

MALDI-TOF MS'nin EMB Agarda Üreyen Gram-negatif Bakterileri Tanımlama Performansı: Tanı Etkinliğini Arttıran Basit Bir Yöntem

Performance of MALDI-TOF MS for the Identification of Gram-negative Bacteria Grown on Eosin Methylene Blue (EMB) Agar: A Simple Method for Improving the Effectiveness of Identification

Yusuf YAKUPOĞULLARI¹, Barış OTLU¹, Betül ÇELİK¹, Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ²

¹ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

¹ İnönü University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı, Malatya.

² İnönü University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics and Medical Information, Malatya, Turkey.

Makale Atfı: Yakupoğulları Y, Otlı B, Çelik B, Gözükara Bağ HG. MALDI-TOF MS'nin EMB Agarda Üreyen Gram-negatif Bakterileri Tanımlama Performansı: Tanı Etkinliğini Arttıran Basit Bir Yöntem. Mikrobiyol Bul 2019;53(1):1-11

ÖZ

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), bakteriyel ve fungal patojenleri doğru ve hızlı tanımlaması nedeniyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımı artan yeni bir yöntemdir. Ancak, bu yöntemle yapılacak tanımlamalarda günümüze kadar tek bir gram-negatif seçici besiyerinin önerilmiş olması rutin klinik tanıda bazı sorunlara neden olmaktadır. EMB agar, yaygın olarak kullanılan geleneksel bir gram-negatif seçici besiyeri olmakla birlikte MALDI TOF MS'nin bu besiyerinde üreyen gram-negatif bakterileri tanımlama etkinliği hakkında bilimsel literatürde bilgi yoktur. Bu çalışmada, MALDI-TOF MS'nin EMB agarda üreyen gram-negatif bakterileri tanımlama performansının saptanması ve bu performansı arttırıcı basit ve hızlı bir örnek hazırlama yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Toplam 20 farklı cins ve 37 farklı türden olmak üzere 468 gram-negatif klinik izolat çalışmaya alınmıştır. İzolatların EMB agarda üreyen kolonileri hem direkt ve hem de iki aşamalı koloni yıkama işlemi (bir kez serum fizyolojik, üç kez %70 etanol ile yıkama) sonrasında Vitek MS (Bio Mérieux, Fransa) MALDI-TOF MS cihazı ile tanımlanmıştır. Her iki tanımlamaya ait veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. EMB agar besiyerinden direkt okumada, çalışılan 468 izolatın 382'si (%81.6) tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır, 80 (%17) izolat tanımlanamamış ve 6 (%1.2) izolat (dördü cins düzeyinde) ise yanlış tanımlanmıştır. Direkt okumada MALDI-TOF MS'in tanı performansı *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* spp. ve *Proteus mirabilis*'in de içinde bulunduğu 14 tür için mükemmel (%100) iken, en düşük tanı performansı *Providencia* spp. (%62.5), *Escherichia coli* (%70.5) ve *Acinetobacter* spp. (%70.7) için saptanmıştır. Ortalama 20 dakika süren ve basit laboratuvar malzemeleri ile gerçekleştirilebilen yıkama işlemi sonrası, 434 (%92.7) izolat tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır, 30 (%6.4) izolat tanımlanmamıştır ve 4 (%0.85) izolat (ikisi cins düzeyinde) ise yanlış tanımlanmıştır. İstatistiksel veri analizi, tanımladığımız koloni yıkama işleminin besiyerinden yoğun boya absorbe eden

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Yusuf Yakupoğulları, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 505 278 2275, **E-posta (E-mail):** yusufyakoup@yahoo.com

E.coli ve *A.baumannii* gibi türler başta olmak üzere EMB agarda üreyen gram-negatif bakterilerin MALDI-TOF MS ile tanımlama oranını toplamda anlamlı düzeyde arttırdığını göstermiştir ($p=0.001$). Bu çalışmada, kütle spektrometrik tanımlamaya uygunluğu hakkında bu güne kadar veri bulunmayan EMB agarın, MALDI-TOF MS ile yapılacak bakteriyel tanımlamada kullanılabileceği ve EMB besiyerinden direkt okumada tanımlanamayan gram-negatif bakterilerin burada açıkladığımız koloni yıkama işlemi sonrasında tanımlanabilecekleri ortaya konulmuştur. Farklı besiyeri alternatiflerinin belirlenmesi, MALDI-TOF MS'nin mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha etkin kullanımına katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: EMB agar; MALDI-TOF MS; Gram-negatif bakteri.

