

Endoftalmi Tanı ve Tedavisinin Yönlendirilmesinde Akridin Oranj

A DIRECT FLUORESCENCE STAINING: ACRIDINE ORANGE IN DIAGNOSIS AND EMPIRICAL TREATMENT OF ENDOPHTHALMITIS

Aysu KARATAY ARSAN*, Nilgün ACAR**, Esra ALP IŞIK***, Seyhan B. ÖZKAN****, Sunay DUMAN*****

* Op.Dr.,SB Ankara Hastanesi Göz Kliniği, Başasist.,
** Uz.Dr.,SB Ankara Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Şef Yrd.,
*** Uz.Dr.,SB Ankara Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Başasist.,
**** Op.Dr.,SB Ankara Hastanesi Göz Kliniği, Uzm.,
***** Op.Dr.,SB Ankara Hastanesi Göz Kliniği, Şefi, ANKARA

Özet

Direkt mikroskopik incelemenin çok önemli olduğu endoftalmi olgularında, ön kamara ve vitreustan alınan örnekler akridin oranj (AO) ve Gram boyası ile incelenip, kültür sonuçları ile karşılaştırılarak AO boyasının duyarlılığı araştırıldı. Akut postoperatif endoftalmi tanısı alan 22 hastada intraoküler örneklerden kültür ve direkt mikroskopik inceleme yapıldı. Ön kamara ve vitreus materyallerinde akridin oranj ve Gram ile boyanan preparatlar birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi. AO ile boyanan preparatlar floresan mikroskopta incelendi ve mikroorganizma görülen örneklerde aynı lamda Gram boyama yapılarak mikroorganizmanın Gram özelliği değerlendirildi. Yirmiiki endoftalmi olgusunun 19'unda (%86) kültürlerde mikroorganizma izolasyonu yapılırken, 3 olguda kültürde türeme olmadı. AO ile direkt mikroskopik olarak incelenen preparatların 18'inde (%82) , doğrudan Gram boyası ile boyanan preparatların ise 14'ünde (%64) mikroorganizma saptandı. Özellikle protein içeriği fazla olan pürülan örneklerde Gram boyamanın değerlendirilmesi güçlükler göstermektedir. AO ile mikroorganizmanın varlığı kanıtlandıktan sonra aynı preparatta Gram boyama yapılması değerlendirmeyi kolaylaştırıp, duyarlılığı artırmaktadır. Bu şekilde, AO yöntemi ile direkt mikroskopik inceleme yapılmasının acil tedavinin çok önemli olduğu bu olgularda ampirik tedavinin planlanmasını daha sağlıklı kılacağı düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Endoftalmi, Gram boyası, Akridin oranj

TKlin Oftalmoloji 1999, 8:15-18

Endoftalmi tedavisindeki gecikme, hem görme kaybı hem de medikolegal problemleri beraberinde getireceği için doğru, hassas ve hızlı tanısal testler çok önemlidir (1). Her şüphelenilen olguda intraoküler, özellikle

Geliş Tarihi: 28.08.1997

Yazışma Adresi: Dr.Aysu KARATAY ARSAN
Cemil Topuzlu cad. Yeşilkır sok.
11/10 Fenerbahçe, İSTANBUL

TKlin J Ophthalmol 1999, 8

Summary

Direct microscopic examination of intraocular specimens, particularly vitreous can provide a more rapid way to detect the responsible microorganism. The purpose of this study was to compare the sensitivity of acridine orange (AO) and Gram staining to determine whether AO offers any advantages. We made the direct microscopic examination and cultured the intraocular samples of 22 patients in whom acute postoperative endophthalmitis was diagnosed. Double smears of each specimen were prepared. After the AO-stained specimens had been examined on fluorescence microscopy, same specimens were stained with Gram. Overall, AO was more sensitive than the Gram stain (AO 82%, Gram stain 64%). While 19 of 22 cases were culture positive, no microorganism was identified in 3. We conclude that AO staining is a sensitive method especially for selected purulent specimens in which protein artefacts result in difficulties of interpretation. Reexamination of the positive smears with Gram stain to determine the morphology and Gram staining character of the responsible microorganism offers an additional advantage of AO staining.

Key Words: Endophthalmitis, Gram stain, Acridine orange

T Klin J Ophthalmol 1999, 8:15-18

de vitreus örneği almak esastır. Hızlı tanısal testlerden mikroskopik inceleme özellikle 5-10 dakika gibi kısa sürede hazırlanabildiği için acil tam ve tedavi gerektiren bu olgularda çok faydalıdır (2). Mikroskopik incelemede büyük çoğunlukla Gram ve Giemsa boyaarı kullanılmaktadır.

