

Viridans Grup Streptokok Tanımlamasında MALDI-TOF ve 16S rRNA Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of MALDI-TOF and 16S rRNA Methods in Identification of Viridans Group Streptococci

Serap SÜZÜK YILDIZ¹, Banu KAŞKATEPE², Salih ALTINOK¹, Mustafa ÇETİN³, Alper KARAGÖZ¹, Sümeyra SAVAŞ⁴

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara.

¹ Public Health Agency of Turkey, Department of Microbiology Reference Laboratories, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği, Ankara.

³ Ankara Numune Training and Research Hospital, Department of Cardiology, Ankara, Turkey.

⁴ TÜBİTAK BİLGEM Hesaplamalı Biyoloji İleri Genom ve Biyoenformatik Araştırma Merkezi, Kocaeli.

⁴ TUBITAK IGBAM Advanced Genomics and Bioinformatic Research Center, Kocaeli, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 21.11.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 02.01.2017

ÖZ

Enfektif endokardit etkeni olarak sıklıkla karşımıza çıkan viridans grup streptokoklar (VGS)'in doğru tanımlanması her zaman klinik mikrobiyoloji laboratuvarı için sorun oluşturmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları genellikle bu bakterilerin tanımlamasında konvansiyonel yöntemler ile birlikte yarı otomatize/otomatize sistemler ve moleküler yöntemleri kullanmaktadır. Son zamanlarda VGS tanısında "Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometre, Matriks Assisted Laser Ionization-Time of Flight" MALDI-TOF sistemlerinin kullanıldığı çalışmalar yayımlanmaktadır. Bu çalışmada, enfektif endokardit açısından riskli kişilerin ağız mikrobiyotasındaki VGS'lerin tanısında kullanılan konvansiyonel yöntemler, yarı otomatize ve MALDI-TOF MS sistemlerinin altın standart yöntem 16S rRNA dizi analizi ile karşılaştırarak performanslarının belirlenmesi ve elde edilen veriler doğrultusunda klinik mikrobiyoloji laboratuvarında VGS identifikasyonu için kullanılabilecek bir tanı algoritmasının oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmaya Şubat-Haziran 2015 tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Polikliniğine başvuran enfektif endokardit gelişme riski bulunan romatizmal kalp hastalığı, kapak hastalığı ve/veya prostetik kapağı olan hastaların ağız mikrobiyotasından elde edilen 51 VGS izolatu dahil edilmiştir. Bakterilerin izolasyonu için standart mikrobiyolojik yöntemler ile optokin ve safrada erime testi uygulanmıştır. Bakteriler API STREP (bioMérieux, Fransa) ve MALDI-TOF MS Bruker Microflex (Bruker Biotyper;

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Serap Süzük Yıldız, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Adnan Saygun Caddesi No: 55, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 565 5771, **E-posta (E-mail):** serapsuzuk@gmail.com

Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) yöntemleri ile tanımlanmıştır. Bakterilerin 16S rRNA dizi analizinde BSF-8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve BSR-534 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3') primerleri kullanılmıştır. ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) cihazı kullanılarak dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektroferogramlar, Seq Scape Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) programı ile analiz edilerek BLASTN (NCBI) programı ile GenBank referans dizileri ile karşılaştırılmıştır. Optokin ve safrada erime testleri sonucunda optokin ve safraya dirençli alfa hemolitik streptokokların API STREP sistemi ile 16 (%31.37)'sinin Mitis grubunda, 15 (%29.41)'inin Anginosus grubunda, 9 (%17.65)'ünün Salivarius grubunda, 7 (%13.73)'sinin Sanguinis grubunda ve 4 (%7.84)'ünün Bovis grubunda yer aldığı tespit edilmiştir. MALDI-TOF sistemi ile aynı izolatların 20 (%39.22)'sinin Mitis grubunda, 14 (%27.45)'ünün Anginosus grubunda, 13 (%25.49)'ünün Salivarius grubunda ve 4 (%7.84)'ünün Sanguinis grubunda yer aldığı tanımlanmıştır. 16S rRNA ile yapılan tanımlamada ise izolatların 25 (%49.02)'inin Mitis grubunda, 13 (%25.49)'ünün Anginosus grubunda, 12 (%23.53)'sinin Salivarius grubunda ve 1 (%1.96)'inin Sanguinis grubunda yer aldığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre MALDI-TOF MS sisteminde tanımlanan 33 (%64.70) izolatın, API STREP sisteminde tanımlanan 31 (%60.78) izolatın 16s rRNA dizi analizi yöntemi ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Mitis grubu için API STREP testinin duyarlılığı %48.00, özgüllüğü %84.62 olarak bulunurken, MALDI TOF MS'de duyarlılık %80.00, özgüllük %100 olarak bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda, VGS'ların tanısının karmaşık bir süreç olması nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bu izolatların tanımlamasında yöntemlerin tek başına yeterli olamayacağı ve MALDI-TOF MS sisteminin VGS tanısı için kullanılabilirliğini ancak, gerektiği durumlarda optokin testi ve/veya moleküler yöntemlere tanı algoritmasında yer verilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Viridans grups treptokok; MALDI-TOF; 16S rRNA dizi analizi.*

ABSTRACT

Accurate identification of viridans group streptococci (VGS) frequently encountered as a causative agent of infective endocarditis is always a challenge for the clinical microbiology laboratory. Clinical microbiology laboratories generally use semi automatic/full automatic systems, molecular methods and also conventional methods for the identification of these bacteria. There are recent published studies that have used MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Ionization Mass Spectrometry-Time of Flight) systems in the identification of VGS. The aim of the study was to compare the performance of the conventional methods, semi automatic and MALDI-TOF MS system used in identification of VGS in oral microbiota of persons under the risk of infective endocarditis, with the gold standard method 16S rRNA sequence analysis and to create a diagnosis algorithm for the identification of VGS in clinical microbiology laboratories according to the obtained data. The study was conducted with 51 VGS strains isolated from oral microbiota of the patients with rheumatologic cardiac, valve and/or prosthetic valve diseases, under the risk of development of infective endocarditis, who have admitted to Ankara Numune Training and Research Hospital, Department of Cardiology, between February-June 2015. Standard microbiology procedures, optochin susceptibility and bile solubility tests were done for the isolation of bacteria. Bacteria were also identified with APISTREP (bioMérieux, France) and MALDI-TOF MS Bruker Microflex (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) methods. BSF-8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and BSR-534(5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3') primers were used in the 16S rRNA sequence analysis of bacteria. ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used for the sequence analysis. Electropherograms were analyzed in SeqScape Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and compared with the reference sequences in GenBank with BLASTN (NCBI). According to the result of optochin and bile solubility tests, with API STREP system, 16 (31,37%) of the isolates were identified as Mitis group, 15 (29.41%) as Anginosus group, 9 (17.5%) as Salivarius group, 7 (13,73%) as Sanguinis group and 4 (7.84%) as Bovis group among optochin and bile resistant alpha hemolytic streptococci. Moreover, of the same isolates 20 (39.22%) were identified as Mitis group, 14 (27.45%) as Anginosus group, 13 (25.49%) as Salivarius group and 4 (7.84%) as Sanguinis group with MALDI-TOF

system. In the identification with 16S rRNA, 25 (49.02%) of the isolates were identified as Mitis group, 13 (25.49%) as Anginosus group, 12 (23.53%) as Salivarius group and 1 (1.96%) as Sanguinis group. According to the results, it was determined that 33 (64.70%) of the isolates identified in MALDI-TOF MS system and 31 (60.78%) of the isolates identified in API STREP system were compatible with 16S rRNA sequence analysis method. For Mitis group, API STREP test sensitivity was 48.00% and specificity was 84.62% and MALDI-TOF system sensitivity was 80.00% and specificity was 100%. As VGS identification is a complicated process, we believe a single method will be insufficient for the identification of these isolates in clinical microbiology laboratories. We suggest that MALDI-TOF system can be used for VGS diagnosis, however, optochin test and/or molecular methods should also be included in the diagnosis algorithm when necessary.

