

Yenidoğan Sepsisinde Akridin Oranj Lökosit Sitospin Testinin Kullanılması

THE USING OF ACRIDINE ORANGE LEUKOCYTE CYTOSPIN TEST IN NEONATAL SEPSIS

Şaban YÜKSEL*, Hüseyin ÇAKSEN**, Mustafa K. ÖZTÜRK*,
Bülent SÜMERKAN****, Abdurrahman COŞKUN*****

* Uz/Dr., Kırşehir Kadın Doğum ve Çocuk Hastanesi, KIRŞEHİR
** Uz.Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri AD, VAN
*** Prof.Dr., Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri AD,
**** Doç.Dr., Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD,
***** Dr., Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, KAYSERİ

Özet

Bu çalışmada, sepsis tanısıyla İzlenen ve yaşları 12 saat ile 30 gün (10.89±8.45 gün) arasında değişen 24 olguda kan kültürü altın standart kabul edilerek, kandan hazırlanan konsantre varmaların Gram ve akridin oranj (AO) boyanma sonuçları karşılaştırıldı. Amacımız; yenidoğan sepsisinde spesifik mikrobiyal ajanın tanısında AOLS (akridin oranj lökosit sitospin) testinin kullanılabilirliğini belirlemek ve kan kültürüyle Gram ve AO boyama arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Olgularımızın 12'sinde (%50) kan kültüründe çeşitli bakteriler üredi. Sitospin santrifüj yöntemiyle hazırlanan yaymalar Gram ve AO'ya bayandı. Yaymalarda iki veya daha fazla mikroorganizma görülmesi pozitif olarak kabul edildi. Sitospin santrifüjle hazırlanan yaymaların AOLS ile incelemesinde kan kültürü pozitif 12 olgunun 11'inde (% 91) bakteri görülürken, kültür negatif 12 olgudan yalnızca ikisinde (%16.6) bakteri saptandı. Sitospin santrifüjle hazırlanan yaymalar Gram boyama ile incelendiğinde kan kültürü pozitif olguların dördünde (%33.3) bakteri gözlenirken, kültür negatif 12 olgunun ikisinde (%16.6) bakteri saptandı. Testlerin hassasiyet ve özgüllükleri sırasıyla AOLS testinde %91 ve %84, sitospin santrifüj yayma Gram horama testinde %50 ve %33 idi. Sonuç olarak AOLS testinin Gram boyamaya nazaran daha üstün olduğunu, yenidoğan sepsisinde bakterilerin erken dönemde tanınmasında oldukça kullanışlı olduğunu ve antimikrobiyal ilaç seçiminde klivisvenlere daha fazla yardımcı olacağını vurgulamak isleriz.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, Yenidoğan, Akridin oranj,
Gram boyama

T Klin J Pediatr 1999, 8:205-209

Geliş Tarihi: 08.03.1999

Yazışma Adresi: Dr.Şaban YÜKSEL
Ankara Cad. Vilayet Yanı.
Şatıroğlu Apt. No: 2, KIRŞEHİR

T Klin J Pediatr 1999, 8

Summary

The study group consisted of 24 patients aged from 12 hours to 30 days (mean 10.89±8.45 days), who were followed with the diagnosis of sepsis. In our study, blood culture was accepted as gold standard, and the results of concentrated blood smears, stained with acridine orange and Gram staining were compared. Our purpose was to determine whether AOLC (acridine orange leucocyte cytospin) test vs -as used in the diagnosis of specific microbial agent in sepsis, and there was a relationship between blood culture and Gram and AO staining. In 12 (50%) patients, various microorganisms were cultured from blood. The smears prepared with cytospin centrifuge method were stained Gram and AO. When two or more microorganisms were observed in the smear, it was accepted as positive. While bacteria was observed in 11 (91%) of 12 samples, which were prepared concentrated and stained with AO staining in the patients with blood culture positive, the bacteria was observed in two of the patients with blood culture negative. While bacteria was observed in 4 (33.3%) of 12 samples, which were prepared concentrated and stained with Gram, it was observed in two (16.6%) of the patients with blood culture negative. The sensitivity and specificity were 91% and 84%, in the AOLC test, 50% and 83%, and in the Gram staining test respectively. In conclusion, we would like to stress that AOLC test was more superior than Gram staining tests, AOLC test was more useful to determinate the etiologic agent in the patients who were thought neonatal sepsis with regard to Gram staining tests, and AOLC test was more helpful to the clinician to choose antimicrobial drug.

