Formalin içine konulan örnekler, mikrobiyolojik inceleme için uygun değildir.
- * Polimorfonükleer hücrelerin varlığı enflamasyon belirtisi olarak önemlidir. Gram boyama ile çok sayıda epitel hücresi görülmüşse yüzey kontaminasyonunu düşündürür ve kültür sonucunun güvenilirliğini azaltır. Özellikle eküvyon ile alınan örneklerde çok sayıda epitel hücresi görüldüğünde inceleme için yeni bir örnek istenir.
- * Taşıma besiyeri içerisinde olmayan eküvyonlardaki örneklerin transferi bir saati geçmişse reddedilir.

1.4.3. Apse örneklerinin işlenmesi ve iş akışı

1.4.3.1. Örneklerin işlenmesi

1.4.3.1.1. Pü

Pü ya da santrifüj edilmiş materyalden steril bir pipet yardımıyla besiyerine bir miktar damlatılır. Farklı kolonilerin saptanabilmesi için steril öze ile örnek yayılır ya da azaltma ekimi yapılır.

1.4.3.1.2. Sürüntü örnekleri

Agar yüzeyine eküvyon yardımıyla inoküle edilir.

Farklı kolonilerin saptanabilmesi için steril öze ile örnek yayılır ya da azaltma ekimi yapılır.

1.4.3.2. Besiyerleri ve inkübasyon koşulları

Apse ve aspirat örneklerinde üremesi beklenen mikroorganizmalara göre kullanılması önerilen besiyerleri, inkübasyon koşulları ile tanımlama düzeyi Tablo 1.4.3'de sunulmaktadır.

Tablo 1.4.3 Pü örneğinde kültür için kullanılan besiyerleri, inkübasyon koşulları ve değerlendirme

Hedef mikroorganizma	Besiyeri	İnkübasyon			Değerlendirme sıklığı	Önerilen asgari düzeyde tanımlama
		Sıcaklık (°C)	Atmosfer	Zaman		
<i>S aureus</i>	Kanlı agar	35-37	%5 CO ₂	24-48 saat	24., 48. saat	Tür düzeyinde
Streptokoklar Enterokoklar						Lancefield grubu düzeyinde
<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Acinetobacter spp</i>	EMB MacConkey	35-37	Aerobik	16-24 saat	>16 saat	Tür düzeyinde
<i>H. influenza</i>	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	>40 saat	Tür düzeyinde
HACEK*	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	5 gün	48. saat, 5. gün	Tür düzeyinde
<i>Anaeroplara</i>	CDC Anaerobik kanlı agar, Brucella kanlı agar, Beyin kalp infüzyon agar** THIO, Glikozlu kıymalı buyyon *** Neomisin vankomisin selektif agar, Fenil etil alkollü agar ****	35-37	Anaerobik	5-7 gün	48. saat, 5. gün, 7. gün	Tür düzeyinde
<i>Actinomyces spp</i>	Metronidazol ve nalidiksik asit eklenmiş kanlı agar	35-37	Anaerobik	10 gün	48. saat, 7. gün, 10. gün	Tür düzeyinde
<i>Nocardia spp</i>	Kanlı agar	35-37	Aerobik	7 gün	3. ve 7. gün	Tür düzeyinde
Mantar etkenleri	SDA	35-37	Aerobik	5 gün	>40 saat	Tür düzeyinde

*HACEK: *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*. ** Bu besiyerlerine %5 koyun kanı, hemin, K1 vitamini ve L-sistein ilave edilmelidir.*** Sıvı besiyerinde oluşan üremelerden uygun besiyerlerine subkültür yapılır.**** Kullanılacak besiyerinin taze hazırlanmış olması gereklidir, buzdolabında bekletilen besiyerinde anaerob bakterilerin izole edilmesi mümkün değildir.

1.4.4. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

1.4.4.1. Gram boyama

Gram boyama sonuçları mümkün olan en kısa sürede raporlanır. Kritik bölgelerden alınan örneklerin 1 saat içerisinde raporlanması idealdir.

Lökositler ve saptanan mikroorganizmalar raporlanmalıdır.

1.4.4.2. Kültür

Floralı bölgelerden alınan örneklerde, klinik olarak anlamlı olan üremeler raporlanır.

Aspirat, biyopsi, steril sıvı örneklerinde üreyen tüm mikroorganizmalar raporlanır.

Üreme saptanmaz ise "..... günde üreme olmadı" şeklinde raporlanır.

1.4.4.3. Raporlama süresi

Acil bildirilmesi gereken mikroorganizma varlığında telefon ve elektronik raporlama ile hemen bilgi verilmelidir.

Yazılı raporlar 16-72 saat içerisinde sonuçlanmıyorsa ön rapor olarak verilerek, daha sonra kesin rapor düzenlenebilir.

1.5. Doku ve biyopsi örnekleri

Deride bulunan açık yaralar, derinin mikrobiyotası veya çevre mikroorganizmaları tarafından kolonize olur. Gerçek enfeksiyon etkeninin belirlenebilmesi için yara yüzeyini kaplayan organizma topluluğunun uzaklaştırılması ve dip kısımdan doku biyopsi örneğinin alınıp işlenmesi gerekir.

1.5.1. Doku ve biyopsi örneklerinin alınması, taşınması, Kabul/ ret ölçütleri

1.5.1.1. Örneklerin alınması, taşınması

- * Yara, bol miktarda steril SF ve steril gazlı bezle (bez sık sık değiştirilerek) yıkanır.
- * Yüzeydeki ölü doku uzaklaştırılır.
- * Yara yatağından kazıntı örneği veya bistüri ile doku parçası alınır.
- * Örneğin yara kenarıyla sağlam dokunun birleştiği yerden alınmış olması tercih edilir.
- * Doku parçaları 3 ile 4mm büyüklüğünde olmalıdır. Nekrotik doku ile bulaş olmamalıdır.
- * Küçük doku parçaları anaerop taşıma kabı içinde laboratuvara gönderilmelidir. Büyük miktardaki örnekler, tabanı ıslak steril gazlıbez ile döşenmiş, ağız kapaklı steril kaplar içinde nakledilebilir.
- * Örnekler 30 dakika içinde laboratuvara ulaştırılmış olmalıdır.

1.5.1.2. Örneklerin kabul veya ret kriterleri

- * Taşıma kabı hasar gördüğü için sterilitesi bozulmuş veya kabın dışına sızmış,
- * Önerilen süre içerisinde ve uygun sıcaklıkta gönderilmemiş,
- * Örnek tüpü veya kabının üzerinde hasta bilgileri yazılı olmayan,
- * Hastaya ait uygun bir istek formu düzenlenmemiş,
- * Formalin içine konulan örnekler reddedilir.

1.5.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı

- * Doku parçaları steril bir havan içine konur, önce steril bir bistüri ile parçalara ayrılır, ardından yaklaşık 1 ml sıvı besiyeri eklenerek örnek ezilir.
- * Homojen hale getirilen örnekler, aerop ve anaerob kültür yönünden işleme alınır, Tablo 1.3.2’de yer verilen katı besiyerlerine steril pipet ile 2-3’er damla (pürülan örnekten 1’er damla) damlatılarak, artanı ise tiyoglukolatlı sıvı besiyerinin orta veya dip kısmına bırakılarak ekilir.
- * Enfeksiyon genellikle çok sayıda karışık bakterilerce oluşturulmaktadır, bu nedenle katı besiyerine damlatılan örnekler azaltma yöntemiyle ekilmelidir.
- * Plaklar uygun atmosfer koşullarında, yeterli süre inkübe edilmelidir (Tablo 1.3.2).
- * Besiyerlerine ekimi takiben, örneklerden birer damla lama sürülerek preparat hazırlanır.

1.5.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

1.5.3.1. Gram boyama

- * Hazırlanan preparatlar Gram yöntemiyle boyanarak incelenmelidir. Mikroskopik incelemede, var olan mikroorganizmaların boyanma özellikleri, şekilleri ve kaç tür mikroorganizmanın bulunduğu, lökositlerin olup olmadığı belirtilmelidir.



Metanolla tespit edilen preparatların, ısıyla tespit edilenlere göre daha iyi görüntü verdikleri bilinmektedir.

1.5.3.2. Kültür

- * Uygun alınmış ve uygun şekilde laboratuvara gönderilmiş örneklerde üreyen aerop bakteriler tür düzeyinde, anaerob bakteriler cins düzeyinde tanımlanmalıdır. (Tablo 1.3.3)
- * Mikroskop görüntüsünde çok sayıda lökosit ve bakteri bulunan, baskın olarak saf kültür halinde üreyen *S. aureus*, gram negatif basillere ve enterokoklara antibiyotik duyarlılık testi yapılmalıdır.
- * Kültürde karışık üreme varsa, bu bakterilerden biri baskın şekilde ürememiş ise minimal tanımlama testleri uygulanmalıdır. Örneğin Gram boyamasında çok sayıda epitel hücresi varsa ve kültürde karışık üreme var ise normal cilt florası şeklinde rapor edilmelidir.
- * Üreme saptanmaz ise “..... günde üreme olmadı” şeklinde raporlanır.

Tablo 1.5.3. Yara örneklerinin sonuçlarının değerlendirilmesi ve raporlanması

1.5.3.3. Raporlama süresi

Acil bildirilmesi gereken mikroorganizma varlığında telefon ve elektronik raporlama ile hemen bilgi verilmelidir.

Yazılı raporlar 16-72 saat içerisinde sonuçlanmıyorsa ön rapor olarak verilerek, daha sonra kesin rapor düzenlenebilir.

1.6. Dermatomikozlarda tanı amaçlı alınması gereken örnekler ve olası etkenler

Tüm mantar enfeksiyonları arasında en sık görüleni yüzeysel mantar enfeksiyonlarıdır. Bu enfeksiyonlar derinin en dış tabakaları, tırnak ve kıl gibi keratinize dokuları etkilerler ve diğer enfeksiyonların aksine invazyona ve hayatı tehdit eden sistemik yayılıma neden olmazlar. Etkenler sıklıkla dermatofitler, çeşitli maya ve küf mantarlarıdır (Tablo 1.6). Dermatofitler, sadece yüzeysel enfeksiyonlara neden olan keratinofilik ve keratinolitik mantarlardır ve ılıman iklimlerde tüm mantar enfeksiyonlarının yaklaşık %75’inden sorumludurlar.

Dermatomikozda etkenin tanısı için alınan örnekler, bu örneklerde etken olması beklenen mantarlar Tablo 1.6'da sunulmaktadır.

Tablo 1.6. Dermatomikozlarda tanı amaçlı alınan örneklerde olası etkenler

Örnek türü	Olası etkenler
Saç, deri ve tırnak kazıntı örnekleri	Dermatofitler: <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton</i> spp, <i>Microsporum</i> spp, Maya ve maya benzerleri: <i>Candida</i> spp, <i>Malassezia</i> spp, <i>Trichosporon</i> spp
	Maya mantarları: <i>Candida</i> spp, <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichosporon</i> spp, <i>Geotrichum</i> spp, <i>Malassezia</i> spp
	Küf mantarları: <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Zygomycetes</i>
Doku/Biyopsi/Aspirat	Esmer (Dematisiyöz) mantarlar: <i>Scedosporium</i> , <i>Pseudallescheria</i> spp, <i>Exophiala</i> spp, <i>Cladosporium</i> spp, <i>Phialophora</i> spp, <i>Alternaria</i> spp, <i>Bipolaris</i> spp Dimorfik mantarlar: <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

Maya mantarları fırsatçı patojenlerdir ve vücut savunma mekanizmalarında meydana gelen olumsuz değişiklikler sonucu invaziv enfeksiyonlara neden olabilirler. Bununla birlikte başta *Candida albicans* olmak üzere, çeşitli maya mantarları cilt, tırnak ve mukozalardaki yüzeysel enfeksiyonlardan da izole edilebilirler. Ciltte kommensal olarak bulunan *Malassezia furfur*, lipofilik bir maya mantarıdır ve derinin sadece stratum corneum katmanını tutan "Tinea versicolor"a neden olabilir. Piedra; saç, sakal, bıyık, koltuk altı ya da kasık kıllarını tutan yüzeysel nodüler bir mantar enfeksiyonudur. Koyu renkli nodüller siyah piedra adını alır ve etken *Piedra hortae*'dir. Açık renkli nodüller ise beyaz piedra adını alır ve etken *Trichosporon beigelii* ve *Trichosporon* cinsinde yer alan diğer maya mantarlarıdır. Dermatofitler dışındaki küf mantarları doğada yaygın bulunurlar ve yüzeysel enfeksiyon etkeni olarak izole edilmeleri son derece nadirdir.