Keywords: *Viridans group streptococcus; MALDI-TOF; 16S rRNA sequence analysis.*

GİRİŞ

Oral streptokoklar büyük oranda viridans grup streptokok (VGS) üyesidirler ve bu bakteriler oral mikrobiyotanın baskın üyelerindendir¹. Viridans grup streptokoklar 16S rRNA dizi analizi çalışmalarından elde edilen verilere göre beş grupta toplanırlar. Gruplar ve bu gruplarda yer alan bazı bakteriler Tablo I'de yer almaktadır². vMikrobiyota elemanı VGS'ler düşük virülans özelliklerine karşın enfektif endokardit (EE), sepsis, bakteriyemi gibi ciddi enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkabilmektedir. Bu hastaların antibiyotik tedavilerinin planlanabilmesi için örneklerin tür düzeyinde tanımlanması önemlidir³. Bu grup bakterilerin halen taksonomik olarak tanımlanmasında sorunlar yaşanmaktadır⁴. Etkenin özellikle Mitis grup içinde yer alan *Streptococcus pneumoniae* olup olmadığının belirlenmesi çok önemlidir. Optokin ve safrada erime testleri çok yaygın olarak kullanılan güvenilir testler olmasına karşın testlerin değerlendirilmesi için 18-24 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulması testlerin en büyük dezavantajıdır⁵.

Tablo I. Viridans Grup Streptokokların Sınıflandırılması*

Grup	Örnek bakteriler
Mitis grubu	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> , <i>Streptococcus cristatus</i> , <i>Streptococcus peroris</i> ve <i>Streptococcus infantis</i>
Sanguinis grubu	<i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> ve <i>Streptococcus sinensis</i>
Anginosus grubu	<i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> ve <i>Streptococcus intermedius</i>
Mutans grubu	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus cricetus</i> , <i>Streptococcus downei</i> , <i>Streptococcus rattii</i> , <i>Streptococcus macacae</i> ve <i>Streptococcus ferus</i>
Salivarius grubu	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus ve stibularis</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Streptococcus hyointestinalis</i>

* Kaynak 2'den uyarlanmıştır.

Son yıllarda, özellikle ribozomal proteinler başta olmak üzere hücre proteinlerini baz alarak tanımlama yapan The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) cihazı mikroorganizmaların tanımlamasında sıklıkla kullanılan güvenilir bir sistemdir⁶. Sistemin konvansiyonel yöntemler ile kıyaslandığında hızlı, ucuz ve güvenilir olmak gibi birçok üstünlüğe sahip olduğu bildirilmekle beraber özellikle VGS'lerin tanımlanmasında moleküler yöntemler ile karşılaştırıldığında sorunlar olduğu belirtilmektedir⁷. Bu çalışma, EE gelişme riski olan hastaların ağız sürüntü örneklerinden elde edilen optokin ve safraya dirençli oral VGS tanımlanmasında yarı otomatize ve MALDI-TOF MS sistemlerinin 16S rRNA sonuçlarına göre performansını belirlemek ve laboratuvarlarda VGS tanısı için bir tanı algoritması oluşturmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastaların Belirlenmesi

Protez kapağı, kapak ve/veya romatizmal kapak hastalıkları olan, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Polikliniğine başvuran ve çalışma için örnek vermeyi kabul eden hastalar çalışmaya dahil edildi. Çalışma sürecinde son 15 gün içinde antibiyotik kullanan, immünsüpresif ve 18 yaşından küçük hastalar çalışma dışı bırakıldı. Şubat-Haziran 2015 tarihleri arasında çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan 51 hastadan örnek toplandı. Hastaya zarar vermeden steril eküvyon ile hastaların diş etleri ve bukkal mukozasından toplanan sürüntü örnekleri ekim yapılarına kadar Amies (Coban, İtalya) besiyerinde bekletildi.