Bu çalışmada klinik bulguları ile akut endoftalmi tanısı konulmuş hasta grubunda ön kamara ve vitreustan alınan örneklerde yapılan akridin oranj (AO), Gram

boyama ve kültür sonuçları tanı ve ampirik tedavinin yönlendirilmesi açısından değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya S.B. Ankara Hastanesinde, Aralık 1992-Ocak 1996 yılları arasında akut postoperatif endoftalmi tanısı konmuş 22 hasta alındı. Olgulardan 10'u aynı hastanede opere edilmiş, 12'si ise değişik merkezlerden relere edilmişti. Olguların 17'si ekstrakapsüler katarakt ekstraksiyonu (EKKE) ve göz içi lensi (GİL) implantasyonundan, 2'si sekonder GİL implantasyonundan, 2'si EKKE, biri intrakapsüler katarakt cerrahisinden sonra izlendi.

Kültür alınımına bilateral olarak konjonktivallardan başlandı. Oksibuprokain hidroklorür ile topikal anestezi, %2 lignokain (%0.00125 epinefrinli) ile kapak ve retrobulber anestezi yapıldı. Ön kamara sıvısı aspirasyonu 27 G iğne kullanılarak limbusa yakın korneadan girilerek alındı. Arka kapsülün olmayan veya arka kapsülün bütünlüğünün bozulmuş olduğu olgularda aynı giriş yerinden, diğer olgularda ise pars planadan 22-23 G iğne ile 0.2-0.3 ml vitreus aspirasyonu yapıldı.

Alınan örneklerden, AO için teflon kaplı özel lama (Bio-Merieux), Gram için ise direkt lama yayma hazırlandı. Ardından ön kamara sıvısı ve vitreus aspirasyon materyali yaymalar ile birlikte klinik mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Mikrobiyolojik işlemler üç aşamada gerçekleştirildi.

Gram boyama: Alevde tespitten sonra Gram yöntemi ile boyanan preparatlar ışık mikroskopunda, immerasyon objektifinde, x1000 büyütmede incelendi.

Akridin Oranj boyama: Teflon kaplı lamlar pH=4 asetat tamponda hazırlanmış akridin oranj ile 1 dakika boyandı. Fluoresan mikroskopunda x100, x400, x1000 büyütmelerde incelendi. Mikroorganizma görülen lamlar Gram yöntemi ile tekrar boyandı. Işık mikroskopunda mikroorganizmanın Gram boyanma özelliği değerlendirildi.

Kültür: Her iki örnekten de % 5 koyun kanlı agar, çukulata agar ve EMB ağara direkt ekimler yapıldı. Aynı örnekler tiyoglikolatlı buyyonda zenginleştirilmeye alındı. Aerob ortamda, 37°C'da, 24 saat inkubasyondan sonra direkt ekimlerde elde edilen üremeler değerlendirildi. Üremenin olmadığı örneklerde zenginleştirici buyyondan aynı üç besi yerine pasajlar yapıldı. Zenginleştirme pasajları da 24 saat 37°C'da inkübe edildikten sonra değerlendirildi. İdentifikasyon klasik biyokimyasal testler ve yöntemlerle yapıldı.

Her iki örnekten de % 5 koyun kanlı ağara yapılan ikinci bir ekim BR38 (Oxoid) GasPackler ile sağlanan anaerob ortamda 37°C'da 48 saat inkübe edilerek anaerob

rob bakteri üremesi yönünden değerlendirildi. Yine örnekler Sabouraud besiyerine ekilerek mantar üremesi yönünden takip edildi.

Herbir incelemede ön kamara ve/veya vitreus aspirasyon örneğindeki pozitiflik anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Yirmiiki endoftalmi olgusunun 19'unda (% 86) kültürlerde mikroorganizma izole edilirken, 3 olguda kültürde üreme olmadı. İzole edilen mikroorganizmalar Tablo 1 'de gösterildi. Anaerob bakteri ve mantar üremesi olmadı.

AO ile floresan mikroskopta yapılan direkt mikroskopik incelemede vitreustan alınan örneklerin 18'inde (%82) mikroorganizma saptandı (Tablo 2). Ön kamaradan alınan örneklerin değerlendirilmesinde ise, 16 yaymada (%73) AO boyası ile mikroorganizma tespit edildi. AO ile boyama kalitesinin çok iyi olduğu gözlemlendi. Bakteriler parlak turuncu, inflamatuvar hücreler ise siyah zeminde açık yeşil-sarı izlendi.