ABSTRACT

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a new method that is increasingly used in microbiology laboratories due to its ability of reliable and rapid identification (ID) of bacteria and fungi. However, some problems emerge in the routine clinical diagnosis since only one gram-negative selective medium has been suggested up to date. Though EMB agar is one of the traditional gram-negative selective media, there is no data in the scientific literature, about the ID performance of MALDI TOF MS with the gram-negative bacteria grown on this medium. In this study, we tested the ID performance of MALDI-TOF MS for gram-negative isolates on EMB agar and aimed to develop a rapid and easy sample preparation method for improving this performance. A total of 468 clinical isolates of gram-negative bacteria, consisting of 37 different species from 20 genera, were included in this study. The isolates were identified using the Vitek MS MALDI-TOF MS (Bio Mérieux, France) both directly from EMB agar, and also through a two-step colony washing (once with physiologic saline, and three times with 70% ethanol) method. The performances of these two IDs were compared. In the direct reading from EMB medium, 382 (81.6%) of 468 studied isolates were correctly identified at species level; no ID was detected for 80 (17%) isolates, and 6 (1.2%) isolates (four at the genus level) were misidentified. Performance of MALDI-TOF MS directly from EMB agar was excellent (100%) for 14 species including *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*; and lowest for *Providencia* spp. (62.5%), *Escherichia coli* (70.5%) and *Acinetobacter* spp. (70.7%). Following the washing procedure which was performed about 20 min with simple laboratory equipment, 434 (92.7%) isolates were correctly identified at species level; 30 (6.4%) strains could not be identified, and four (0.85%) isolates (two at the genus level) were misidentified. Statistical analyses indicated that the washing procedure defined here significantly increased the overall ID performance of MALDI-TOF MS with EMB agar ($p=0.001$), particularly with improving the IDs of those markedly dye-absorbing genera, such as *E.coli* and *A.baumannii*. In this study, EMB agar which has no data until today on its suitability for mass spectrometric identification has been shown to be useful for bacterial identification with MALDI-TOF MS. In addition, the unidentified gram-negative bacteria in the direct reading from the EMB medium have been shown to be identified after the colony washing method as described here. Determination of the different medium alternatives will contribute to effective usage of MALDI-TOF MS in microbiology laboratories.

Keywords: EMB agar; MALDI-TOF MS; Gram-negative bacteria.

GİRİŞ

Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), 2009 yılından beri rutin klinik tanıya girmiş yeni bir mikroorganizma tanımlama yöntemidir. Bu yöntemde, bakteri veya mantarların ribozomal proteinleri matris ile iyonize edilerek uçurulmakta, proteinlerin uçuş zamanına göre moleküler kütleleri hesaplanmakta ve test edilen mikroorganizmanın protein spektrumu elde edilerek tanımlanmaktadır. Böylelikle, günümüzde 1000'den fazla klinik olarak önemli bakteri ve mantar türünün adlandırılması, IVD ve CE sertifikalı olarak dakikalar içinde gerçekleştirilmekte-

dir¹. Yapılan çalışmalarda, bu yöntemin performansı hakkında tatmin edici sonuçlar bildirilmiş olup MALDI-TOF MS'nin gram-pozitif, gram-negatif, aerobik ve anaerobik bakteri, mikobakteri ve mantarları referans yöntemi ile %90-100 düzeyinde uyumlu olarak doğru tanımladığı saptanmıştır^{2,3}.