Bakteri İzolasyonu

Amies besiyerindeki örnekler oda sıcaklığında bekletilmiş olan %5'lik koyun kanı içeren agara tek koloni düşecek şekilde ekildi. Ekimi yapılan plaklar %5 CO₂'li ortamda 35 ± 1°C'de 18 ± 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda %5 koyun kanlı plakta yaygın olarak üremiş olan alfa hemolitik kolonilerden tek koloni pasaj yapıldı. Gram boyamada gram pozitif kok görülen kolonilerin taze kültüründen optokin ve safrada erime testi çalışıldı. Optokin duyarlı ve safrada erime testi pozitif olan izolatlar *S.pneumoniae* olarak tanımlanarak çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilen optokin ve safraya dirençli 51 izolat çalışma gününe kadar -80°C'de skim milk besiyerinde saklandı. Tüm sistemlerin kalite kontrolü *S.pneumoniae* ATCC 49619 suşu ile yapıldı.

API 20 STREP ile Tanımlama

Üretici firma önerileri doğrultusunda bakterilerin API 20 Strep System (bioMérieux, Fransa) kiti ile bakteri tanımlaması yapıldı. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra yapılan değerlendirmeler web tabanlı apiWEB sistemi ile değerlendirildi.

MALDI-TOF MS Sistemi ile Tanımlama

Bakterilerin tanımlaması MALDI-TOF MS Bruker Microflex LT model Flex Control 3.0 yazılımı (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak yapıldı. Örneklerin hazırlanmasında direkt transfer metodu kullanıldı. 24-48 saatlik inkübasyon

sonunda tek koloniden küçük bir miktar tahta çubuk ile plakaya sürüldü ve üzerine 1 µl matris solüsyonu (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50 acetonitrile/%2.5 trifluoroacetic acid, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) eklendi. Sistemle çalışırken, lineer pozitif iyon modunda 2000-20.000 Da kütle aralığında, mikroorganizma tanımlama için optimize edilmiş uygun yöntem ile çift ölçümler gerçekleştirildi. İyon kaynağı olarak 340 nm’de, 60Hz’lik nitrojen lazer kullanıldı. Spektrumların elde edilmesi için her bir numunenin ölçümünde, toplamda 240 olacak şekilde 40’arlı paketlerden oluşan lazer atışları gerçekleştirildi. Her bir bakterinin tanımlaması yaklaşık 5 dakikalık bir süre içinde tamamlandı.

16S rRNADizi Analizi ile Tanımlama

Çalışmaya dahil edilen izolatların tür düzeyinde tanımlaması parsiyel 16S rRNA dizi analizi ile yapıldı. Çalışmada 16S rRNA’nın 526 baz çiftlik bölgesi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile üniversal primerler (BSF-8 (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) ve BSR-534 (5’-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3’)) kullanılarak amplifiye edildi⁸. PCR ürünleri, QIAquick PCR saflaştırma kiti (Qiagen, N.V. Hollanda) ile saflaştırıldı ve “BigDye Direct CycleSequencing Kit (AppliedBiosystems, ABD)” ile amplifiye edildi. Amplikonlar, “ABI PRISM 3100 AvantGenetic Analyzer (AppliedBiosystems,Foster City, CA, ABD)” cihazına yüklenerek dizi analizi gerçekleştirildi. Elde edilen elektroferogramlar, “SeqScape Software (Applied Biosystems Foster City, CA, ABD)” programı ile analiz edilerek BLASTN (NCBI) programı ile GenBank referans dizileri ile karşılaştırıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 20.0 (Inc. ABD) programı kullanılarak yapıldı. Testlerin duyarlılık ve özgüllüğü McNemar testi kullanılarak belirlendi.