1.6.1. Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Direkt mikroskopik inceleme ve kültür için yetecek miktarda örnek alınmalıdır. Örneklerin alınması, yüzeysel ve kutanöz mantar enfeksiyonlarının tanısında kritik bir evredir. Doğru mikolojik tanı, ancak uygun şekilde alınmış klinik örneklerle mümkündür. Kontaminasyonu önleyebilmek amacıyla steril malzemeler kullanılmalı ve aseptik yöntemler uygulanmalıdır. Ayrıca hastanın adı, yaşı, cinsiyeti, etnik kökeni gibi standart bilgilerin yanısıra, yakın zamanda deniz aşırı seyahat varlığı, hayvan teması ya da bazı spor aktivitelerine katılım gibi bilgiler de tanıda önemli olabilir.

Saç ve saçlı deri örneklerinin alınması sırasında, tercihen Wood lambası altında, tüm saçlı deri incelenerek enfekte alan tespit edilir, en az 10 saç kökü ve varsa kabuklar penset yardımıyla çekilerek toplanır. İşlem öncesi cilt antiseptisi gerekmez. Steril bir diş fırçası ya da küçük bir tarakla elde edilecek saçlı deri kazıntı örneği de kültür için iyi bir materyaldir. Favus varlığında ise saç follikülü üzerindeki skutulum kültür ve direkt mikroskopi için uygundur. Piedrada nodüllü birkaç saç teli kesilerek alınır.

Deri örneklerinin alınmasında, bakteri kontaminasyonunu önlemek için işlem öncesi enfekte cilt %70 alkol ile dezenfekte edilir ve aktif enfeksiyonun bulunduğu, lezyonun sınır bölgesinden bistüri, lam ya da bir dermal küret yardımıyla kazınarak örnek alınır. Veziküler lezyonlarda vezikül tepesinin steril bir makasla kesilerek alınması önerilmektedir. Vezikül sıvısı ise kültür ve mikroskopi için uygun bir örnek değildir.

Onikomikoz, en sık (>%50) görülen tırnak hastalığıdır ve dermatofitler (tinea unguium), küf mantarları ve mayalar tarafından oluşturulmuş tırnak enfeksiyonlarını içerir. Onikomikozlar klinik olarak tırnakları etkiledikleri bölgelere göre distal ve lateral subungual onikomikoz, yüzeysel beyaz onikomikoz, proksimal subungual onikomikoz, endonyx onikomikoz ve total distrofik onikomikoz olarak sınıflandırılmaktadır. Onikomikozda genel bir kural olarak, örnekler etkilenen tırnağın en proksimalindeki lezyon bölgesinden alınmalıdır. Lezyonun aktif zonu, enfekte alanın sağlıklı doku ile birleştiği kenar bölgeleri olduğundan, örnekleme bu kısımlardan ve yeterli miktarda yapılmalıdır. Ayrıca mikolojik incelemenin etkinliğinin artırılması için lokal ya da sistemik antifungal tedavi başlanmadan önce örnek alınmalı ve işlem öncesi tırnaklar %70 alkol ile temizlenmelidir.

Enfekte tırnaklardan örnek alma yöntemi onikomikozun klinik tipine göre farklılık gösterebilir.

- * Distal subungual onikomikozda tırnaklar kesildikten sonra, küçük bir küret ya da bisturi yardımıyla tırnak yatağından, buradaki sarı-beyaz kırılmalı keratin artıklarından ve olabildiğince proksimalden kazınarak alınmalıdır.



Canlı mantar hücreleri sadece tırnak yatağı yakınından alınan örneklerde bulunur. Bu nedenle tırnak plağından alınan örnekler distal subungual onikomikoz tanısı için uygun değildir.

- * Proksimal subungual onikomikozda tırnağın enfekte alt katmanlarına ulaşabilmek için, sağlıklı üst katmanlar soyulmalıdır. Örnekler proksimal tırnak yatağının lunulaya en yakın kısmından, lezyon içinden alınmalıdır.
- * Yüzeysel beyaz onikomikozda, enfekte materyal tırnak plağının yüzeyindeki beyaz alanlardan kazınarak alınmalıdır. Ancak, kontaminasyonu önlemek amacıyla örnekleme öncesinde tırnağın alkolle temizlenmesi önemlidir.

Örnekler alınır alınmaz hasta başında uygun besiyerlerine inokülasyonu yapılmalı ya da temiz kuru bir kağıt zarf içinde (kuru haldeki deri kazıntısı, saç ve tırnak örnekleri için) veya temiz iki lam arasında bantlanarak (özellikle tinea pediste parmak aralarından alınan nemli/ıslak örnekler için) özel lam taşıma kabı içinde ve mümkün olduğunca kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Örnekler birkaç saat içinde işleme alınamayacaksa oda ısısında bekletilmelidir. Kuru haldeki deri, saç ve tırnak örneklerinde bulunan dermatofitler, oda ısısında günlerce canlılıklarını kaybetmeden saklanabilirler.

Tüpler, nemi tutarak kontaminan bakterilerin aşırı üremesine neden olacağından, plastik petri kapları ise küçük kırıntıların duvarlara yapışmasına neden olacağından dolayı dermatolojik örneklerin alınmasında ve taşınmasında önerilmezler. Dermatomikoz tanısı için örneklerin alınması, transferi, kabul ve ret kriterleri Tablo 1.6.1'de sunulmaktadır. Örnekler iki saat içinde işleme alınamayacaksa oda sıcaklığında en fazla 4 saat bekletilebilir.

Tablo 1.6.1. Dermatomikoz tanısı için örneklerin alınması, taşınması, kabul / ret ölçütleri

Örnek türü	Örneğin alınmasına ilişkin özellikler	Etken	Taşınma özellikleri	Özel durumlar
Deri	Bakteri kontaminasyonunu önlemek için işlem öncesi cilt %70 alkol ile dezenfekte edilir ve aktif enfeksiyonun bulunduğu, lezyonun sınır bölgesinden bisturi, lam ya da bir dermal küret yardımıyla kazınarak örnek alınır	<i>Trichophyton</i> spp, <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum</i> spp, <i>Candida</i> spp, <i>Malassezia</i> spp, <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Hortaea werneckii</i>	Temiz, sağlam ve koyu renkli bir kağıt üzerine alınıp, hasta başında ekim yapılması ya da temiz, kuru bir zarf içinde, mümkün olduğunca kısa sürede (≤ 2 sa) laboratuvara ulaştırılması en uygun olanıdır. Ayrıca temiz iki lam arasında bantlanarak veya lam taşıma kabına konularak da gönderilebilir.	Çok inflamatuvar ya da akıntılı lezyonlarda kazıntının ardından sürüntü örneği de eklenmelidir. Follikülit varlığında bir penset yardımıyla kıllar çekilerek toplanmalıdır. Çocuk hastalar ve hassas bölgeler için vinil bant ile cildi soyma şeklinde örnek alınması da önerilmekle birlikte, kültür için klasik örnekleme yöntemleri zorunludur.
Saç ve saçlı deri	Tercihen Wood lambası altında, tüm saçlı deri incelenerek enfekte alan tespit edilir, en az 10 saç kökü ve varsa kabuklar penset yardımıyla çekilerek toplanır. Steril bir diş fırçası ya da küçük bir tarakla elde edilecek saçlı deri kazıntı örneği kültür için iyi bir materyaldir. Piedrada nodüllü birkaç saç teli kesilerek alınır.	<i>Trichophyton</i> spp, <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum</i> spp, <i>Candida</i> spp, <i>Trichosporon</i> spp, <i>Piedraia hortae</i>	Hasta başında ekim yapılması ya da temiz, kuru bir zarf içinde, mümkün olduğunca kısa sürede (≤ 2 sa) laboratuvara ulaştırılması en uygun olanıdır. Ayrıca temiz iki lam arasında bantlanarak veya lam taşıma kabına konularak da gönderilebilir.	Büyük lezyonlarda örnekleme için lezyonun kenar kısımları tercih edilmelidir. İrinli enfeksiyonlarda sürüntü örnekleri de eklenmelidir. Asemptomatik taşıyıcıların saptanmasında nemlendirilmiş steril bir eküvyon ya da diş fırçası ile tüm saçlı deri ya da saçlar silinerek örnek alınabilir.
Tırnak	Bakteri kontaminasyonunu önlemek için örnekleme öncesi tırnağın %70 alkolle temizlenmesi önemlidir. Distal subungual onikomikozda tırnaklar kesildikten sonra, steril küçük bir küret ya da bisturi yardımıyla tırnak yatağındaki sarı-beyaz kırılğan keratin artıklarından ve olabildiğince proksimalden kazınarak alınır. Proksimal subungual onikomikozda tırnağın sağlıklı üst katmanları soyulup, proksimal tırnak yatağının lunulaya en yakın kısmından, lezyon içinden örnek alınır. Yüzeysel beyaz onikomikozda, enfekte materyal tırnak plağının yüzeyindeki beyaz alanlardan kazınarak alınmalıdır.	<i>Trichophyton</i> spp, <i>Microsporum</i> spp, <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Syctalidium dimidiatum</i> , <i>Acremonium</i> spp, <i>Candida</i> spp	Temiz, sağlam ve koyu renkli bir kağıt üzerine alınıp, hasta başında ekim yapılması ya da temiz, kuru bir zarf içinde, mümkün olduğunca kısa sürede (≤ 2 sa) laboratuvara ulaştırılması en uygun olanıdır. Ayrıca temiz iki lam arasında bantlanarak veya lam taşıma kabına konularak da gönderilebilir.	

1.6.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı

1.6.2.1. Mikroskopik inceleme: Örnekleme kalitesine, mikrobiyoloğun deneyim ve becerisine bağlı olarak duyarlılığı değişmekle birlikte, keratinize dokuların mantar enfeksiyonlarında en kolay, en hızlı ve en pratik inceleme yöntemi direkt mikroskopik incelemedir. Mikroskopik incelemede kullanılacak örneklerin ince olması, lam ile lamel arasında oluşabilecek hava kabarcıklarının önlenmesi açısından önemlidir. Bu nedenle inceleme öncesi iri deri ve tırnak parçaları küçük parçalar halinde kıyılmalı ya da özellikle iri tırnak parçaları steril kağıt arasında ağır bir cisimle dövülerek ezilmelidir. Piedrada saç telleri, özellikle kıl gövdelerini kısmen ya da tamamen saran nodüller seçilmelidir.

Direkt mikroskopik incelemede doku örneklerinin çözünüp ayrışması ve doku içindeki mantar elemanlarının görülebilir hale getirilmesi amacıyla yaygın olarak potasyum hidroksit (KOH) ya da sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmaktadır. Hidroksit solüsyonu, keratin içeren proteinli materyali ayrıştırarak mantar hücrelerinin görülmesini sağlar. Temiz bir lam üzerinde, 1-2 damla KOH ya da NaOH içine incelenecek örnek eklenir, üzeri lamel ile kapatılıp oda ısısında 20-30 dk ya da 37°C inkübatörde 5-10 dk bekletilerek dokuların tamamen ayrışması sağlanmalıdır. Bunun yerine hazırlanan preparat birkaç kez alevden geçirilerek de ısıtılabilir (kaynatılmamalıdır). Sıcaklık, hidroksitin etkisini arttıracaktır. Preparatın ısıtılması ya da inkübasyonu yerine KOH'e dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmesi de tercih edilebilir. Preparatın kurummasını önlemek amacıyla KOH içine gliserol eklenebilir. Ayrıca az sayıdaki mantar elemanlarının görülebilirliğini, dolayısıyla testin duyarlılığını arttırmak amacıyla, mantar hücre duvarı kitinine bağlanan ve UV ışık altında floresans veren kalkoflor beyazı (Calcofluor white) ya da Kongo kırmızısı gibi (Congo red) boyalar da kullanılabilir.