"Eosin methylene blue (EMB)" agar, gram-negatif bakteriler için seçici ve ayırt edici bir besiyeridir. Yaklaşık 100 yıl önce Levine⁴ tarafından geliştirilen bu besiyeri, ülkemizde en çok kullanılan gram-negatif seçici besiyeridir ve tüm dünyada mikrobiyoloji laboratuvarlarında halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu besiyerinde bulunan eozin Y ve metilen mavisi boyaları (6/1) gram-pozitif bakterilerin üremesini baskımlarken *Enterobacteriaceae* üyeleri ve birçok gram-negatif non-fermentatif bakterinin üremesini desteklemektedir. Üreyen bakteri türleri, metabolik özelliklerine göre besiyerinde bulunan bu iki boya maddesini farklı düzeylerde absorbe ederek kendilerine özgü koloni morfolojisi oluşturur. Bu özellik, *Escherichia coli* gibi bazı bakterilerin erken tanısına olanak sağlarken, aynı zamanda çoklu gram-negatif üremelerinde farklı patojen kolonilerinin ayırt edilmesini de sağlar.

MALDI-TOF MS ile tanımlanacak bakteriler için önerilen üretilme ortamları belirlenmiştir. Bakteriler için toplam yedi farklı besiyeri önerilmekte olup gram-negatif bakteriler için sadece bir seçici besiyeri (MacConkey agar) bu amaçla referans olarak önerilmektedir¹. Bu durum rutin laboratuvar uygulamalarında bazı sorunlara yol açmaktadır. Örneğin; sadece MALDI-TOF MS için mikrobiyologların besiyeri kullanım tercihlerini değiştirmeleri gerekmektedir. Bazı kullanıcılar bunun yerine, üreticiler tarafından referans verilmiş olan kanlı agar besiyerinden MALDI-TOF MS tanımlaması yapmayı yeğlese de özellikle birden fazla gram-negatif bakteri türünün ürettiği örneklerde, kanlı agarda üreyen farklı gram-negatif kolonilerin birbirinden ayrıştırılmasında sorun yaşanmaktadır. Böyle bir durumda EMB agar besiyerinde üreyen farklı gram-negatif kolonilerden kanlı agara pasaj yapılarak bu sorun giderilmeye çalışılmasına rağmen MALDI-TOF MS'nin klinik tanıya kattığı en önemli avantaj olan "hızlı tanı" özelliği kaybedilmektedir. Buna karşın, bazı laboratuvarlar EMB agar besiyerinden direkt olarak MALDI-TOF MS tanımlama yapmakta ancak elde edilen sonuçların doğruluğu hakkında önemli bir veriye sahip bulunulmamaktadır. Ayrıca, MALDI-TOF MS için farklı besiyeri alternatiflerinin belirlenmesi hem mikrobiyolojik tekniklerin geliştirilmesi hem de geleceğin klinik tanısı için ümit vadeden bu yöntemin kullanım potansiyelinin artırılması adına önemlidir.

Bu çalışmada, MALDI-TOF MS'nin EMB agarda üreyen gram-negatif bakteri tanımlama performansının saptanması amaçlanmış ve özellikle kolonilerin üreme döneminde besiyerinden absorbe ettiği boyaların uzaklaştırılması amacına dayanan basit bir koloni yıkama yöntemi geliştirerek tanı performansının artırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, özellikle EMB agar tercihi devam eden veya sınırlı mali kaynaklar nedeniyle farklı seçici ve ayırt edici besiyeri alımını planlamayan mikrobiyoloji laboratuvarları için daha fazla önem arz etmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Planı

Bu çalışma, prospektif olarak 1200 yataklı bir üniversite hastanesinin mikrobiyoloji laboratuvarında yapıldı. Aralık 2016-Haziran 2017 tarihleri arasında rutin klinik örneklerden elde edilen toplam 468 gram-negatif izolat çalışıldı. Aynı hastanın yalnız bir izolatu çalışmaya dahil edildi.