BULGULAR

API 20 STREP yarı otomatize sistemden elde edilen sonuçlar apiweb sistemine yüklenerek %70’in üzerinde uyumlu olan sonuçlar alınmıştır. MALDI-TOF MS sistemi ile yapılan değerlendirmelerde > 1.7 skoru baz alınmış ve bu skorun üzerindeki tanımlamalar doğru olarak kabul edilmiştir.16S rRNA dizi analizi ile yapılan değerlendirmede GenBank’ta yayımlanmış dizi analizlerine göre $\geq$ %99 ve $\geq$ %96 oranında gen dizi benzerliği bulunan 51 VGS izolat tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bu değerlendirmelere göre, tür düzeyinde tanımlanmış olan VGS’lar gruplara ayrılmıştır ve testlerin performans değerlendirmeleri gruplar üzerinden yapılmıştır. Grupların tanı sistemlerine göre dağılımı Tablo II’de yer almaktadır. MALDI-TOF MS sistemi ile Mitis grup içindeki 2 (%10.0) izolat *S.pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Buna karşın, 16S rRNA dizi analizi ile yapılan çalışmada hiçbir izolat *S.pneumoniae* olarak tanımlanmamıştır. MALDI-TOF MS sistemi ve API 20 STREP Sistemleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların 16S rRNA tanımlanmasına göre duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değerleri Tablo III’te yer almaktadır.

Tablo II. VGS'nin Tanımlama Yöntemlerine Göre Dağılımı (n= 51)

Viridans grup streptokok	API 20 STREP n (%)	MALDI-TOF MS n (%)	16S rRNA dizi analizi n (%)
Mitis grup	16 (31.37)	20 (39.22)	25 (49.02)
Anginosus grup	15 (29.41)	14 (27.45)	13 (25.49)
Salivarius grup	9 (17.65)	13 (25.49)	12 (23.53)
Sanguinis grup	7 (13.73)	4 (7.84)	1 (1.96)
Bovis grup	4 (7.84)	-	-

VGS: Viridans grup streptokok.

Tablo III. 16S rRNA Sonuçlarına Göre MALDI-TOF MS ve API 20 STREP Sisteminin VGS Gruplarında Yöntemsel Karşılaştırması

Viridans grup streptokok	MALDI-TOF MS				API 20 STREP			
	Se	Sp	PPD	NPD	Se	Sp	PPD	NPD
Mitis grup	80.00	100.00	100.00	83.87	48.00	84.62	64.00	72.92
Anginosus grup	92.31	94.74	92.86	97.30	61.54	81.58	86.67	89.58
Salivarius grup	75.00	89.74	75.00	92.11	41.67	89.74	75.00	87.04

Se: Duyarlılık, Sp: Özgüllük, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer, VGS: Viridans grup streptokok.

TARTIŞMA

Literatürde VGS tanımlanmasına yönelik test performanslarının değerlendirildiği birçok benzer çalışma yer almaktadır. Viridans streptokok grubunun en önemli üyesi tartışmasız *S.pneumoniae* olup çalışmalar genellikle bu bakteri üzerinde yapılmıştır. Çalışmamızda özellikle konvansiyonel yöntemler ile *S.pneumoniae* olarak tanımlanmış olan isolatlar dışarıda bırakılarak test yöntemlerinin daha çok diğer VGS'nin tanımlanmasındaki performansını değerlendirmek amaçlanmıştır.