Key Words: Sepsis, Newborn, Acridine orange, Gram stain

T Klin J Pediatr 1999, 8:205-209

Yenidoğan sepsisinde klinik bulgular spesifik olmadığından hastalığın erken dönemde tanı konulması önemli bir problemdir (1,2). Tanıda, anormal klinik bulgularla birlikte kan kültüründe mikroor-

ganizmanın üretilmesi esas olmakla birlikte, çoğu merkezde tam amacıyla beyaz küre sayısı, periferik kan yayması, sedimentasyon hızı, serum CRP ve haptoglobulin düzeyi ve nitroblue tetrazolium (NBT) testi gibi nonspesifik testler de yaygın olarak kullanılmaktadır (1,3). Bunlardan başka yine bakteriyeminin tanısında, seyrek de olsa bafı-kot tabakanın yayma yapılarak Gram, metilen mavisi veya akridin orange (AO) ile boyanarak incelenmesi tekniği ve AOLS (akridin oranj lökosit sitospin) testi gibi yöntemlerin de kullanıldığı bilinmektedir (4-6). Akridin orange (AO), bakterilerle yayma zeminindeki hücre ve artıklar arasında belirgin derecede farklı boyanma oluşturan ve örneklerin direkt mikroskopik incelemesinde Gram boyamaya göre üstünlüğü bulunan fmorokrom bir boyadır (7,8).

Daha önceki çalışmalarımızdan birinde AOLS (akridin oranj lökosit sitospin) testinin yenidoğan dönemi dışındaki akut bakteriyel menenjitte etken olan mikroorganizmaların belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntem olduğu ortaya konmuştu (9). Diğer bir araştırmamızda ise yenidoğan dönemi dışındaki sepsisli olgularda AOLS testinin Gram boyamaya nazaran daha hassas bir yöntem olmakla birlikte kan kültürüyle karşılaştırıldığında fazla duyarlı bir test olmadığı belirlenmişti (10). Bu çalışmamızda ise; yenidoğan sepsisinde kan kültürü altın standart kabul edilerek, kandan hazırlanan konsantre yaymalar Gram ve AO ile boyanarak sonuçları karşılaştırıldı. Amacımız; yenidoğan sepsisinde spesifik mikrobiyal ajanın tanısında, AOLS testinin kullanılabilirliğini belirlemek ve kan kültürü ile Gram ve AO boyama arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya hastanemiz yenidoğan servisinde sepsis tanısıyla izlenen 24 olgu alındı. Olgularımızın hepsinde idrar tetkiki, tam kan sayımı, periferik kan yayması, serum C-reaktif protein (CRP) ölçümü ve beyin omurilik sıvısı incelemesi yapıp, kan kültürü için örnek alındı. Beyaz küre sayısı, Abbott CELL-DYN® 1700 otomatik tam kan sayım aygıtıyla yapıldı; normal kabul edilen alt ve üst sınırlar $5000/\text{mm}^3$ ile $15.000/\text{mm}^3$ idi. Periferik kan yaymasında, immatür/total nötrofil (İ/TN) oranı %10'dan yüksek ise sola kayma olarak

kabul edildi. Serum CRP düzeyi, Aster 2 cihazında, Biosystems firmasının 31021 nolu solüsyonlarıyla turbidimetri yöntemiyle çalışıldı; 6 mg/dl üzerindeki değerler pozitif kabul edildi. Kan kültürü için 20 ml %0.025 oranında SPS (sodyum polyanethol sulfonate) içeren beyin, kalp ve et suyu infüzyon (Bram-heart infusion broth) vasatları kullanıldı (11).

AOLS testi için steril antikoagulan bir madde olan "etilen diamin tetraasetat" (EDTA) içeren tüplere 0.5 ml kan alındı, daha sonra aynı miktar kana 1.5 ml hipotonik formal serum fizyolojik (%10 formalinli 0.025 Molar sodyum klorid) eklenerek eritrositler hemoliz edildi (6,12). Sitospin santrifüj yöntemiyle hazırlanan yaymalar AO ve Gramla boyandı.