KOH ya da NaOH solüsyonu; %10-30 (wt/v) (deri örneklerinde %10-15, tırnak örneklerinde %25-30) distile su içinde

KOH + gliserol solüsyonu; %20 (v/v)'lik gliserol solüsyonu içinde %10-30 (wt/v) KOH olacak şekilde,

KOH + DMSO; Distile su ile hazırlanmış %40 (v/v)'lık DMSO solüsyonu içinde %20 (wt/v) KOH olacak şekilde,

KOH + kalkoflor beyazı; %0.1 (wt/v)'lik kalkoflor beyazı distile su içinde ya da zıt boya olarak %0.05'lik Evans mavisi ile birlikte hazırlanmalıdır. Preparattaki KOH üzerine eşit miktarda kalkoflor beyazı eklenerek önce küçük büyütme ile incelenmeli ve büyük büyütme ile doğrulanmalıdır. Gerekirse %20-40 KOH ile %0.1 kalkoflor beyazı eşit oranda karıştırılarak günlük çalışma solüsyonu da hazırlanabilir.

1.6.2.2. Kültür: Direkt mikroskopik incelemeyi tamamlayan değerli bir tanı yöntemidir. Enfeksiyon etkeninin cins ve tür düzeyinde tanımlanması ve tedavi ya da profilaksinin doğru şekilde yönetilmesi açısından zorunludur. İlk izolasyonda yaygın olarak kullanılan besiyeri antibakteriyel ilaveli (0.05 g/L kloramfenikol ve/veya gentamisin) SDA'dır (%4 glukozlu orijinal formu ya da %2 glukozlu Emmons modifikasyonu). Ancak hızlı üreyen dermatofit dışı maya ya da küflerin kontaminasyonu söz konusu olduğunda yavaş üreyen dermatofitlerin üremeleri maskeleneceğinden, besiyerine mutlaka 0.5 g/L sikloheksimit eklenmelidir. Saç örnekleri, deri ve tırnak kazıntıları bakteri ve saprofit mantar sporlarının bulunması açısından da elverişli olduklarından, sikloheksimit ilaveli ve ilavesiz SDA kültürü paralel yapılmalıdır.

Enfekte saç telleri steril bir bisturi ya da makasla yaklaşık 1 mm'lik parçalara ayrılarak besiyeri üzerine yerleştirilmelidir. Deri ve tırnak örnekleri de steril bir bisturi ya da makasla küçük parçalara ayrılarak steril bir penset yardımıyla besiyerine yerleştirilmeli ve besiyeri içine doğru üzerlerine hafifçe bastırılmalıdır. Her bir petri plağı ya da tüp besiyerine 5-15 deri/tırnak parçasının ekilmiş olması sağlanmalıdır. KOH ile muamele görmüş örnekler kültür için kullanılmamalıdır. Kültürler 25-30°C'de en az 4 hafta süreyle inkübasyona bırakılmalı ve ilk hafta her gün, sonraki haftalarda ise haftada en az iki kez üreme açısından değerlendirilmelidir.

Tinea versicolor tanısı için rutin kültür gerekmez. Ancak, atipik mikroskopik bulgular varlığında ya da araştırma çalışmaları için tam tanımlama gerektiğinde kültür yapılmalıdır. Bununla birlikte derinin normal florasında da bulunabilmesi nedeniyle, *Malassezia'* nın kültürde üretilmesi her zaman enfeksiyonu göstermeyebilir. *Malassezia* cinsinde *M. pachydermatis* dışındaki türler, üreyebilmek için eksojen lipitlere ihtiyaç duymaları nedeniyle, kloramfenikol ilaveli SDA besiyeri yüzeyinin steril zeytin yağı ile kaplanması gerekir. Genellikle makroskopik ve mikroskopik inceleme bulguları ile piedra tanısı yapılabilmekle birlikte, etkenin kesin tanımlanması için kloramfenikol ilaveli SDA besiyerinde kültür önerilir.

1.6.2.3. Moleküler testler: Geleneksel tanı yöntemleri daha uzun zaman aldıkları için yüzeysel mantar enfeksiyonlarında tedaviyi geciktirici bazı eksikliklere sahiptir. Klinik örnekteki mantar DNA'sının saptanmasına yönelik yöntemler geleneksel tanı yöntemlerine kıyasla daha hızlı ve daha duyarlı sonuçlar sağlayabilirler, ancak bu yöntemler özel ekip ve ekipman, pahalı cihaz ve kitler gerektirmektedir. Ayrıca, yüzeysel klinik örnekler fazla miktarda kontaminant içerebileceğinden, gerçek etkenle kontaminantı ayırmak açısından yetersiz kalabilirler. Klinik örnekte mantar DNA'sını saptamaya yönelik yapılmış çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, yüzeysel mantar enfeksiyonu etkenlerinin direkt olarak saptanmasına yönelik standardize edilmiş ve rutin kullanıma girmiş bir moleküler tanı yöntemi henüz bulunmamaktadır.

TASLAK

Tablo 16.2. Dermatomikoz tanısında alınan örneklerin işlenmesi

Klinik durum	Mikroskobik inceleme	Standart besiyeri	Kültür				Değerlendirme sıklığı	Olası etkenler	Değerlendirme
			İnkübasyon		Süre				
			Sıcaklık(°C)	Atmosfer					
Piedra	%10-20 KOH	SDA	25-35°C	Aerop	4 hafta	İlk hafta hergün, sonrasında haftada en az iki kez	<i>Piedra hortae</i> , <i>Trichosporon</i> spp	Kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri değerlendirilmelidir	
Tinea versicolor	%10 KOH	SDA (yüzeysel zeytin yağı ile kaplanmış) ya da modifiye Dixon agar	25-35°C	Aerop	4 hafta	İlk hafta hergün, sonrasında haftada en az iki kez	<i>Malassezia furfur</i>	Direkt mikroskobide septumlu, kısa, bazen dallanan hiflerin yanında tek hücreli yuvarlak ya da oval tomurcuklanan maya hücreleri; "spagetti ve köfte" görünümü	
Tinea nigra	%10 KOH	SDA	25-35°C	Aerop	4 hafta	İlk hafta hergün, sonrasında haftada en az iki kez	<i>Hortaea werneckii</i>	Koyu yeşil-siyah renkli, başlangıçta maya şeklinde, yaşlandıkça belirgin tüylü koloniler	
Dermatofitoz (ringworm)	%10-30 KOH	SDA (kloramfenikol ve/veya gentamisin, sikloheksimitilavelli)	25-35°C	Aerop	4 hafta	İlk hafta hergün, sonrasında haftada en az iki kez	<i>Trichophyton</i> spp, <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporum</i> spp	Koloni morfolojisi, üreme hızı, üreme sıcaklığı, mikroskobik morfoloji (laktofenol pamuk mavisi ile selofan bant preparatı, lam kültürü)	
Dermatomikoz	%10-30 KOH	SDA (sikloheksimitiz, antibiyotik ilaveli)	25-35°C	Aerop	4 hafta	İlk hafta hergün, sonrasında haftada en az iki kez	<i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Syctalidium dimidiatum</i> , <i>Acremonium</i> spp, <i>Candida</i> spp	Koloni morfolojisi, üreme hızı, üreme sıcaklığı, Mikroskobik morfoloji (laktofenol pamuk mavisi ile selofan bant preparatı, lam kültürü)	

1.6.3.Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

1.6.3.1. Direkt mikroskopik inceleme: Bir etkenin kesin tanısı tek başına direkt mikroskopik incelemedeki morfolojik özelliklere dayanarak yapılamaz. Bunun tek istisnası *Malassezia furfur*'dur; enfekte bölgeden alınan deri kazıntı örneklerinin mikroskopik incelemesinde bölmeli, kısa, bazen dallanan hiflerin yanında tek hücreli yuvarlak ya da oval tomurcuklanan maya hücrelerinin görülmesi (spagetti ve köfte) tinea versicolor açısından anlamlı kabul edilmelidir. Dermatofitlerin kültürde yavaş üremeleri nedeniyle, dermatofitlerde genellikle direkt mikroskopik inceleme sonucuna göre tedaviye başlanmaktadır. Özellikle saç ve deri örneklerindeki dermatofitlerle uyumlu mikroskopik bulgunun varlığı, klinik ile birlikte ön tanıyı koydurur. Bu nedenle örnek laboratuvara ulaştıktan sonra en geç iki iş günü içinde mikroskopik inceleme raporu sonuçlandırılmalıdır. Görülen mantar hücre miktarının bildirilmesi gerekmez, ancak miçel ya da artrokonidyum varlığı ya da yokluğu raporlanmalıdır. Ayrıca saç/saçlı deri enfeksiyonlarında endotriks ya da ektotriks tutulum bilgisinin verilmesi etkenin tahminine ve tedavinin doğru yönlendirilmesine yardımcı olabilir. Klinik önemi tam olarak bilinmese de cilt ve tırnak örneklerinde maya ve psödohip varlığı raporlanmalıdır.

1.6.3.2. Kültür: Lezyonlu deri, saç ve tırnak örneklerinin kültüründe bir dermatofit türünün üremesi, direkt mikroskopik incelemede mantar elemanlarının görülüp görülmediğine bakılmaksızın tanı koydurucu olarak kabul edilmelidir. Ancak *Microsporum cookei* ve *Trichophyton terrestre* üremesi, aksi kanıtlanamazsa kontaminant olarak değerlendirilmeli ve raporlamada "normalde patojen değil" yorumu eklenmelidir.

Deri kazıntı örneklerinden dermatofitler dışında izole edilebilecek iki küf mantarı, *Scytalidium dimidiatum* ve *S. hyalinum* üremesi durumundaki organizmalar etken olarak kabul edilebilir. *Scytalidium* türleri tırnak ya da deri kazıntı örneklerinden izole edildiğinde tür adıyla raporlama yapılır. Cins ve tür adı yazılarak "*Scytalidium dimidiatum/hyalinum* sıklıkla tırnaklarda, ayak tabanı ve avuç içlerinde dermatofitoz benzeri lezyonlara neden olur. İn vitro testlerle duyarlı bulunsa bile genellikle in vivo antifungal ilaçlara dirençlidir" şeklinde not eklenir.

Nadiren, özellikle bağışık yetmezlikli hastalarda, yüzeysel cilt tabakası dermatofitler ve *Scytalidium* spp. dışındaki küf mantarları ile kolonize olabilir. Bu olgularda, farklı zamanlarda ardışık olarak alınmış örneklerin kültürlerinde aynı mikroorganizmanın tekrar üremesi yanı sıra direkt mikroskopik incelemede üreyen mantarla uyumlu bulguların görüldüğü durumda etken oldukları doğrulanabilir.

Tırnak örneklerinden *Scytalidium* spp. izole edildiğinde yukarıdaki gibi raporlanabilir. *Scytalidium* dışındaki küf mantarları, beraberinde bir dermatofit olmaksızın, nadiren onikomikozu neden olurlar. Küflerin onikomikoz etkeni olduklarının bilimsel olarak kanıtlanması, enfekte tırnaktan birer haftalık aralarla alınmış üç farklı örneğin direkt mikroskopik incelemelerinde küf hiflerinin görülmesi ve kültürlerinde aynı küfün izolasyonu ile mümkündür.