Kültür ve Tanımlama

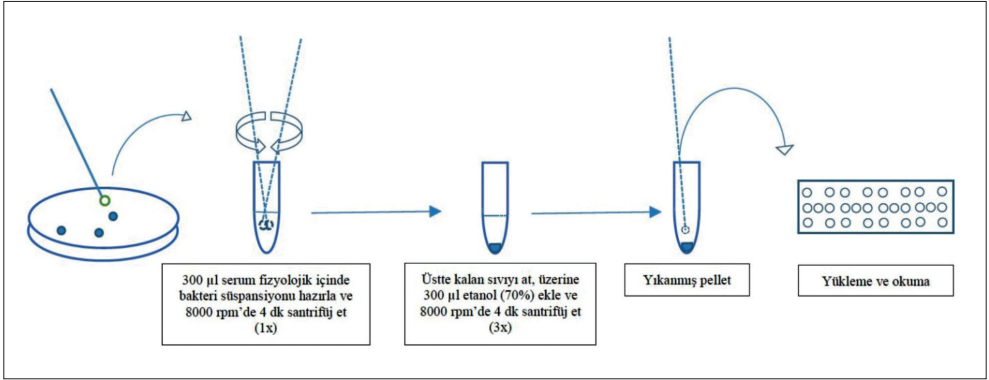
İdrar, kan, balgam, pü, sürüntü, beyin omurilik sıvısı (BOS), dışkı, eklem sıvısı ve kateterden oluşan klinik örnekler %5 koyun kanlı agar ve EMB agar besiyerlerine (Oxoid, Birleşik Krallık); gerektiğinde çikolata agar, Sabouraud dektroz agar (SDA) ve Salmonella-Shigella (SS) agar (Oxoid, Birleşik Krallık) besiyeri de kullanılarak ekildi. Plaklar 35°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. Üreyen gram-negatif bakteriler klasik bakteriyolojik yöntemler⁵, MicroScan WalkAway 96 Plus (Backman Coulter Inc., ABD) otomatik tanımlama cihazı ve Vitek MS (Bio Mérieux, Fransa) MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde tanımlandı.

Tam olarak tanımlanamayan veya tanısında uyumsuzluk bulunan izolatların tanısı 16S rDNA dizileme yöntemi ile yapıldı. Kısaca, "broad-range eubacterial primer"ler kullanılarak 16S rDNA'ya ait 800 baz çiftlik bölge PCR ile çoğaltıldı ve ampliconlar %2'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldı. Qiaquick PCR kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile saflaştırılan ampliconların, "Bigdye Terminator V3.1 cycle" dizileme kiti kullanılarak ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında dizi analizi gerçekleştirildi. Elde edilen dizi verisi blast sunucusunda (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) bulunan BLASTn programına yüklendi, MegaBLAST algoritma ve nükleotit toplama (nr/nt) taramaları seçildi. Sorgu kapsamı %99, E-değeri 0.0 ve maksimum tanım %99 olarak kabul edilerek izolatlar tanımlandı.

Bir izolat tanımlandıktan sonra bu türün EMB agardaki kolonilerden hem direkt olarak ve hem de yıkama işlemi sonrası MALDI-TOF MS tanımlaması yapıldı. Kısaca, 1 µl steril öze ile alınan bakteri kolonisi çelik hedef plaktaki okuma halkasına usulüne uygun olarak sürüldü ve üzerine 1 µl matris çözeltisi (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA) eklenerek cihaza yüklendi. Her izolat 100 lazer atışı ile Vitek MS (Bio Mérieux, Fransa) cihazı ile "In Vitro Diagnostic (IVD)" modülü V3.0 veri tabanı ile tanımlandı. *E.coli* ATCC 8739 iç kalite kontrol ve sistem kalibratörü olarak kullanıldı.