Sitospin santrifüj tekniği: Sitospin santrifüjünde Hettich-Universal zentrifugen firmasının 1274 numaralı horizontal tüpleri kullanıldı (13). Çalışmaya başlamadan önce lam, horizontal tüp ve kağıt filtre şeritleri uygun şartlarda sterilize edildi. Yarım ml kan örneği, sitospin santrifüj üzerine yerleştirilmiş olan horizontal tüp aracılığıyla cam slayt üzerinde santrifüj edilerek yoğunlaştırıldı. Horizontal tüp ile cam slayt arasına yerleştirilmiş kağıt filtre şeridin horizontal tüp içerisinde olan süpematın sıvıyı absorbe ederek hücreleri ve mikroorganizmaları yayma üzerinde 7 mm çaplı bir alanda topladığı bilinmektedir. Yarım ml kan örneği 2000 devir/dakika hızında (400xg) 10 dakika süreyle santrifüj edilerek her bir boyama yöntemi için ikişer adet yayma hazırlandı (7).

AO boyayı hazırlama ve boyama tekniği: AO boya solüsyonu, 20 mg AO stok boyasına, 190 ml sodyum asetat tamponu [100 ml 1 Molar $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 90 ml 1 Molar hidroklorik asit (HCl) stok solüsyonu] eklenerek hazırlandı. Solüsyonun son pH'sı 3.5 oluncaya kadar HCl eklenerek AO konsantrasyonunun 100 mg/L olması sağlandı. Sitospin santrifüjde hazırlanan yaymalar önce havada kurutulup metil alkolle 2 dakika süreyle saptandı, daha sonra yine 2 dakika süreyle AO boyasıyla boyandı ve musluk suyuyla yıkılarak kurumağa bırakıldı (14,15).

Mikroskopik inceleme: Hazırlanan yaymalar nikon optiphot 2 immünfloresan mikroskopta mavi mor renkte filtre kullanılarak x100, x400 ve x1000 büyültmede incelendi. Yaymalar iki gözlemci tarafından birbirinden bağımsız olarak en az 5 daki-

ka süreyle incelendi. Bir yaymada iki veya daha fazla mikroorganizma görüldüğünde pozitif olarak kabul edildi (14,15).

İstatistiksel yöntem: Kan kültürü altın standart kabul edilerek, AO'la boyanmış yaymanın sonuçları, mikrobiyoloji laboratuvarının bildirdiği kan kültürü, sitospin yaymanın Gram boyaması, CRP, beyaz küre sayısı ve sola kayma sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Ayrıca sitospin santrifüjle hazırlanan yaymaların boyama yöntemleri ve diğer laboratuvar sonuçlarının hassasiyet, özgüllük, pozitif tahmin değeri (PTD) ve negatif tahmin değeri (NTD) hesaplandı.

Bulgular

Çalışmaya alınan 24 olgunun 9'u (%37.5) erkek, 15'i (%62.5) kız olup, yaşları 12 saat ile 30 gün (10.89±8.45 gün) arasında değişmekteydi.

Laboratuvar incelemesinde, olguların 16'sında (%66.6) lökositoz, üçünde (%12.5) lökopeni, 17'sinde (%70.8) sola kayma, 13'ünde (%54.16) toksik granülasyon pozitifliği, 14'ünde trombositopeni (%58,3) ve 18'inde (%75) serum CRP yüksekliği saptandı. Toplam 24 olgunun 12'sinde (%50) kan kültüründe üreme saptandı. İzole edilen bakteriler; enterokok (3), Klebsiella (2), Escherichia coli (2),

koagülaz-negatif stafilokok (T), Staphylococcus epidermidis (1), A grubu beta hemolitik streptokok (1), enterobakter (1) ve nonfermentatif bakteri (1) idi.

Sitospin santrifüjle hazırlanan yaymaların AOLS ile incelemesinde kan kültürü pozitif 12 olgunun 11'inde (%91) bakteri görülürken, kültür negatif 12 olgudan sadece iki (%16.6) olguda bakteri saptandı. Kan kültürü negatif olan iki olgumuzda bakteri saptanması bu olguların hastanemize getirilmeden önceki dönemde antibiyotik kullanmış olmalarıyla ilişkili olduğu kanısındayız.

Sitospin santrifüjle hazırlanan yaymalar Gram boyamayla incelendiğinde kan kültürü pozitif olguların dördünde (%33.3) bakteri gözlenirken, kültür negatif 12 olgunun ikisinde (%16.6) bakteri saptandı. Serum CRP düzeyi kan kültürü pozitif 12 olgunun 11'inde (%91), kültür negatif sekiz olgunun yedisinde (%87.5) yüksek saptandı. Beyaz küre sayısı, kan kültürü pozitif olguların dokuzunda (%75) yüksek veya düşük, kültür negatif vakaların ise yedisinde (%58) anormaldi. Ayrıca kan kültürü pozitif olguların dokuzunda (%75) sola kayma saptanırken, kültür negatif olguların sekizinde (%66.6) sola kayma vardı (Tablo 1).