1.7. Yanık yara enfeksiyonu

Yanık yara enfeksiyonlarında klinik bulgu ve belirtiler tanı koymada yetersizdir. Enfeksiyon varlığının ve kapsamının değerlendirilmesi için doku biyopsi örneklerinin kültürünün yapılması gereklidir. Yanık yarasında mikroorganizma yaranın her yerine eşit dağılmayabilir. Bu nedenle yanık yaralarının farklı alanlarından örnek alınmalıdır. Her iki örnek türü için de aynı bölgeden haftada iki kez örnek alınıp kantitatif kültür yapılarak bakteri kolonizasyonu izlenebilir. Sürüntü örneğinin kültür sonucu her zaman gerçek etkeni göstermeyebilir. Flora elemanları, yüzeysel kolonizasyonu gösterebilir). Ayrıca her laboratuvarında kantitatif kültür yapılamayabilir. Bu nedenle özellikle greft konması gerekli hastalarda biyopsi örneğinin kantitatif kültür yapılmalıdır.

Yanık yara enfeksiyonlarında kantitatif kültür için aljinat eküvyon ile örnek alınır. Eküvyon 5mL Ringer laktat solüsyonu içerisine konarak vortekslenir, sonra eküvyon çıkarılır. Elde edilen suspansiyonun, uygun volümde %0.85'lik NaCl ile 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} şeklinde sulandırımıları hazırlanır. Her bir dilüsyondan 0.1mL

olarak Koyun Kanlı agar veya çikolata agar ve EMB veya Mac Conkey agar besiyerlerine ekim yapılarak 35°C'de %5 CO₂'li ortamda 18-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde üreyen (30-300 arası) koloniler sayılır ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak üreyen bakteri sayısı belirlenir. Biyopsi örneğinin kantitatif kültüründe 10⁵koloni/gr anlamlı kabul edilirken eküvyonla alınan örnekte anlamlılık sınırı 10³ koloni/mL olarak ele alınır.

1.8. Şarbon

Deri Şarbonu; enfekte hayvan ya da hayvan ürünleriyle temas eden kişilerde çoğunlukla ellerde ve ön kolda ortaya çıkan ödemli, kaşıntılı, papüler (malign püstül) bir lezyondur. Lezyon daha sonra siyah bir kabuğa dönüşmesiyle karakterizedir.

1.8.1. Deri şarbonunda örneklerin alınması, taşınması ve saklanması:

Deri şarbonunun tanısı için alınacak örnekler, bu örneklerin alınması sırasında dikkat edilmesi gereken durumlar, örneklerin laboratuvara iletilmesi ile ilgili özellikler, saklama koşulları ve özel durumlarla ilgili bilgiler Tablo 1.8.1'de sunulmaktadır.

Tablo 1.8.1. Deri şarbonunun tanısı için alınacak örnekler, alınması, taşınması, saklama koşulları

Örnek türü	Örneğin alınmasına ilişkin özellikler	Transfer özellikleri	Saklama koşulları	Özel durumlar
Vezikül sıvısı	Veziküler evrede, açılmamış vezikülden steril eküvyonla alınır	Eküvyon, Stuart veya Amies taşıma besiyerinin içine konulur	≤1 saat, oda sıcaklığı >1 saat, +4°C'de	Uzun mesafe taşıma <24 saat, +4°C
Eskar dokusundan sürüntü materyali	Eskar evresinde, kabuk kaldırılmadan alttaki sızıntıdan bir pastör pipeti yardımıyla örnek alınır	Örnek Stuart veya Amies taşıma besiyerinin içine konulur	≤1 saat, oda sıcaklığı >1 saat, +4°C'de	Uzun mesafe taşıma <24 saat, +4°C

1.8.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı şeması

Tanı için alınan örneklerden öncelikle gram boyalı preparat hazırlanarak incelenir: Preparatta gram pozitif, bambu kamışı görünümünde sporlu basillerin görülmesi anlamlıdır. Kültür için KKA besiyeri kullanılır, besiyeri aerobik koşullarda 35-37°C'de 48-72 saat inkübe edilerek değerlendirilir. Üreyen bakteri tür düzeyinde tanımlanır. Mikroskopik inceleme 1-2 saat, kültür ise 2-3 gün sonunda sonuçlandırılabilir.

1.8.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

Veziküler sıvı, eskar dokusundan sürüntü materyalinin mikroskopik incelemesinde bambu kamışı görünümünde gram pozitif sporlu basillerin görülmesi ve kültürde *B. anthracis*'in üremesi "kesin tanı" koydurur. Hasta, İl Halk Sağlığı Müdürlüğüne "kesin vaka" olarak bildirilmelidir.

1.9. Lepra

1.9.1. Lepra tanısı için alınması gereken örnekler

Lepra etkeni *Mycobacterium leprae*, kültürü yapılamayan bir organizma olarak kabul edilmektedir. Lepra hastalığının tanısı genellikle oldukça tipik olan cilt lezyonları ve klinik bulgulara dayanır. Cilt lezyonlarında kaşıntı olması veya duyunun bulunması klinik olarak leprayı reddettirecek bir bulgudur. Laboratuvar tanısı için lezyonun bulunduğu bölgeden alınan biyopsi veya nazal yayma örnekleri kullanılabilir. Kültürü yapılamadığı

için tanı mikroskopik olarak konulabilir. Alınan örnekte alkol-asit dirençli boyama ile basillerin gösterilmesi tanı için yeterlidir. Bu örnekten yapılacak mikobakteri kültüründe üreme saptanmaması görülen alkol-asit dirençli basillerin *M. leprae* olduğunu bir kere daha doğrulayacaktır. Keskin bir bistüri ile alınacak deri kazıntısı, altındaki dokular ve elde edilirse sıvılardan yapılacak altı-sekiz adet yaymadan alkol-asit dirençli (Ziehl-Neelsen yöntemi) boyama yapılmalıdır.

Sonuçlar; boyalı yayma preparatın mikroskopik incelenmesinde 100x immersiyon objektifi ile değerlendirme yapılarak “bakteriyolojik indeks” (BI) Tablo 1.9.1’e göre yorumlanarak raporlanır.

Tablo 1.9.1. Lepra örneklerinde bakteriyolojik indeks

Alan sayısı	Görülen basil sayısı	Yorum (BI)
100	1	1+
10	1	2+
1	1	3+
1	10	4+
1	100	5+
1	1000	6+

1.10. Isırık yaralarında tanı için alınması gereken örnekler

Günlük yaşamda hayvan ısırıkları çok sık karşılaşılan bir durumdur. Sıklık bakımından köpek ısırıkları birinci sırada yer alır, bunu kedi ısırıkları izler. Günümüzde evde hamster, kobay gibi kemiricilerin beslenmesi nedeniyle kemiricilere bağlı ısırık yaraları görülebilmektedir. Hayvan ısırıklarına göre daha az görülse de insan ısırıkları da olabilir. Isırılan kişiler, genellikle kendileri yarayı iyileştirici uygulamalarda bulunurlar, olguların çok azı bir sağlık kuruluşuna başvurur. Isırıklardan sonra ciddi enfeksiyon ve komplikasyonlar gelişebilir. Enfeksiyonlar çoğunlukla, aerop ve anaerop mikroorganizmaların eşlik ettiği karışık bakterilerle oluşur. Buradaki mikroorganizmalar ısırılan hayvan veya insanın oral mikrobiyotasından kaynaklanır. Bunun yanı sıra, ısırık sırasında kişinin kendi deri florasından veya çevreden mikroorganizmalar yaraya inoküle olabilir. Tablo 1.10.1’de bazı hayvan veya insan ısırıkları sonrası gelişen enfeksiyonlarda olası etkenler verilmiştir.

Isırıklara bağlı yaralanmalar, delinme, parçalanma, laserasyon, ezilme ve kopma şeklinde olabilir. Köpekler, dokuyu ezerek ya da çenesi güçlü olanlar yırtarak veya parçalayarak ısırır. Kediler, ince, uzun sivri dişleriyle delici tarzda, kemik dokuya kadar inen derin yaralar oluşturur, bu lezyonlar köpek ısırık yaralarına göre daha ciddi seyirlidir, osteomyelit gibi komplikasyonlara yol açabilir. At ve sığır gibi hayvanlar öğütücü tarzda yaralanma yaptıkları için daha fazla doku yıkımına neden olurlar. İnsan ısırıkları ezilme veya yırtılma şeklinde olabilir. Isırık yaraları içinde en ağır seyredenini insan ısırığı sonrası gelişenlerdir, özellikle eldeki ısırıklarda nekrozlu enfeksiyonlar gelişebilir.

Enfeksiyonun ciddiyeti, yaranın oluş şekline, lezyonun derinliğine, ısırmanın diş ve ağız yapısına ve oral mikrobiyotasına göre farklılık gösterir. Enfeksiyonun seyrinde konağa ait faktörler de önemlidir. İki yaşın altında, 50 yaşın üstündeki kişilerde, altta yatan hastalığı bulunanlarda ve bağışık yanıtı zayıf olanlarda enfeksiyon riski yüksektir. El, bilek ve ayak bölgesinde, özellikle küçük çocuklarda yüz ve saçlı deride, eklem protezine yakın yerde gerçekleşen yaralanmalarda enfeksiyon ağır seyreder. Enfeksiyon gelişmiş yaralardan kültür yapmak, sistemik enfeksiyonu düşündüren durumlarda ayrıca kan kültürü yapmak gerekir.

1.10.1. Örneklerin alınması, taşınması, Kabul/ ret ölçütleri

Uygun olmayan örnekler;

- * Isırma sonrasında hemen yapılacak kültürün pek yararı yoktur, bu nedenle ısırıktan sonraki ilk 12 saat içinde örnek alınması uygun değildir.
- * Yara yüzeyinin deri mikrobiyotası veya çevreden gelen bakterilerle kolonize olması nedeniyle, yüzeyden eküvyonla alınan örnekler yanlış sonuç verir. Örneklerin bu şekilde alınması önerilmez.

Uygun örnekler;

- * Doku biyopsisi veya aspirasyonla alınan örnekler

Örnek almadan önce yara çevresindeki deri %70'lik alkol veya povidon iyodin ile silinmeli, yara bol miktarda steril serum fizyolojik ile yıkanmalı, ardından nekroza uğramış dokular debride edilmeli, varsa yabancı cisimler uzaklaştırılmalıdır. Yara tabanından doku biyopsisi veya aspirasyon materyali alınmalıdır. Biyopsi veya aspirat alınmadığı durumlarda yukarıdaki temizlik yapıldıktan sonra yara tabanından eküvyonla örnek alınabilir. Örnekler anaerob taşıma besiyerlerine aktarılmalı, 2 saatten daha kısa süre (ideal olan 30 dk.) içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Her ne kadar enfeksiyonların sadece %5'inde kan kültür pozitifliği olsa da, ateş gibi sistemik enfeksiyon bulgularının varlığında, 24 saatlik zaman diliminde kültür için 2 veya 4 kez kan örneğinin alınması önerilmektedir.

Tablo 1.10.1. Bazı hayvan veya insan ısırıkları sonrası gelişen enfeksiyonlarda olası etkenler.