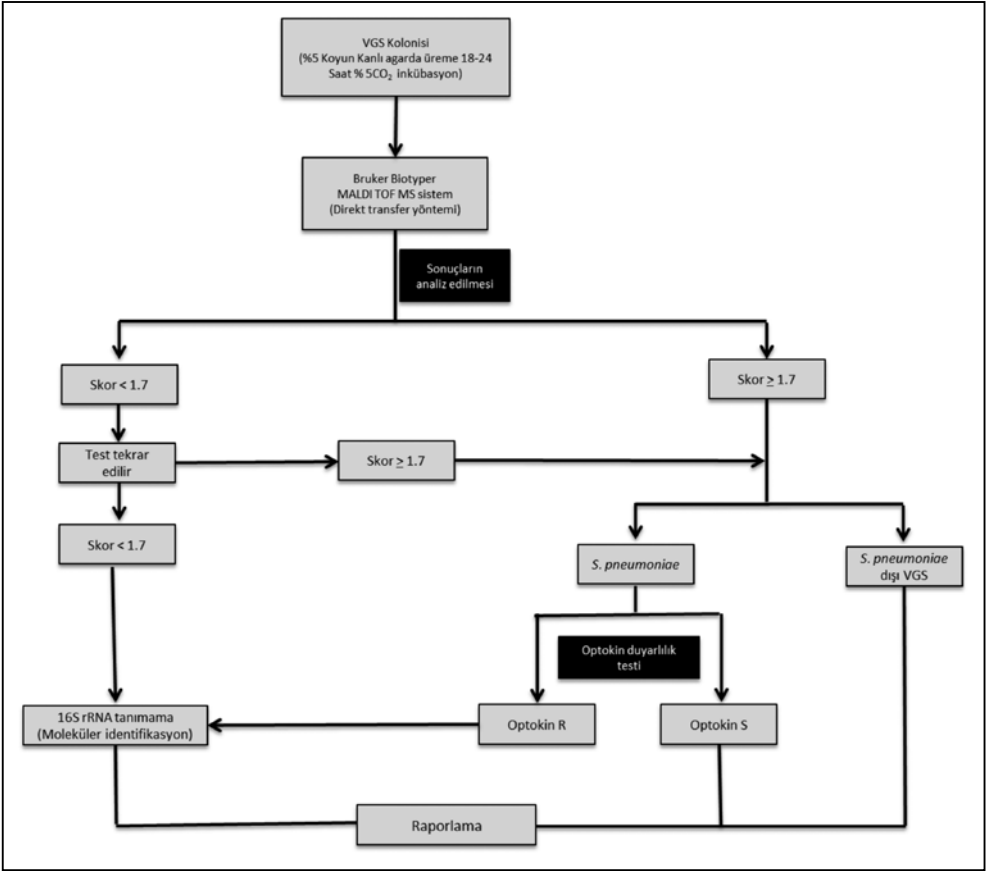
Ülkemizdeki klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri tanımlamasında yarı otomatize sistemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Her laboratuvarın ileri teknikleri kullanma olasılığı yoktur ve ayrıca her laboratuvarın otomatize ve moleküler yöntemleri kullanması maliyet etkin değildir. Bu çalışmada, 16S rRNA gen dizi analizi ile VGS bakterilerinin tanımlamasında kullanılan testlerin performansını değerlendirmeyi ve bu sistemleri kullanan laboratuvarlarda VGS tanımlamasında nasıl bir yol izlemeleri gerektiğini ortaya koymaya çalıştık.

Mitis grup, VGS'ler arasında klinik örneklerden en sık izole edilen grup olarak karşımıza çıkmaktadır^{9,10}. Çalışmamızda Mitis grubunun florada en yaygın olan VGS grubu olduğunu belirlenmiştir. Kan kültüründe etken olarak izole edilen VGS'lerin tanımlamasında API 20 STREP sisteminin kullanımının güvenilir sınırlarda olmadığı söylenebilir^{11,12}. Elde edilen verilere göre, VGS tanımlamasında yarı otomatize sistem kullanan laboratuvarların raporlarını bir ön rapor olarak hazırlamaları ve isolatları bir referans laboratuvara göndererek doğrulama yapılması daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında hızlı tanı testlerinin yeri gün geçtikçe artmaktadır. Çünkü enfeksiyonlu bir hastanın tedavisinin doğru yönetilmesi için hız bir zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amaçla, MALDI-TOF MS sistemleri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanıma girmiştir. Hızlı tanı testi olması ve bunun bir sonucu olarak mortalite ve hasta yatış süresinde azalmaya katkıda bulunduğu kaçınılmaz bir gerçektir¹³. Bu çalışmada, MALDI-TOF MS sisteminin özellikle Mitis grubu ve Anginosus grubu tanısı için kabul edilebilir güven aralığında yer aldığı söylenebilir. Özellikle bu iki grubun VGS enfeksiyonlarında görülen en sık etkenler olması bu yöntemin kabul edilebilirliğini de arttırabilir.