Tablo 1. Olgularımızda kan kültürü ile diğer tanı testleri arasındaki ilişki

Testler	Kan Kültürü					
	Pozitif (n: 12)		Negatif (n: 12)		Toplam (n: 24)	
		(%)	n	(%)	n	(%)
AOLS						
Pozitif	11	(% 91)	2	(% 16)	13	(% 54)
Negatif		(% 8)	10	(% 83)	11	(% 45)
Sitospin santrifüj yaymanın						
Gram boyaması						
Pozitif		(% 33)	2	(% 16)		(% 25)
Negatif		(% 66)	10	(% 83)		(% 75)
CRP (mg/dl)						
Yüksek	11	(%91)	7	(% 58)	18	(% 75)
Normal	1	(% 8)	5	(%41)	6	(% 25)
Beyaz küre sayısı						
Anormal	9	(% 75)	7	(% 58)	16	(% 66)
Normal	3	(% 25)	5	(%41)	8	(% 33)
Sola kayma						
Var	9	(% 75)	8	(% 66)	17	(% 70)
Yok	3	(% 25)	4	(% 33)	7	(% 29)

Tablo 2. Sepsisli olgularımızda tam testlerinin değerlendirilmesi

Testler	Hassasiyet %	Özgüllük %	PTD %	NTD %
AOLS	91	84	83	92
Sitospin santrifüj yaymanın Gram boyaması	50	83	66	55
CRP	91	41	61	45
Beyaz küre	75	41	64	62
Sola kayma	75	33	52	57

PTD : Pozitif tahmin değeri

NTD: Negatif tahmin değeri

Çalışmamızda, AOLS testinin hassasiyet ve özgüllüğünün Gram boyamaya göre daha yüksek olduğu saptandı. AOLS ile CRP düzeyi karşılaştırıldığında ise, AOLS testinin özgüllüğü yüksek olmakla birlikte, hassasiyetin her iki teste eşit olduğu görüldü (Tablo 2).

Çalışmamızda sepsisle birlikte olguların ikisinde konjenital hipotiroidi, birer olguda ise Down sendromu ve atrial septal defekt vardı. Olguların sekizi (%33.3) eksitus oldu.

Tartışma

Bakteriyeminin hızlı tanısında bafı-kot tabakanın yayma yapılarak incelenmesi tekniği ilk kez 1944 yılında Humphrey (16) tarafından tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda konuyla ilgili değişik merkezlerden çok sayıda çalışma bildirilmiş ve bakteriyeminin erken tanısında Gram ve metilen mavisinin yanısıra özellikle AO ile boyalı bafı-kot tekniğinin üstünlükleri ve önemi üzerinde durulmuştur (4,5,17,18). AO ile boyamanın süt çocuklarında, daha büyük çocuklarda ve erişkinlerde faydasının kısıtlı olduğu bildirilmiştir (18,19). AO ve Gram boyalı bafı-kot yaymaların büyük çocuklarda yenidoğanlara göre daha az başarılı olmasının nedeni yenidoğan sepsisinde bakteri konsantrasyonunun daha yüksek olmasıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (2). Daha önce yayımlanan ve yaşları 45 gün ile 11 yıl arasında değişen sepsisli 22 olgulu bir çalışmamızda, AOLS testinin Gram boyamaya göre daha hassas bir yöntem olmakla birlikte kan kültürüyle karşılaştırıldığında fazla duyarlı bir test olmadığı gösterilmiş; bu nedenle bakterilerin belirlenmesinde hazırlanan yaymaların AO ile

boyandıktan sonra Gram boyamayla da boyanmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştı (10).

Bafı-kot yaymanın AO ile boyama tekniğinin özellikle yenidoğan sepsisinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesinde oldukça hassas ve özgül bir test olduğu ve olguların %89'unda bakteriyeminin belirlenebildiği, ayrıca tekniğin erken dönemde ve uygun antibiyotik seçiminde yardımcı olabileceği ve yaymada devam eden pozitifliğin fatal gidişle birlikte olduğu bildirilmiştir (2,5). Kile ve arkadaşlarının (6) yenidoğan sepsisiyle ilgili çalışmasında, AOLS testinin özgüllük ve pozitif tahmin değerinin oldukça yüksek olduğu, ancak nötrofil sayısı, CRP ve NBT'den daha az hassas olduğu kaydedilmiş ve tek başına hiç bir testin hassasiyet, özgüllük ve pozitif tahmin değerinin AOLS, CRP ve NBT testlerinin birlikte verdikleri sonuç kadar yüksek olmadığı saptanmıştır.