Isırık yarası çeşidi	Aerob bakteriler	Anaerob bakteriler
Köpek ısırıkları	<i>Pasteurella, Streptococcus, Staphylococcus, Neisseria, Corynebacterium, Moraxella, Enterococcus, Bacillus</i>	<i>Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Propionibacterium, Bacteroides, Peptostreptococcus</i>
Kedi ısırıkları	<i>Pasteurella, Streptococcus, Staphylococcus, Neisseria, Moraxella, Corynebacterium, Enterococcus, Bacillus</i>	<i>Fusobacterium, Porphyromonas, Bacteroides, Prevotella, Propionibacteri</i>
At ısırıkları	<i>Actinobacillus equuli, Actinobacillus lignieresii, Actinobacillus suis, Escherichia coli, Neisseria spp, Pasteurella caballi, Staphylococcus aureus, Streptococcus anginosus, Streptococcus mutans, Yersinia spp.</i>	<i>Bacteroides fragilis, Campylobacter ureolyticus (eski adı: Bacteroides ureolyticus), Prevotella melaninogenica</i>
Ayı ısırıkları	<i>Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Citrobacter diversus, Enterococcus durans, Escherichia coli, Mycobacterium fortuitum, Neisseria sicca, Proteus vulgaris, Serratia fonticola, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus sanguis</i>	
Fare, Kobay, Hamster ısırıkları	<i>Haemophilus influenzae, Pasteurella spp, Acinetobacter anitratus</i>	<i>Streptobacillus moniliformis, Spirillum minus</i>
İnsan ısırıkları	<i>Acinetobacter spp, Moraxella catarrhalis, Corynebacterium spp, Eikenella corrodens, Enterobacter cloacae, diğer Enterobacter türleri, Escherichia coli, Haemophilus influenzae ve diğer Haemophilus türleri, Klebsiella pneumoniae, Micrococcus spp, Neisseria gonorrhoeae ve diğer Neisseria türleri, Nocardia spp, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, diğer Stafilokok türleri , α, β, γ hemolitik streptokoklar,</i>	<i>Actinomyces spp, Arachnia propionica, Bacteroides fragilis, Clostridium spp, Fusobacterium nucleatum, Peptostreptococcus anaerobius, Anaerococcus prevotti, diğer anaerob gram pozitif koklar Prevotella spp, Propionibacterium acnes ve diğer Propionibacterium türleri</i>

1.10.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı

Örnekler genel görünümü bakımından incelenmeli, yeterli miktarda olup olmadıkları, uygun şartlarda laboratuvara taşınıp taşınmadıkları belirlenmeli, uygun olmayan örnekler reddedilmelidir. Kötü koku, nekrozun varlığı, kanlı veya pürülan görünüm not edilmelidir.

Doku örnekleri steril bir havan içine alınmalı, üzerine yaklaşık 1 ml sıvı besiyeri eklenerek ezilmelidir. Homojen hale getirilen örnekten steril pipet ile 2 veya 3 damla (pürülan olanlarda 1 damla), Tablo A. 2. de belirtilen katı besiyerlerine damlatılarak, ardından öze ile azaltma yöntemiyle, geriye kalan örnek tiyoglukolatlı sıvı besiyerine aktararak ekilmelidir.

Hastadan aspirasyon materyali alınmış ise, materyal taşıma besiyerinde iken iyice çalkalanarak homojen hale getirilir. Daha sonra örnekten, öze ile besiyerlerine tek düşecek şekilde azaltma yöntemiyle ekim yapılır.

Besiyerlerine ekimi takiben, örneklerden birer damla lama sürülerek preparat hazırlanır.

Ekim yapılmış plaklar, uygun atmosfer ve sıcaklık koşullarında inkübe edilir (Tablo 1.10.2). Elde edilen kültürlerde mikroorganizmaların tanımlanması geleneksel ve modern tekniklerle yapılır.

Anaerop ortamda inkübe edilen plaklarda, fakültatif anaerop bakteriler de kolaylıkla üredikleri için, zorunlu anaeroplardan ayırt edilmesi gerekir. Bu amaçla farklı morfolojideki koloniler belirlenir, her bir koloniden hem kanlı (anaerop ortamda) hem de çikolata agara (%5 CO₂'li ortamda) pasajları yapılarak, 35-37°C sıcaklıkta inkübe edilirler. Sadece anaerop ortamda üreyen mikroorganizmalar zorunlu anaerop olarak kabul edilir ve o yönden işleme alınırlar.

Saf şekilde elde edilen anaerop bakteriler, Gram boyanma özellikleri, kanamisin, vankomisin, kolistin gibi antibiyotik identifikasyon disklerine duyarlılıkları, nitrat redüksiyonu, katalaz, üreaz ve indol oluşturabilme özellikleri açısından araştırılır (Tablo 1.10.3). Anaerop bakterilerle çalışma pratiği olmayan laboratuvarlarda tespit edilen bu özellikler, etken anaerop bakterinin cins düzeyinde tahmin edilmesine yardımcı olur. Ancak hastalandırıcı özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları farklı olan bakterilerin tür düzeyinde tanımlanması başarılı sonuçların alınması açısından önemlidir. Bakterilerin tür düzeyinde tanımlanabilmesi için biyokimyasal veya enzime dayalı ileri düzey tetkiklerin yapılması gerekir. Bu amaçla RapID-ANA, API 20 A, rapid ID 32 A, AnIDENT, Crystal, Sceptor veya MALDI-TOF gibi otomotize yöntemler kullanılabilir.

Tablo 1.10.2. Isırık yaralarından alınan örneklerin ekildikleri besiyerleri, kültür koşulları ve değerlendirme

Kültür							
Örnekler	Standart besiyeri	İnkübasyon			Değerlendirme sıklığı	Önerilen asgari düzeyde tanımlama	
		Sıcaklık (°C)	Atmosfer	Süre			
Doku biyopsisi, Aspirat	Çokolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	Günlük	Tür düzeyinde	
	Kanlı agar	35-37	%5 CO ₂	24-48 saat	24., 48. saat	Tür düzeyinde	
	Anaerop besiyeri; Brusella agar, KVLB agar	35-37	Anaerop	40-48 saat	>40 saat	Cins düzeyinde	
	Mac Conkey	35-37	Aerop	24-48 saat	Günlük	Tür düzeyinde	
	Ek besiyeri olarak, organizmanın izolasyon şansını artırmak amacıyla						
	Tiyoglukolatlı sıvı besiyeri	35-37	Aerop	16-24 saat	>40 saat	Üreme var ise ve diğer besiyerlerinde üreme yok ise aşağıdaki besiyerlerine pasaj yapılır	
	Çokolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	Günlük	Tür düzeyinde	
Anaerop Kanlı agar	35-37	Anaerop	40-48 saat	>40 saat	Cins düzeyinde		
Kan	Aerop ve Anaerop kan kültür şişesi	35-37		Sinyal alınır alınmaz		Tür düzeyinde	

Tablo 1.10.3. Anaerop Gram negatif bakterilerin ayırt edici özellikleri

	Safrada üreme	Vankomisine Direnç	Kanamisine Direnç	Kolistine Direnç	Katalaz Aktivitesi	Nitrat Redüksiyonu
<i>Bacteroides</i>	D	D	D	D	+	-
<i>Prevotella</i>	H	D	D	D/H	-	-
<i>Porphyromonas</i>	H	H	D	D	-	-
<i>Fusobacterium</i>	H/D	D	H	H	-	-
<i>Bilophila</i>	D	D	H	H	+	+

D; Dirençli, H; Hassas

1.10.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

1.10.3.1. Gram boyama

Gram yöntemiyle boyanan preparatın mikroskop ile incelenmesi ve bulguların hemen klinisyene bildirilmesi önemlidir. İncelemede nötrofillerin görülmesi enflamasyonun varlığını düşündürür. Yassı epitel hücrelerinin varlığı ise örneğin yüzeiden alındığını ve kültür için uygun olmadığını gösterir. Mikroorganizmaların görülmesi, morfolojileri tanımlamada önemli yol göstericidir. Her zaman mikroskop görüntüsü ile kültür arasında uyum olmayabilir. Örneğin, *Clostridium* türlerine bağlı enfeksiyonlarda, salgıladıkları toksinlere bağlı lökositlerde yıkım gelişebilir.

1.10.3.2. Kültür

- * Isırık yara çeşidine göre önem arzeden birtakım mikroorganizmalar mevcuttur. Bu mikroorganizmalar yüksek virülans özelliklerine sahiptir, sistemik enfeksiyonlara yol açabilir, santral sinir sistemi ve akciğer gibi diğer organlaraya yayılabilir, sepsise ve kanama bozukluklarıyla seyreden ölümcül hastalıklara neden olabilir. Ürediğinde koloni sayısı veya mikroskop görüntüsü dikkate alınmadan bildirilmesi gerekir. Bu organizmalar;
 - İnsan ısırık yaralarında *Eikenella corrodens*,
 - Köpek ısırıklarında; *Pasteurella canis*, *Capnocytophaga canimorsus*
 - Kedi ısırık yaralarında; *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* , *P. multocida*, sbsp. *septica* ve *Capnocytophaga canimorsus*,
 - Sıçan gibi kemiricilerin ısırıklarında; *Streptobacillus moniliformis* ve *Spirillum minor*.
- * Genel olarak yara kültürlerinde kabul edilen, koloni sayısı az olsa dahi tanımlanması gereken organizmalar:
 - *Haemophilus influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Brucella*, *C. ulcerans*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Listeria*, Grup A, Grup B beta-hemolitik streptokoklar, *Arcanobacterium*, *Kingella kingae*, *Chromobacterium*, *P. aeruginosa*, *Vibrio*, *Actinomyces*, *Yersinia* türleri.
- * Mikroskop görüntüsünde çok sayıda lökosit ve bakteri bulunan, saf şekilde baskın halde üreyen *S. aureus*, gram negatif basillere ve enterokoklara antibiyotik duyarlılık testi yapılmalıdır. Kültürde karışık bakteri üremesi varsa, bu bakteriler baskın şekilde ürememiş ise minimal tanımlama testleri uygulanmalıdır. Klinisyenin talebi doğrultusunda daha fazla tanımlayıcı testlere gidilebilir.
- * Anaerob bakterilerin bildirilmesi önemlidir, ısırık enfeksiyonlarının çoğunda etken olarak bulunurlar. En azından Tablo 17'de verilen basit testler uygulanarak minimal düzeyde tanımlanmaları ve *Fusobacterium*, *Bacteroides* (özellikle *B. tectum*), *Porphyromonas*, *Prevotella* türleri, *Propionibacterium acnes* ve gram pozitif anaerob koklar üredi şeklinde bildirmeleri gerekir.
- * Rutin laboratuvarlarda anaerob bakterilere antibiyotik duyarlılık testi uygulanmaz. Ancak bakterilerin β -laktamaz üretilip üretilmediğini belirlemenin tedavi seçimine faydası büyüktür. Hayvan ısırık yaralarından izole edilen anaerob bakterilerin β -laktamaz üretme oranı, insan ısırıklarından üretilen bakterilere göre daha düşüktür.



Pasteurella türleri, morfoloji benzerliğinden dolayı Neisseria spp. veya Haemophilus influenzae ile karıştırılabilir.

1.10.3.3. Raporlama süresi

Aerop organizmaların tanımlanması 24 ile 72 saat arasında değişir. Ancak anaerop bakterilerin tanımlanması 7 güne kadar uzayabilir. Anaerop kültürlerden üremenin olmadığını söyleyebilmek için plakların 10 gün inkübe edilmiş olması gerekir.

1.11. Diyabetik ayak ve dekübitüs ülserleri

1.11.1. Diyabetik ayak

Diabetes mellitus kan şekeri yüksekliği ile seyreden bir metabolizma hastalığıdır. İnsülin salgılanmasında veya insülinin etkisinde ya da her ikisindeki defekt sonucu karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklara bağlı gelişir. Diyabetin en ciddi ve en ağır komplikasyonlarından birisi ayaklarda gelişen ülserlerdir. Periferik nöropati ve vasküler hastalıklar Diyabetik Ayak Ülserleri (DAÜ) oluşumuna zemin hazırlar. Doku perfüzyonundaki azalmanın yanı sıra nötrofil fonksiyonlarındaki bozulmalar ve protein sentezindeki defektler ülser oluşumuna ve ağır seyretmesine katkıda bulunur. Diyabetli kişilerin %25'inde ömürlerinde en az bir kez DAÜ gelişir. Erken ve etkin tedavinin başlanmadığı durumlarda, ülserler iyileşmeyen kronik formlara dönüşür ve ekstremitenin amputasyonuna neden olabilir.