Bu çalışmada, optokin duyarlı ve safrada erime testleri ile tanımlanan *S.pneumoniae* izolatları çalışma dışında tutulmuştur. BrukerBiotyper MS sisteminde *S.pneumoniae* izolatu için skorun > 2 olması durumunda bile izolatu mutlaka ya optokin duyarlılığının belirlenmesi ya da dizi analizi ile doğrulanması gerekmektedir¹⁴. 16S rRNA dizi analizi çalışmalarında *S.pneumoniae*, *S.pseudopneumoniae*, *S.mitis* ve *S.oralis* ile çok yüksek benzerlikler göstermekte olup, tür düzeyinde tanımlama oldukça zor olmaktadır^{15,16}. Son zamanlarda yapılmış olan çalışmalar, *S.pneumoniae*'nin 16S rRNA gen dizisinde 203. pozisyonda bir sitozin içerdiğini, diğer Mitis grubu üyelerinde bu pozisyonda adeninin yer aldığı bildirilmektedir^{14,17}.

VGS'lerin tür düzeyinde doğru tanımlanması patojenite ve virülans faktörlerinin belirlenmesi için de önemlidir. Bu durum, özellikle *S.pneumoniae*'nin içinde yer aldığı Mitis grubunun tanımlanmasında daha büyük bir önem taşımaktadır. BrukerBiotyper MS sisteminde pnömokok olmayan izolatların sıklıkla *S.pneumoniae* olarak tanımlandığı ve bu sistemin özellikle bu grup için performansının düşük olduğu bildirilmektedir^{11,18}. Çalışmamızda optokin duyarlı pnömokok izolatları çalışmanın başında dahil edilmediği için sistemin performansının Mitis grup için bu nedenle çok düşük bulunmadığını düşünüyoruz. Doğrudan transfer yöntemi ile *S.pneumoniae*, *S.mitis* ve *S.oralis* tanımlamasının yapıldığı bir çalışmada, tanı olasılığını arttırmak için referans suşlar ile bir kütle spektrum modeli geliştirilmiş ve doğrudan transfer yönteminde doğru tanımlama oranının %66.7'den, %100'e yükseldiği saptanmıştır¹⁹. Bilindiği üzere, dizi analiz yöntemleri hem çok pahalı hem de zaman alıcı yöntemlerdir. Optokin testi ise ucuz ve rutin laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılabilecek bir test olup çok nadiren yanlış bakteri tanımlamasına neden olmaktadır²⁰. VGS için hızlı tanı testlerinin güvenilirliğini arttırmaya yönelik tanı algoritmalarının hazırlanmasının ya da spektrum modeli geliştirilmesinin faydalı olacağı kanısındayız. Klinik laboratuvarında VGS'nin tanımlanması amacıyla elde edilen veriler doğrultusunda başka bir çalışma sonucunda oluşturulan tanı algoritmasının bizim verilerimizle de uygun olduğu bulunmuştur¹⁴. Çalışmadan ve elde edilen verilerden esinlenerek hazırlanan tanı algoritması Şekil 1'de yer almaktadır. Algoritmaya göre MALDI-TOF MS sisteminde tanı skoru ≥ 1.7 olan tanımlamaların *S.pneumoniae* hariç raporlanabileceği, ancak *S.pneumoniae* için skorun > 2 olması durumunda bile, mutlaka optokin duyarlılığının gösterilmesi gerektiği belirtilmiştir. Skoru < 1.7 olan tanımlamalar için aynı yöntem ile testin tekrar edilmesi ve skoru > 2 olan optokine dirençli bulunan *S.pneumoniae* izolatları için ise 16S rRNA dizi analizi sonucuna göre raporlandırmanın yapılması gerektiği kanısındayız.



Şekil 1. VGS'lerin MALDI-TOF MS sistemi ile tanımlama algoritması (Kaynak 14'ten esinlenerek hazırlanmıştır).