Yıkama İşlemi

Steril bir öze yardımıyla EMB agarda üreyen bakteri kolonilerinden 1-4 adet alındı ve 1.5 ml steril propilen mikrosantrifüj tüp içinde bulunan 300 µl steril fizyolojik tuzlu suda süspanse edildi. Tam olarak homojen dağılmayan örnekler 1-3 dakika vortekslenerek homojenize edildi. Tüpler 8000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı pipetle aspire edilerek atıldı. Daha sonra her tüp içine 300 µl etanol (%70) eklenerek bakteriler tekrar



Şekil 1. Yıkama işlemi iş akışı.

homojenize edildi. Tam olarak homojen dağılmayan örnekler 1-3 dakika vorteks karıştırıcı ile homojenize edildi. Tüpler 8000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi ve bu işlem 2 kez daha tekrarlandı. Son santrifüj sonrası üstteki sıvı atıldı ve dipteki yıkamış bakteri çözeltisinden 1 µl steril öze ile örnek alınarak okuma plağı üzerindeki halkaya sürüldü. Matris çözeltilisi uygulaması sonrası yukarıda detayları verildiği şekilde bakteri tanımlaması yapıldı.

Yıkama işleminin iş akışını gösteren şema Şekil 1'de gösterilmiştir.

Veri Analizi

Çalışılan türlerin EMB agardan direkt ve yıkama sonrası elde edilen tür düzeyinde tanımlama oranları hesaplandı. Kalitatif veriler sayı ve oran olarak ifade edildi. McNemar test ile her iki okuyuşa ait veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Tüm analizler için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Yirmi farklı cins ve 37 farklı türden olmak üzere toplam 468 gram-negatif klinik izolat çalışılmıştır. Bunlardan 275'i *Enterobacteriaceae* ailesinden (12 cinsten 22 farklı tür) geri kalan 193 izolat ise sekiz farklı cinsten 14 farklı tür olmak üzere aerobik gram-negatif basil olarak belirlenmiştir.

EMB agardan direkt MALDI-TOF MS okumasında, 468 izolatın 382'si (%81.6) tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır. Cihaz, 80 (%17) izolatı zayıf spektrum nedeniyle tanımlayamamıştır ve dördü cins düzeyinde olmak üzere toplam altı (%1.2) izolat ise yanlış tanımlanmıştır. Bu okumada *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* spp. ve *Proteus mirabilis* başta olmak üzere 14 farklı türün hepsi tam olarak (%100) tanımlanırken en düşük tanı oranı *Providencia* spp. (%62.5), *E.coli* (%70.5) ve *Acinetobacter* spp. (%70.7) türlerinde saptanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 434 (%92.7) izolat doğru tanımlanmıştır, 30 (%6.4) izolat zayıf spektrum nedeniyle tanımlanmamıştır ve ikisi cins düzeyinde olmak üzere toplam dört (%0.85) izolat ise yanlış tanımlanmıştır.

İstatistiksel çalışma, yıkama işleminin cihazın EMB agardan yapılan tanımlama performansını toplamda anlamlı düzeyde arttırdığı göstermiştir (%81.4 vs. %92.7, $p=0.001$). Yıkama sonrasında çalışılan 20 gram-negatif bakteri cinsinin 12'sinde doğru tanı oranının arttığı saptanırken bunlardan *Acinetobacter* spp. (%70.7 vs. 87.8; $p=0.001$) ve *E.coli*'de (%70.5 vs. %88.6; $p=0.001$) görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Bu çalışmaya alınan bakteri türleri ve EMB agardan direkt ve yıkama sonrası elde edilen tanımlama oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Gram-negatif bakteriler, hem hastane hem de toplum kökenli enfeksiyonların önemli patojenleridir. Çalışmalarda, *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ile *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. gibi fermentatif olmayan etkenlerin sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda en sık görülen ilk beş etken arasında olduğunu ve bunların tüm hastane enfeksiyonlarının %60'ından fazlasına neden olduğu bildirilmiştir⁶⁻⁹.