Diyabetik ayak ülserlerinin yaklaşık %56'sı enfektedir, enfekte yarası olan hastaların %20'si alt ekstremitte amputasyonuna gidebilmektedir. Enfeksiyonun erken tanısı ve tedavisi önemlidir. Diyabetik ayak enfeksiyonu tanısı klinik bulgu ve semptomlar ve mikrobiyoloji sonuçlarıyla beraber değerlendirilerek konmalıdır. Hastaların hastaneye yatırılma, cerrahi girişime veya amputasyona gitme kararını vermede yardımcı olması amacıyla, International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF) ve Infectious Disease Society of America (IDSA) gruplarının ortak kararlarıyla klinik kriterler getirilerek DAÜ sınıflandırılmıştır (Tablo 1.11.1). Enfeksiyon bulunmayan durumlarda antibiyotik tedavisine gerek yoktur. Bu kriterlere göre enfeksiyondan şüphe duyulan, enflamasyon bulguları veren pürülan lezyonlardan mikrobiyolojik inceleme yapılmalıdır. Tüm açık yaralar mikroorganizmalarla kolonize olmaktadır bu nedenle pozitif kültürler tanı koymayı zorlaştırır. Doğru ve etkili tedavinin yapılabilmesi için uygun örnek alınıp mikrobiyolojik yönden incelenmelidir.

Tablo 1.11.1. Diyabetik ayak enfeksiyonlarının şiddetlerine göre sınıflandırılması

Klinik kriterler	Evre/şiddet
Klinik belirti yoktur	Evre 1 / Enfeksiyon yoktur
Yalnızca deri yüzeyinde beliren bir lezyon beraberinde aşağıdakilerden en az ikisi vardır; <ul style="list-style-type: none"> Lokal sıcaklık artışı, Ülser çevresinde 0.5-2 cm genişliğinde eritem, Gerginlik ve ağrı, Şişlik ve sertlik, İrinli akıntı. 	Evre 2 / Hafif
Eritem genişliği 2 cm'den fazladır veya evre 2 de sayılan bulgulardan biri mevcuttur; <ul style="list-style-type: none"> Ya da enfeksiyon deri altına ilerlemiştir. Derin apse, lenfanjit, osteomyelit, septik artrit veya fasiit gelişmiştir. Ancak herhangi bir sistemik enflamatuvar yanıt gelişmemiştir. 	Evre 3 / Orta
Hastada aşağıdaki sistemik bulgulardan en az ikisi vardır; <ul style="list-style-type: none"> Vücut sıcaklığı < 36°C ya da > 39°C, Nabız sayısı >90/dk, Solunum hızı >20/dk, PaCO₂ < 32 mmHg, Lökosit sayısı > 12000 ya da <4000 mm³, %10 olgunlaşmamış nötrofil varlığı. 	Evre 4 /Ağır

1.11.2. Dekübitüs ülserleri

Bası yarası veya yatak yarası olarak da bilinen dekübitüs ülserleri yatağa veya tekerlekli sandalyeye bağımlı kalan hastalarda görülür. Daha çok vücudun kemik çıkıntılarının üzerinde, basıncın fazla olduğu sırt, kalça, baldır ve topukta gelişir. Uzun süreli basıya bağlı yumuşak dokuda kan dolaşımının bozulması, bunu takip eden iskemi, nekroz ve doku kaybı gerçekleşir. Doku hasarı diplerde daha fazladır, cilt yüzeyinde görülen ülserler, derindeki hasarı yansıtmaz. Bası yaralarının oluşmasını kolaylaştıran etkenlerden birisi de enfeksiyondur. Enfeksiyon ciltte kızarıklıkla başlar, yara büyüdükçe endüryasyon, bül, siyanoz ve doku nekrozu gelişebilir. Kronikleşen yaralarda, cilt, ciltaltı, yağ, fasya ve kaslara kadar inen derin doku harabiyeti bulunur. Altta bir eklem varsa, nekroz sinovya ve eklemi kapsayabilir. İlerlemiş olgularda osteomyelit, kemikte dislokasyonlar ve patolojik kırıklar gözlenebilir. Başarılı sonuçların alınması için enfeksiyonun erken tanımlanması ve enfeksiyon düzeyine göre uygun tedavinin verilmesi gereklidir. Amerikan Ulusal Basıncı Ülser Tavsiye Paneli'nin geliştirmiş olduğu sınıflandırma, enfeksiyonun düzeyini belirlemede ve uygun antibiyotiğin seçilmesinde yol göstericidir. Bu panele göre, bası yaraları klinik görünümüne göre 4 evrede sınıflandırılmıştır.

Evre1: Cilt bütünlüğünü bozulmamıştır. Ancak, ciltte bastırmakla solmayan kızarıklık mevcuttur.

Evre 2: Epidermis, dermis veya ikisinin birden kaybına bağlı açık yara gelişmiştir. Ülserler yüzeyleydir, abrazyon, bül ya da sığ bir krater görünümünde olabilir. Yarayı ölü doku çevreleyebilir.

Evre 3: Yağ tabakasını da kapsayacak şekilde derinin tüm katmanlarını ve deri altı dokusunu tutan derin bir krater şeklinde ülser oluşmuştur. Pürülan görünümde akıntı vardır. Ancak, fasya sağlamdır.

Evre4: Derinin tüm katlarında kayıp, kas, tendon, kemik, eklem kapsülü veya destek dokusunu da kapsayacak şekilde hasar vardır. Yaranın tabanını kaplayan koyu renkli skar dokusu bulunur.

Evrelendirilemeyenler: Yarayı kaplayan sarı, kahverengi veya gri bir kabuk vardır. Hasar derindedir ve geniş bir alanı kapsar.

Dekübitüs ülserlerinin iyileşmesi yaranın evresiyle yakından ilişkilidir. Birinci veya ikinci evrede tedaviye yanıt iyidir. Ancak daha ileri evrelerde daha agresif ve uzun süreli tedaviye gerek vardır. Dekübitüs ülserlerinde yüzeyley ülserin belirmesi ile mikrobiyolojik kültür gerekliliği doğar.

Bası yaraları birtakım komplikasyonlara neden olabilir. Mikrobiyolojiyi ilgilendiren komplikasyonlar:

- **Sepsis;** enfeksiyon etkeni bakteri dolaşıma katılarak sepsise neden olabilir. Yaşamı tehdit eden organ yetmezliklerine yol açabilir.
- **Selülit;** deri ve yumuşak doku enfeksiyonu olan, ciltte kızarıklık ve şişlik oluşturan, şiddetli ağrı yapabilen (felçli hastalar ağrıyı hissetmeyebilir) selülit, ölümcül komplikasyonlara neden olabilir.
- **Kemik ve eklem enfeksiyonları;** septik artrit, kartilaj ve doku yıkımına neden olabilir. Osteomyelit ise eklem ve ekstremitelerin hareketini kısıtlar. Her iki durumda yaşamı tehdit eden komplikasyonlara neden olur.

Enfeksiyon etkenleri benzer olan diyabetik ayak yaraları ve dekübitüs ülserlerine mikrobiyolojik tanı yaklaşımı aynıdır. Bu bölümde her iki yaranın kültür sonuçlarının değerlendirilmesi ele alınmıştır.

1.11.2.1. Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Yeni enfekte olmuş yaralardan, daha önce enfeksiyon gelişmiş ve bunun için antibiyotik aldığı halde iyileşme görülmeyen kronik yaralardan biyopsi örnekleri alınmalı mikrobiyolojik yönden incelemelidir.

1.11.2.1.1. Kültür için uygun olmayan örnekler;

- Enfekte olmayan yaralar nadiren antibiyotik tedavisi gerektirir. Klinik yönden enfekte olmayan yaradan örnek alınması önerilmemektedir.
- Yara yüzeyinde eküvyon ile alınmış sürüntüler.
- Formalin içerisinde gönderilen örnekler.

1.11.2.1.2. Kültür için uygun örnekler;

- Doku biyopsisi veya aspirasyon materyali.

Ülserli bölgenin çevresindeki deri %70'lik alkol veya povidon iyodin ile silinmeli, yara bol miktarda steril SF ile yıkanmalı, ardından nekroza uğramış dokular debride edilmelidir. Daha sonra, yara tabanından ince iğne veya punch biyopsi örnekleri (3-4mm) alınabilir ya da şırınga ile pürülan madde (> 2mL) aspire edilebilir. Ayrıca debritleme işleminden sonra, sağlıklı deriye yakın ülser sınırından, derin dokuya inilerek kazıntı alınabilir. Alınan örnekler hemen anaerobik taşıma tüplerine alınmalı ve 30 dakika içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Eküvyonla örnek alınması önerilmemekle beraber, eküvyonla alma zorunluluğu bulunuyorsa, debritleme ve temizlik yapıldıktan sonra dokunun derinine inilerek, aerop, anaerop kültürler ve preparat hazırlığı için üç adet eküvyonla sürüntü alınmalıdır.

Tüm olası patojenleri saptayabilmek amacı ile kemik ve yumuşak doku kültürleri birlikte alınmalıdır

1.11.2.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı

- Aspire edilen material irinli ise, anaerop taşıma şişesi içinde vortekslenerek homojen hale getirilir.
- Materyal pürülan özellik taşımiyorsa ve miktarı fazla ise santrifüj edilip çöküntü elde edilir.
- Punch biyopsiler ya da doku kazıntıları, 1 ml sıvı tiyoglikolatlı besi yeri içinde ezilerek inceltilmelidir.
- Eküvyon ile örnek alınmış ise eküvyon, içinde 1 ml sıvı tiyoglikolatlı besiyeri bulunan tüpe daldırılmalı ve materyalin besiyerine geçmesini sağlamak amacıyla tüpün içinde çalkalanmalıdır.

Örnek bu şekilde hazırladıktan sonra Tablo 1.11.2.2'da görülen katı besiyerlerine irinli aspirasyon numunelerinden 1 öze, irinli olmayan numuneden ise 2 veya 3 öze örnek aktararak azaltma yöntemiyle, sıvı besiyerlerinin dip kısmına 0.5 ya da 1 ml eklenerek ekim gerçekleştirilir. Uygun atmosfer koşullarında uygun sürede inkübe edilirler.



Ülserlerde bulunan bakteri sayısının, enfeksiyonun şiddetini, seyrini ve iyileşme süresini etkilediği bu nedenle mikroorganizmalarla ilgili sayısal sonuçların verilmesi gerektiği bilinmekteydi, örneklerden ekimler sayım tekniğiyle yapılıyor ve sonuçlar 1 mL'deki mikroorganizma cinsinden ifade ediliyordu. Ancak yapılan çalışmalarda, dokuda bulunan bakteri sayısından ziyade spesifik patojenlerin ve virülans faktörlerinin enfeksiyonun seyrinde daha önemli olduğu gösterilmiş, kantitasyon yöntemiyle ekim uygulamadan kaldırılmıştır.

Tablo 1.11.2.2. Diyabetik ayak ve dekübitüs ülserlerinden alınan örneklerin işlenmesi

Kültür						
Örnekler	Standart besiyeri	İnkübasyon			Değerlendirme sıklığı	Olası etkenler
		Sıcaklık (°C)	Atmosfer	Süre		
Diyabetik ayak, Dekübitüs ülserleri Biyopsi dokusu Aspirat	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	Günlük	Aerop Bakteriler Stafilokoklar, Streptokoklar, Enterokoklar, <i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri, <i>Pseudomonas</i> , HACEK grubu, <i>Nocardia</i> spp.
	Kanlı agar	35-37	%5 CO ₂	24-48 saat	24. , 48. saat	
	Anaerop besiyeri; Brusella agar KVLB agar	35-37	Anaerop	40-48 saat	>40 saat	
	Mac Conkey	35-37	Aerop	24-48 saat	Günlük	
Osteomyelit Kemik biyopsi örneği	Ek besiyeri olarak, organizmanın izolasyon şansını artırmak amacıyla (Üreme var ise ve diğer besiyerlerinde üreme yok ise KVLB agar, Fenil etil alkollü anaerop agar veya <i>Bacteroides</i> safralı eskülinli agar besiyerlerine pasaj yapılır)					
	Tiyoglukolatlı sıvı besiyeri	35-37	Aerop	16-24 saat	>40 saat	Anaerop Bakteriler; <i>Bacteroides</i> spp, <i>Prevotella</i> spp, <i>Porphyromonas</i> spp, <i>Clostridium</i> spp, Gram pozitif anaerop koklar
	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	Günlük	
	Anaerop Kanlı agar	35-37	Anaerop	40-48 saat	>40 saat	
Kan	Aerop ve Anaerop kan kültür şişesi	35-37		Sinyal alınır alınmaz		

1.11.2.3. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

1.11.2.3.1. Mikroskopik inceleme:

Gram yöntemi ve metilen mavisi ile boyanmış preparatların mikroskopik incelemelerinde, var olan mikroorganizmaların boyanma özellikleri, şekilleri ve kaç tür mikroorganizmanın bulunduğu, lökositlerin olup olmadığı enfeksiyonun tanısında yol göstericidir.