VGS tanısı karmaşık bir süreç olup, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bu izolatların tanısında yöntemlerin tek başına kullanımının yeterli olamayacağını düşünüyoruz. MALDI-TOF MS ve API STREP sistemleri kullanıldığında konvansiyonel yöntemler ve/veya moleküler yöntemlere de tanı algoritmasında yer verilmeli ve gerektiğinde referans laboratuvarlarda izolatların doğru tanımlanması gerçekleştirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Whiley RA, Fraser HY, Douglas CWI, et al. *Streptococcus parasanguis* sp. Nov.: An atypical viridans Streptococcus from human clinical specimens. FEMS Microbiol Lett 1990; 56(1-2): 115-21.
2. Ergin A. Viridans streptokokların laboratuvar tanısında klasik ve yeni yaklaşımlar. Mikrobiyol Bul 2010; 44(3): 495-503.
3. Doern CD, Burnham CA. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. J Clin Microbiol 2010; 48(11): 3829-35.
4. Teles C, Smith A, Ramage G, Lang S. Identification of clinical lyrele vantviridans group streptococci byphenotypic and genotypicanalysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(2): 243-50.
5. Kellogg JA, Bankert DA, Elder Carol J, Gibbs J, Smith MC. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. J Clin Microbiol 2001; 39: 3373-5.

6. Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, et al. Utility of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. J Clin Microbiol 2011; 49(8): 2980-4.
7. Sasaki E, Osawa R, Nishitani Y, Whiley RA. Development of a diagnostic PCR assay targeting the *sodA* gene for identification of *Streptococcus gallolyticus*. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1360-2.
8. Kemp M, Bangsbo J, Kjerulf A, et al. Advantages and limitations of ribosomal RNA PCR and DNA sequencing for identification of bacteria in cardiac valves of Danish patients. Open Microbiol J 2013; 7: 146-51.
9. Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. Clin Microbiol Infect 2013; 19(11): 1066-71.
10. Angeletti S, Dicuonzo G, Avola A, et al. Viridans Group Streptococci clinical isolates: MALDI-TOF mass spectrometry versus gene sequence-based identification. PLoS One 2015; 10(3): e0120502-12.
11. López Roa P, Sánchez Carrillo C, Marín M, Romero F, Cercenado E, Bouza E. Value of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight for routine identification of viridans group streptococci causing blood stream infections. Clin Microbiol Infect 2013; 19(5): 438-44.
12. Chang YC, Lo HH. Identification, clinical aspects, susceptibility pattern, and molecular epidemiology of beta-haemolytic group G *Streptococcus anginosus* group isolates from central Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 76(3): 262-5.
13. Angeletti S. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. J Microbiol Methods 2016; 70(12): 30253-6.
14. Zhou M, Yang Q, Kudinha T, et al. Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Complemented with Selected 16S rRNA and *gyrB* Genes Sequencing to Practically Identify Clinical Important Viridans Group Streptococci (VGS). Front Microbiol 2016; 7: 1328-35.
15. Suzuki N, Seki M, Nakano Y, Kiyoura Y, Maeno M, Yamashita Y. Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci by genomic subtractive hybridization. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4528-34.
16. Haanperä M, Jalava J, Huovinen P, Meurman O, Rantakokko-Jalava K. Identification of alpha-hemolytic streptococci by pyrosequencing the 16S rRNA gene and by use of VITEK 2. J Clin Microbiol 2007; 45(3): 762-70.
17. Scholz CF, Poulsen K, Kilian M. Novel molecular method for identification of *Streptococcus pneumoniae* applicable to clinical microbiology and 16S rRNA sequence-based microbiome studies. J Clin Microbiol 2012; 50(6): 1968-73.
18. Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, et al. Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. Infect Genet Evol 2011; 11(7): 1709-15.
19. Chen JH, She KK, Wong OY, et al. Use of MALDI Biotyperplus Clin Pro Tools mass spectra analysis for correct identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis/oralis*. J Clin Pathol 2015; 68(8): 652-6.
20. Ko KS, Oh WS, Peck KR, Lee JH, Lee NY, Song JH. Phenotypic and genotypic discrepancy of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Asian countries. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45(1): 63-70.