Çoğu pozitif AO boyası düşük büyütmelemlerde (x100 ve x 400) değerlendirilebildi. İmmersiyon objektifinin x1000 büyütmesi mikroorganizmanın morfolojisini değerlendirmede ve preparata negatif tanısı koymadan önce şüpheli olanları ekarte etmede kullanıldı. Küçük büyütmede değerlendirme olanağı AO incelenmesinin daha hızlı yapılabilmesini sağladı. AO'dan sonra aynı preparatta Gram boyama yapılan tüm örneklerde in-

Tablo 1. Kültür pozitif 19 olguda izole edilen mikroorganizmaların dağılımı

Bakteri	Olgu Sayısı
Koagülaz (-) staphylococcus spp.	6
Streptococcus pneumonia	5
Staphylococcus aureus	2
Pseudomonas aeruginosa	2
Haemophilus influenzae	1
Enterobacter spp.	1
Streptococcus viridans	1
Enterococcus faecalis	1

Tablo 2. Endoftalmi olgularında vitreustan alınan örneklerde kullanılan yöntemlerin duyarlılıkları

Yöntem	Gerçek Pozitif n25	Duyarlılık %
AO boyası ile yayma	18	82
Gram boyası ile yayma	14	64
İntraoküler kültür	19	86

celeme, doğrudan Gram boyamaya alınan örnekler göre daha kolay değerlendirilebilir bulundu.

Sadece Gram boyama ile incelenen vitreus örneklerinin preparatlarının %64'ünde mikroorganizma saptanırken, ön kamaradan alınan örneklerin 13'ünde (%59) mikroorganizma tespit edildi. Her iki boyama yöntemi ve kültürün duyarlılık değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Kültürde plazma koagülaz negatif *Staphylococcus* spp. üreyen 2 olguda AO negatif iken, AO'da tespit edilen, Gram boyası ile de gram pozitif diplokok (pnömokok?) görülen bir olguda kültürde üreme olmadı. AO ile izlenirken Gram boyası ile görülemeyen mikroorganizmalar *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ile plazma koagülaz negatif stafilokok idi. İki olguda ise her üç yöntemle de mikroorganizma saptanamadı.

Tartışma

Erken tanı ve acil tedavinin çok önemli olduğu endoftalmi olgularında, son yıllarda özellikle intravitreal uygulamadan sonra, arka kutupta infarkt sahaları şeklindeki aminoglikozid toksisitesinin izlenmesi ile ampirik tedavide uygulanan aminoglikozidlerle ilgili yeni bir tartışma gündeme gelmiştir (3,4). Bazı yazarlar olası bir aminoglikozid toksisitesinden kaçınmak için gram negatif organizma saptanınca intravitreal aminoglikozid yapılmasını önermektedir (5).

Tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi endoftalimde de kesin tanı ve etkenin antibiyotik duyarlılık durumunun saptanmasında kültür referans yöntemidir. Ancak materyal miktarının oldukça kısıtlı olduğu bu enfeksiyonda, özellikle mikroorganizma sayısının da az olduğu olgularda zenginleştirme pasajları da gerekmektedir, dolayısıyla kesin tanının konması 24-48 saati bulabilmektedir. Ampirik tedavinin yönlendirilmesinde kültürün pek yararı olamaması mikroskopik inceleme yöntemlerini bir kere daha ön plana çıkarmıştır. Ancak kültür pozitif örneklerin sadece %68'inde Gram boyasının olumlu sonuç verdiği bildirilmektedir (6). Özellikle pürülan materyallerin yüksek protein içeriği yanıltıcı sonuçlarda rol oynamaktadır.

AO bakteri ve diğer hücrelerin nükleik asitlerini boyar. Bazal şartlar altında, ribonükleik asit turuncuya, deoksiribonükleik asit yeşile boyanır. AO boyası, klinik laboratuvarlarda çok çeşitli uygulama alanları olmakla birlikte, çoğu klinik mikrobiyolog tarafından önemi çok anlaşılammış bir boyadır (7,8). Çeşitli klinik materyallerde AO, Gram ile karşılaştırıldığında AOTn Gram'a göre daha duyarlı olduğu ancak her ikisinin de özgüllüğünün eşit olduğu bildirilmiştir (9). Çalışmamızda da AO boyası Gram'a göre daha duyarlı bulunmuştur.