1.11.2.3.2. Kültür:

Enfeksiyonun derecesine ve evresine göre izole edilen mikroorganizmaların çeşidi ve türü değişiklik gösterebilir. Tablo 1.11.2.3'de farklı diyabetik enfeksiyon tipi ve bulunabilecek olası etkenler verilmiştir. Dekübitüs ülserlerinde de benzer durum söz konusudur.

Tablo 1.11.2.3. Diyabetik enfeksiyon tipi ile olası etken dağılımı*

Diyabetik ayak enfeksiyon tipi*	Olası etken organizmalar
Selülit (beraberinde ülser yoktur)	<i>Staphylococcus aureus</i> , Beta-hemolitik streptokoklar (özellikle B grubu)
Yeni oluşmuş ülser (antibiyotik kullanımı yoktur)	<i>S. aureus</i> , Beta-hemolitik streptokoklar
Kronik ülser (antibiyotik kullanımı yoktur)	Birden fazla mikroorganizma (<i>S.aureus</i> , Beta-hemolitik streptokoklar ve <i>Enterobacteriaceae</i>) bulunur. Daha önce sefalosporin kullananlarda enterokoklar da izole edilebilir.
Kronik ülser (daha önce tedavi almış, mavimsi renkli akıntı mevcut)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (sıklıkla yukarıda verilen bakterilerle birlikte bulunur)
İskemi, nekroz ve gangren mevcut, pis kokulu akıntı bulunmakta	Birden çok mikroorganizma (çeşitli gram pozitif aerop koklar, <i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri, nonfermentatif gram negatif basiller ve anaeroplara; <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Prevotella spp</i> , <i>Peptostreptococcus spp</i> , <i>Clostridium spp</i> , gram pozitif anaerop koklar)

* Dekübitüs yaralarında da benzer durum bulunmaktadır.

- Uygun alınmış ve uygun şekilde laboratuvara gönderilmiş örneklerde üreyen aerop bakteriler tür düzeyinde tanımlanmalı.
- Mikroskop görüntüsünde çok sayıda lökosit ve bakteri bulunan, saf şekilde baskın halde üreyen *S. aureus*, gram negatif basillere ve enterokoklara antibiyotik duyarlılık testi yapılmalıdır.
- Karışık kültür mevcut ise, bu bakteriler baskın şekilde ürememiş ise minimal tanımlama testleri uygulanmalıdır. Klinisyenin talebi doğrultusunda daha fazla tanımlayıcı testlere gidilebilir.
- Anaerop bakterilerin bildirilmesi önemlidir. En azından basit testler uygulanarak minimal düzeyde tanımlanmaları ve *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella* türleri, *Propionibacterium acnes* ve gram pozitif anaerop koklar üredi şeklinde bildirilmeleri gerekir.
- Anaerop bakterilerin β -laktamaz üretmedikleri belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Abrahamian FM, Goldstein EJ. Microbiology of animal bite wound infections. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):231-46. doi: 10.1128/CMR.00041-10.
2. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis.* 2013;57(4):e22-e121.
3. Bonifaz A, Gómez-Daza F, Paredes V, Ponce RM. Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra, and black piedra. *Clin Dermatol.* 201;28(2):140-5.
4. Byrd L. Examination of anaerobic culture plates for anaerobic bacteria. In Isenberg HD, Garcia LS (eds), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd ed. ASM press, Washington D.C. 2010: 4.4.
5. Citron DM. Algorithm for identification of anaerobic bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. ASM press, Washington D.C. 2007: 377-8.
6. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Garcia LS, Isenberg HD, eds. 3rd edition, ASM Press, Washington DC, USA, 2010.
7. Feuilhade de Chauvin M. New diagnostic techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005;19 Suppl 1:20-4.
8. Griego RD, Rosen T, Orengo IF, Wolf JE. Dog, cat and human bites: a review. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33(6):1019-29.
9. Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, Brintnell W, Piraccini BM, Tosti A. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: diagnosis, clinical types, epidemiology and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(3):494-502.
10. Gupta AK, Simpson FC. Diagnosing onychomycosis. *Clin Dermatol.* 2013;31(5):540-3.
11. Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010;28(2):190-6.
12. <http://www.who.int/lep/leprosy/en/> Erişim tarihi: 7.Ocak.2013.
13. International Best practice guidelines: Wound management in diabetic foot ulcers. Wound International 2013. Erişim: www.woundsinternational.com.
14. International Working Group on the Diabetic Foot. International consensus on the diabetic foot (CD-Rom). Brussels International Diabetes Foundation, May 2003.
15. Jousimies-Somer HR, Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed. Belmont, CA: Star Publishing. 2002.
16. Lipsky B, Berendt A, Cornia PB. Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. IDSA guidelines. *Clin Infect Dis* 2012; 54(12): 132-73.

17. Livesley N,J ,Chow A. Infected Pressure Ulcers in Elderly Individuals. Clin Infect Dis,2002;35(11): 1390-6.
18. Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry MR, Pfaller MA, eds. 9th edition, ASM Press, Washington DC, USA, 2007.
19. Piérard GE, Quatresooz P, Arrese JE. Spotlight on nail histomycology. Dermatol Clin. 2006;24(3):371-4.
20. Preventing and Caring for Pressure Ulcers; Erişim: http://www.stoppain.org/pressureulcers/common/pdf/BIMC_patient.pdf
21. Richard J.L,Sotto A,Lavigne J.P., New insights in diabetic foot infection. *World Journal of diabetes.* 2011; 2(2):24-32.
22. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia 2008;166(5-6):295-306.
23. Stefanopoulos P, Karabouta Z, Bisbinas I, Georgiannos D, Karabouta I. Animaland human bites: evaluation and management. Acta Orthop Belg. 2004;70(1):1-10.
24. Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Moran GJ, Goldstein EJ. Bacteriologicanalysis of infected dog and cat bites. Emergency Medicine Animal Bite Infection Study Group. N Engl J Med. 1999;340(2):85-92.
25. Talan DA, Abrahamian FM, Moran GJ, Citron DM, Tan JO, Goldstein EJ. Emergency Medicine Human Bite Infection Study Group. Clinical presentation and bacteriologic analysis of infected human bites in patients presenting to emergency departments. Clin Infect Dis. 2003;37(11):1481-9.
26. Türkiye diyabet önleme ve kontrol programı Erişim: <http://www.saglik.gov.tr/HM/dosya/1-71375/h/turkiye-diyabet-onleme-ve-kontrol-programi.pdf>
27. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E. Onychomycosis. Clin Dermatol. 2010;28(2):151-9.
28. Williams DT, Hilton JR, Harding KG. Diagnosing Foot Infection in Diabetes. Clin Infect Dis. 2004;39(2):83-6.
29. World Health Organization (WHO). Guide to eliminate leprosy as a public health problem. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 2000.

2. GÖZ ÖRNEKLERİ

2.1. Giriş

Küçük olmakla birlikte, farklı yapıda tabakaları, florası olabilen bölgesi yanında tamamen steril alanlarının da olması nedeniyle kültür sonuçlarının değerlendirmesinde özel dikkat gerektiren bir organdır. Gözde alerjik reaksiyonlar sık görüldüğü için enfeksiyonların mikrobiyolojik olarak doğrulanması gereklidir. Ayrıca yardımcı bez ve kanalların enfeksiyonlarına da rastlanılmaktadır. Mikroorganizmalar dışarıdan eller, kontakt lens, kullanılan eşyalar, travmaya bağlı olarak yabancı cisimden, cerrahi sonrası veya komşu bölgenin florasından kaynaklanabilir.

Gözde görülebilecek enfeksiyonlar ve etkenleri anatomik bölgelere göre ayrılabilir. Bazı klinik durumlarda birden çok anatomik bölgenin enfeksiyona katılımı görülebilir. Konjunktiva enfeksiyonlarına konjunktivit, göz kapağı enfeksiyonlarına blefarit, konjunktiva ve göz kapağının birlikte enfeksiyonlarına blefarokonjunktivit denilmektedir. Kornea enfeksiyonları keratit, gözün kendi iç kısmındaki enfeksiyonu ise endoftalmit olarak tanımlanmaktadır. Uvea ve retinanın tutulumuyla görülen üveit ve retinit ise sıklıkla sistemik enfeksiyonlara ikincil olarak görülmektedir. Göz yaşı bazı enfeksiyonları dakriyoadenit, lakrimal keseninki dakriyosistit, lakrimal ağız ve kanalinki ise kanalükilit olarak tanımlanmaktadır. Doğumdan sonraki ilk dört hafta içerisinde gelişen çoğunlukla *Chlamydia trachomatis* veya *Neisseria gonorrhoeae* kaynaklı enfeksiyonlar oftalmia neonatarum olarak adlandırılır.

Özellikle keratit ve endoftalmit vakalarında hızla görme kaybı gelişebileceğinden, ayrıca bazı etkenlerin nozokomiyal salgınları olabileceğinden, yayılımlarını önleyebilmek ve hızla doğru tedavinin başlatılması amacıyla göz enfeksiyonlarında hızlı ve doğru mikrobiyolojik tanı önem kazanacaktır.

Gözün dışını tutan enfeksiyonlarda, özellikle de konjunktivitlerde yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinde direnç tespit edilen antibiyotiklerle dahi tedavi başarısı sağlanması mümkün olabilmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık sınırları serum değerlerine göre hesaplanmış olup, lokal uygulanan ilaç konsantrasyonları, sistemik uygulananlardan çok yüksek düzeyde olabilmektedir.

2.2.1. Örneklerin alınması, taşınması, kabul/ret ölçütleri

Yüzeysel enfeksiyonlarda eğer tek bir gözde etkilenme varsa, sağlam gözden de örnek alınması ekten mikroorganizma ile flora üyesi arasında ayırım yapmaya imkan verebilecektir. Her iki gözden yapılan kültürde aynı olan üremeler yüksek olasılıkla flora kaynaklı olup, klinikle ilişkili değildir. Bakteri yanında viral veya klamidyal enfeksiyonlardan şüpheleniliyorsa, birden fazla ve etkene uygun eküvyon ve örnek taşıma sistemi kullanılmalıdır.

Tüm örnekler lokal veya sistemik antibiyotik başlanmadan önce alınmalıdır. Ayrıca tanı için PCR yöntemi kullanılacak ise, muayene sırasında pudrasız eldiven giyilmiş olması ve inhibitör etki göstereceklerinden göz muayenesi sırasında uygulanmış olan floresan boya veya oksibuprocaine gibi ilaçların gözden steril serum fizyolojik ile yıkanması gereklidir.

Trahom için örnek almak amacıyla göz kapağı dışı çevrilerek folikül, enflamasyon veya skar dokusunun olduğu bölgeler seçilerek yoğun epitel hücresi toplanmasına çalışılmalıdır.

Göz enfeksiyonlarının tanısında; örneklerin, muayene sırasında göz hastalıkları uzmanı tarafından alınması ve keratit gibi durumlarda da ekimlerin hasta başında yapılması gereklidir.

Acanthamoeba türlerine bağlı keratit tanısında kültür için önerilen besiyeri Page's saline denilen çözelti ile hazırlanmış, %1,5 agar içeren katı besiyerleridir. Bu besiyeri non-nutrient agar (NNA) olarak adlandırılmaktadır.

Petrilere ekim yapılmadan önce bir *E. coli* süspansiyonunun yüzeye kaplanması amipler için besin kaynağı sağlamaktadır. Besiyerinin hazırlanmasında kolayca bulunabilecek PBS (fosfat tamponlanmış saline) kullanımı ile de başarılı sonuçlar alınabildiği bildirilmiştir. Örneklerin naklinde Page's saline bulunamıyorsa PBS kullanılması önerilmektedir.