Çalışmamızda, AOLS testinin hassasiyet ve özgüllüğünün Gram boyamaya göre daha yüksek olduğu, AOLS ile CRP karşılaştırıldığında, AOLS testinin özgüllüğü yüksek olmakla birlikte, hassasiyetin her iki teste eşit olduğu belirlendi. Bu nedenle AOLS testinin Gram boyamaya nazaran daha üstün ve bakterilerin erken dönemde tanınmasında oldukça kullanışlı olduğunu ve antimikrobiyal ilaç seçiminde klinisyenlere daha fazla yardımcı olacağını vurgulamak isteriz.

KAYNAKLAR

1. Cole FS. Bacterial infections of the newborn. In: Taeusch HW, Ballard RA, Avery ME eds. Diseases of the Newborn, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991: 350-69.
2. Mathur NB, Saxena LM, Sarkar R, Puri RK. Superiority of aeridine orange-stained buffy coat smears for diagnosis of partially treated neonatal septicemia. Acta Paediatr 1993; 82: 533-5.

3. Gotoff SP. Neonatal sepsis and meningitis. İn: Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM eds. Textbook of Pediatrics 15th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1996: 528-37.
4. Faden HS. Early diagnosis of neonatal bacteremia by buffy-coat examination. J Pediatr 1976; 88: 1032-34.
5. Kleiman MB, Reynolds JK, Schreiner RL, Smith JW, Allen SÜ. Rapid diagnosis of neonatal bacteremia with acridine orange-stained buffy coat smears. J Pediatr 1984; 105: 419-21.
6. Kite P, Millar MR, Gorham P, Congdon P. Comparison of five tests used in diagnosis of neonatal bacteremia. Arch Dis Child 1988; 63: 639-43.
7. Lauer BA, Roller LB, Mirrett S. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. J Clin Microbiol 1981; 14: 201-5.
8. Kronvall G, Myhre E. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. Acta Pathol Microbiol Scand 1977; 85: 249-54.
9. Yüksel Ş, Öztürk MK, Çaksen H, Sümerkan B, Coşkun A. Akut bakteriyel menenjit tanısında akridin oranj lökosit sitospin testinin kullanılması. Çocuk Sağ Hast Derg 1999; 42: 150-8.
10. Yüksel Ş, Öztürk MK, Çaksen H, Sümerkan B, Coşkun A. Sepsis tanısında akridin oranj lökosit sitospin testinin kullanılması. Yem Tıp Dergisi 1999; 16: 25-8.
11. Citron DM, Edelstein MAC, Garcia LS, Roberts GD, Thomson RB, Washington JA. Microorganism recounered in the cerebrospinal fluid. İn: Baron EJO, Peterson LR, Finegold SM eds. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9th ed. St Louis: Mosby, 1994: 210-8.
12. Blazevic DJ, Stempcer JE, Matson JM. Comparison of macroscopic examination, routine gram stains, and routine subcultures in the initial detection of positive blood cultures. Appl Microbiol 1974; 27: 537-9.
- B. Shanholtzer CI, Schaper PJ, Peterson LR. Concentrated Gram stain smears prepared with a cytospin centrifuge. J Clin Microbiol 1982; 16: 1052-56.
14. Mirrett S, Lauer BA, Miller GA, Relier LB. Comparison of acridine orange, methylene blue, and Gram stain for blood cultures. J Clin Microbiol 1982; 15: 562-6.
15. McCarthy LR, Senne JE. Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 1980; 11: 281-5.
16. Humprey AA. Use of the buffy layer in the rapid diagnosis of septicemia. Am J Clin Pathol 1944; 14: 858-62 (cited in Ref. 18).
17. Studer JP, Glauser MP, Schapira M. Value of examining buffy coats for intragranulocytic micro-organisms in patients with fever. Br Med J 1979; 1: 85-6.
18. Brooks GF, Pribble AH, Beaty HN. Early diagnosis of bacteremia by buffy-coat examinations. Arch Intern Med 1973; 132: 673-5.
19. Henrickson KJ, Powell KR, Ryan DH. Evaluation of acridine orange-stained buffy coat smears for identification of bacteremia in children. J Pediatr 1988; 112: 65-6.