Diğer bir üstünlüğünün ise, zeminin kontrast olması nedeniyle Gram'a göre özellikle pürülan örneklerde, yaymaların kolay yorumlanması olduğu düşünülmüştür. AO örneklerinde yanıltıcı sonuçlara yol açabilecek turuncu artefaktlara nadiren rastlanmıştır.

Dilüsyon çalışmaları, duyarlılığın alt sınırını AO için 10⁷ colony forming unit/ml ve Gram boyası için KP colony forming unit/ml olarak bildirmektedir (9,10). Bu şekilde AOTn tayin ettiği bakteri konsantrasyonu Gram boyasının 10 katı azdır. Bu dilüsyon çalışmaları, klinik olarak AOTn daha duyarlı olması ile de uyumludur.

AO boyasının kullanımı floresan mikroskopa ihtiyaç göstermektedir. Bu da yaygın kullanımını engellemektedir. Daha nadir olmakla birlikte yanlış yorumlamalar sorun oluşturabilir. Floresan mikroskopta çalışmış deneyimli elemanlara da ihtiyaç gösterir. İntegritesi bozulmuş lökositlerdeki granüller kok olarak yorumlanabilir veya ölü bakteri ve kontaminantlar da boya alabilir.

AO ile pozitif yaymalar mikroorganizmaların Gram reaksiyonunu belirlemek için Gram ile de boyanmalıdır. Aynı preparatın Gram ile de boyanabilmesi, özellikle materyalin çok kısıtlı olduğu endoftalmi olgularında önemli bir avantajdır. Bu yöntem ile her iki boyanın ard arda yapılıp incelenmesi 30-60 dakikalık bir sürede gerçekleşmiştir. Dolayısıyla ampirik tedavinin yönlendirilmesinde bu yöntem oldukça avantajlı gözükmektedir.

Sonuç olarak endoftalmi olgularında AO boyası, mikroorganizma tayininde Gram boyasına göre daha duyarlı bulunmuştur. Bu hızlı ve basit boyama yöntemi Gram ile tamamlayıcı kullanılabilir. Özellikle protein içeriği fazla olan pürülan örneklerde Gram boyamanın değerlendirilmesi güçlükler gösterir. AO ile mikroorganizma varlığı kanıtlandıktan sonra aynı preparatta Gram boyama yapılması değerlendirmeyi kolaylaştırıp duyarlılığı arttırmaktadır. Kültür kesin tanı için referans yöntemdir, ancak acil tanı ve ampirik tedavinin yönlendirilmesinde AO yöntemi ile direkt mikroskopik inceleme yapılmasının faydalı ve yeterli olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Speaker MG, Menikoff JA. Postoperative endophthalmitis: Pathogenesis, prophylaxis and management. *Int Ophthalmol Clin* 1993; 33:51-70.
2. Schulman JA, Fiscella RG, Peyman GA, Banihashemi A. Infectious endophthalmitis. *Current Opinion in Ophthalmology* 1990; 1: 389-95.
3. Verma L, Arora R, Sachdau MS. Macular infarction after intravitreal injection of amikacin. *Can J Ophthalmol* 1993; 28: 241-3.

4. Campochiara PA, Lim JL. The aminoglycoside toxicity study group: Aminoglycoside toxicity in the treatment of endophthalmitis. Arch Ophthalmol 1994; 112: 48-53.
5. Donahue SP, Kowalski RP, Eller AW, De Vara JM, Jewart BH. Empiric treatment of endophthalmitis. Are aminoglycosides necessary. Arch Ophthalmol 1994; 112: 45-7.
6. Bode DP, Gelender H, Forster RK. A retrospective review of endophthalmitis due to coagulase negative staphylococci. Br J Ophthalmol 1985; 69: 915-9.
7. Rushforth JA, Hoy CM, Kite P, Puntis JW. Rapid diagnosis of central venous catheter sepsis. Lancet 1993; 342: 402-3.
8. Merchant PA, Aggarwal SI, Diller KR, Bartels KA, Bovik AC. Three-dimensional distribution of damaged cells in cryopreserved pancreatic islets as determined by laser scanning confocal microscopy. J Microsc 1993; 169 (pt3) : 329-38.
9. Lauer BA, Reller LB, Mirnett 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.
10. Mc Carthy LR, Senne JE. Evaluation of acridine orange stain for the detection of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 1982; 15: 562-5.