2.2. Klinik örnek-mikroorganizma ilişkisi

Tablo 2.2.1. Gözde gelişen enfeksiyonlarda tanı amaçlı kullanılan örnekler ve olası etkenler.

Enfeksiyon hastalığının adı	Örnek türü	Olası etkenler
Keratit	Kornea kazıntısı	Bakteri
		Stafilokoklar, Streptokoklar, <i>Pseudomonas</i> türleri, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Corynebacterium</i> ve <i>Propionibacterium</i> türleri, Mikobakteri türleri, <i>Nocardia</i> türleri
		Virus
		Adenovirus, HSV, VZV
Kontakt lense bağlı keratit	Kontakt lens, lens solüsyonu	Mantar
		<i>Candida</i> , <i>Fusarium</i> ve izole edilebilenler
		Bakteri
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , mikobakteri türleri ve izole edilebilen diğerleri
Kontakt lense bağlı keratit	Kontakt lens, lens solüsyonu	Virus
		Adenovirüs, enterovirüs
		Mantar
		İzole edilebilenler
Konjunktivit, Blefarit	Konjunktiva sürüntüsü (eküvyon), püy	Bakteri
		<i>H. influenzae</i> , Lancefield A,B,C ve G grubu streptokoklar, <i>Moraxella</i> türleri, <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> ve izole edilebilen diğerleri, <i>Chlamydia trachomatis</i> *
Dakriosistit	Göz yaşı kanalı girişinden sürüntü (eküvyon), püy, aspirat	Virus
		Adenovirüs, Enterovirüs, HSV, VZV
		Mantar
Endoftalmit	Ön kamara sıvısı, vitröz biyopsi	İzole edilebilenler
		Bakteri
		Koagülaz negatif stafilokoklar, <i>Staphylococcus aureus</i> , Streptokoklar, <i>Propionibacterium acnes</i> . Cerrahi sonrası: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> ve izole edilebilenler
Üveit, Retinit **	Etkene göre değişken, CMV-sistemik viral yük, <i>T.pallidum</i> —CSF VDRL	Mantar
		<i>Aspergillus</i> , <i>Candida albicans</i> , izole edilebilenler
		Bakteri
Üveit, Retinit **	Etkene göre değişken, CMV-sistemik viral yük, <i>T.pallidum</i> —CSF VDRL	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Treponema pallidum</i>
		Virus
		CMV, HSV, VZV

* Blefaritte, konjunktivit etkenlerine ek olarak anaerobik bakteriler de etken olabilir

** Sıklıkla sistemik enfeksiyondan yayılımla gelişir

2.2.2. Örneklerin işlenmesi ve iş akışı

Bakteri enfeksiyonlarıyanında viral enfeksiyonlardan da şüpheleniliyor ise her birisi için ayrı olacak şekilde örnek alınması önerilir.

Kornea kazıntıları: Göz uzmanı tarafından laboratuvardan istenmiş katı besiyerlerine hasta başında ekim yapılması en uygundur. Alınan her kornea kazıntısı besiyeri yüzeyine sıra ile C harfi şeklinde ekilir.C harfi örneğin kornea kaynaklı olduğunu hatırlatmak için önerilmektedir. Sıra ile yapılan ekim, örneğin azaltma ekimine de yardımcı olacaktır. Her kat ayrı ekildiğinde, korneanın farklı katlarını tutan birden fazla etken var ise saptanmasını sağlayabilecektir.

Tablo 2.2.2. Yüzeysel ve komşu bölgelerin katıldığı enfeksiyonlarda kültür ve izlenmesi

Kültür						
Klinik durum	Standart besiyeri	İnkübasyon			Değerlendirme sıklığı	Önerilen as-gari düzeyde tanımlama
		Sıcaklık (°C)	Atmosfer	Süre		
Blefarit, Konjunktivit	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	>40 saat	Tür düzeyinde
	Kanlı agar	35-37	%5 CO ₂	24-48 saat	24. , 48. saat	Tür düzeyinde
Aşağıdaki klinik durumlar veya bulgular varsa yukardakilere ek olarak;						
Yenidoğanlar	Çikolata agar, Thayer Martin veya GC selektif agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	48. saatte	N. gonorrhoeae, tür düzeyinde
İmmün yetmezlik, kronik blefarit	SDA	28-30	Aerobik	48 saat	>40 saat	Mantarlar, tür düzeyinde
Kanalikülit, dakriosistit, keratit, endoftalmit, cerrahi veya travma öyküsü ek olarak bulunması	Anaerop agar	35-37	Anaerop	40-48 saat 10 gün	>40 saat >40. Saat, 7 ve 10. günlerde	Anaeroplara Aktinomiçes türleri
	SDA	28-30	Aerobik	48 saat	>40 saat	Mantarlar, tür düzeyinde
Gram boyamada gram negatifler görüldü ise	CLED agar, EMB veya Mac Conkey	35-37	Aerobik	16-24 saat	>16.saat	Mümkün olan tür düzeyinde

Tablo 2.2.3. Göz içi sıvı ve kornea kazıntı örneklerinin işlenmesi

Klinik durum	Standart besiyeri	Kültür				
		İnkübasyon			Değerlendirme sıklığı	Önerilen asgari düzeyde tanımlama
		Sıcaklık (°C)	Atmosfer	Süre		
Endoftalmit Keratit	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	Günlük	Tür düzeyinde
	Anaerop agar	35-37	Anaerop	40-48 saat	>40 saat	Anaeroplar
		Gram boyamada dallanan gram pozitif çomaklar görüldü ise :				
					10 gün	>40. Saat, 7 ve 10. günlerde
	SDA	28-30	Aerop	48 saat	>40 saat	Mantarlar, tür düzeyinde
	Ek besiyeri olarak, organizma az olmasına bağlı olarak izolasyon şansını artırmak amacıyla					
	Beyin kalp infüzyon sıvısı	35-37	Aerop	16-24 saat	24.saat	Üreme var ise aşağıdaki besiyerlerine pasaj yapılır
	Çikolata agar	35-37	%5 CO ₂	48 saat	Günlük	Tür düzeyinde
Kanlı agar	35-37	%5 CO ₂	2 4 - 4 8 saat	24. , 48. saat	Tür düzeyinde	

Göz içinden alınan sıvılarda, eğer miktar artar ise, pediatrik kan kültür şişesine ekim yapılarak takip edilmesi de kullanılan yöntemlerdendir.

Acanthamoeba türlerinin kültüründe inkübasyon 30°C'de yapılmalıdır. Petrilerin 24 saat aralıklarla kontrolü yapılarak 7. güne kadar takipleri sürdürülür. Petriler inverted mikroskopta incelenebileceği gibi, ters çevrilerek ışık mikroskopu altında 10x veya 20x objektif ile gözlenebilir. Petride ekili olan bakterilerin arasında trofozoitler yollar oluşturarak birçok çizgi görünümü ortaya çıkar. Ayrıca çok tipik, daire içerisindeki poligonal yapılar şeklinde kistlerin görülmesi de olasıdır.

Virüs ve klamdiya enfeksiyonlarında kullanılacak yöntem ve kite uygun olan eküvyon ve viral taşıma besiyerleri kullanılır. Tanıda son yıllarda PCR yöntemleri tercihi artmıştır. Virüs saptanması için, imkanları olan laboratuvarlarda hücre kültürü uygulanabilir. Virüs ve klamidyaya kaynaklı enfeksiyon şüphesinde tanıda PCR kullanımı aynı günde sonuç elde edilebildiğinden giderek yaygınlaşmaktadır. DFA yöntemi ile antijen aranması da tanı amacıyla kullanılan yöntemler arasındadır. Adenovirüs konjunktiviti tanısı için, özel olarak geliştirilmiş hasta başında kullanılan, immünokromatografik veya benzeri hızlı, kolay testler de kullanılmaktadır.

2.2.3. Sonuçların raporlanması

2.2.3.1. Sonuçların yorumlanması ve raporlanması

Klamidyaya veya virüsler için kullanılan kit var ise önerileri doğrultusunda raporlanır. Kullanılan yöntemin raporda tanımlanması yapılmalıdır.

“PCR (veya nükleik aist amplifikasyon yöntemi) ile Adenovirüs saptandı.”

“DFA yönteminde klamidyaya antijenleri saptanmadı.”

1.1.1.2. Gram boyama

Gram boyama sonuçları mümkün olan en kısa sürede raporlanır. Kritik bölgelerden (göz içerisinden alınan veya kornea kazıntısı gibi) alınan örneklerin bir saat içerisinde raporlanması idealdir.

Lökositler ve saptanan mikroorganizmalar raporlanmalıdır. Etken olarak mikobakteri düşünülen durumlarda EZN boyama yapılmalıdır.

2.2.3.3. Kültür

Floralı bölgelerden alınan örneklerde, klinik olarak anlamlı olan üremeler raporlanır. Flora üyelerinin yoğun üremesi saptandı ise, üreyen bakterinin adı bildirilerek, flora üyesi olabileceği not edilerek bildirilebilir.

Aspirat, biyopsi, steril sıvı örneklerinde üreyen tüm mikroorganizmalar raporlanır.

Üreme saptanmaz ise ".....günde üreme olmadı" şeklinde raporlanır.

Klinik olarak anlamlı üremelerde antibiyogram işlemleri tamamlanınca antimikrobiyal duyarlılıkları ile beraber raporlanır.

Keratit ve endoftalmit örneklerinde tüm üremeler raporlanmalıdır.

2.2.3.4. Raporlama süresi

Klinik olarak acil bildirilmesi (keratit, endoftalmit gibi) gereken mikroorganizma varlığında telefon ve elektronik raporlama ile hemen bilgi verilmelidir.

Eğer 16-72 saat içerisinde sonuç alınamıyorsa, yazılı olarak ön rapor verilir, daha sonra kesin rapor düzenlenebilir.

TASLAK

2.3. KAYNAKLAR

1. Anderson D, Soo SS, Towler H. Acanthamoeba keratitis: experience in a non-specialist microbiology laboratory. *J Clin Pathol.* 1991; 44(8):699.
2. Armstrong RA. The microbiology of the eye. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2000;20(6):429-41.
3. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis.* 2013; 57(4): e22-e121. doi: 10.1093/cid/cit278.
4. Bourcier T. Ocular infections. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J, Eds. *European Manual of Clinical Microbiology*, 1st ed. France; 2012: 203-214.
5. Darlene Miller. Ocular infections. In: Mahon CR, Manuselis G, Eds. *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2nd ed., USA, W.B.Saunders C. 2000: 1083-1114.
6. Garg P. Fungal, Mycobacterial, and Nocardia infections and the eye: an update. *Eye (Lond).* 2012 Feb;26(2):245-51. doi: 10.1038/eye.2011.332.
7. Høvding G. Acute bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol.* 2008;86(1):5-17.
8. Infections of Eyes, Ears and Sinuses, In: Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Eds. *Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology*, 12th ed., USA, Mosby Elsevier. 2007: 832-837.
9. Sharma S. Diagnosis of infectious diseases of the eye. *Eye (Lond).* 2012;26(2):177-84. doi: 10.1038/eye.2011.275.
10. Sharp SE and Drinks MR. *Bacterial Infections of the Eye.* Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections.2010.
11. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Intraocular Fluids and Corneal Scrapings, Microbiology Services Division, HPA. Issue no: 5.1, Issue date: 01.08.12.
12. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Eye Swabs and Canalicular Pus, Microbiology Services Division, HPA. Issue no: 5.2, Issue date: 29.03.12.
13. UK Standards for Microbiology Investigations, Isolation of Viruses Associated with Infections of the Eye: keratoconjunctivitis, Standards Unit, Microbiology Services, PHE. Issue no: 3.2, Issue date: 09.10.13.
14. UK Standards for Microbiology Investigations Isolation of Human Herpes Viruses (excluding Herpes genitalis), Standards Unit, Microbiology Services, PHE. Issue no: 3.3, Issue date: 10.10.13.