Klinik uygulamada gram-negatif enfeksiyonların yönetimi; patojen tür sayısının fazla olması, türlerin taşıdığı farklı doğal direnç özellikleri sonucu farklı antimikrobiyal tedaviler gerektirmeleri ve hızla artan kazanılmış antimikrobiyal direnç nedeniyle sorunludur^{10,11}. Bu tür etkenlerin tanımlanma sürecinin kısaltılması uygun tedavinin erkenden başlanması açısından önemli olup uygun antimikrobiyal tedavinin erken başlanması ile pozitif bulunan hasta sonuçları arasında güçlü ilişki bulunduğu bildirilmektedir¹². Ayrıca, patojenlerin erken tanısı hastane enfeksiyon kontrol önlemleri açısından da önemli olup özellikle salgın dönemlerinde en uygun enfeksiyon kontrol tedbirlerinin erkenden alınarak patojenin yayılımı sınırlandırılmasına olanak tanınabilmektedir. Dolayısıyla gram-negatif bakterilerin erken ve doğru tanısı sadece mikrobiyologlar için değil aynı zamanda kritik hasta tedavisi ile ilgilenen diğer tıp branşları için de güncel bir konu olmuştur. Bu bilgiler ışığında, MALDI-TOF MS'nin son yıllarda kullanıma girmesi ile birkaç gün sürebilecek tanımlama işlemlerini beş dakikadan kısa sürede; ayrıca daha az iş gücü ve daha az kimyasal kit tüketerek ve laboratuvar çalışanlarının daha az patojen maruziyeti ile tamamlanması olası hale gelmiştir. Dolayısıyla ümit vadeden bu sistemin potansiyelinin saptanması ve işlevselliğinin artırılması MALDI-TOF MS'nin klinik tanıya daha fazla katkı sağlayabilmesine yardımcı olacaktır.

EMB agar, gram-negatif bakteriler için seçici ve ayırt edici bir besiyeridir. Bu besiyeri karbonhidrat kaynağı olarak laktoz ve sükroz; azot kaynağı olarak da pepton içerir. *E.coli* gibi bazı bakteriler, her iki karbonhidratı fermente ederek asidik son ürünler üretimi yoluyla mikro çevrenin pH'sını azaltır. Bu süreç, büyüyen kolonilerin eozin Y ve metilen mavisi boyalarını absorbe etmesine neden olur¹³. Sonuç olarak, her bir tür bu besin maddelerini farklı seviyelerde kullanır ve dolayısıyla EMB agar üzerinde üreyen koloniler metalik yeşil, pembe, kırmızımsı, mavi veya saydam gibi farklı renklerde görünerek ayrıştırılabilir. Bu nedenle, EMB agar rutin bakteriyolojik kültürler; özellikle dışkı, solunum örnekleri, yara enfeksiyonları, idrar ve püye örnekleri için vazgeçilmez bir besiyeri olmuştur.

Tablo 1. Çalışmaya Alınan Gram-negatif Bakteri Türleri ve MALDI-TOF MS'nin Tanı Performansı

Bakteri cins/tür (sayı; n)	Direkt EMB'den Okuma			Yıkama Sonrası Okuma			p
	Doğru ID (n)	**ID yok + yanlış ID (n)	ID oran (%)	Doğru ID (n)	**ID yok + yanlış ID (n)	ID oran (%)	
<i>Aeromonas hydrophilia</i> (4)	3	1	75	4	0	100	
<i>Achromabacter xylosoxidans</i> (3)	2	1	66.6	3	0	100	
<i>Acinetobacter</i> spp. (82)	58	22 + 2	70.7	72	9 + 1	87.8	0.001
<i>Acinetobacter baumannii</i> (70)	51	18 + 1 (td)	72.8	62	8	88.5	0.001
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (3)	1	1 + 1 (td)	33.3	2	1 (td)	66.6	1.000
<i>Acinetobacter radioresistent</i> (4)	4	0	100	3	1	75	
<i>Acinetobacter junii</i> (5)	2	3	40	5	0	100	
<i>Citrobacter</i> spp. (20)	17	2 + 1	85	19	1	95	0.625
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (2)	2	0	100	2	0	100	
<i>Citrobacter brakii</i> (4)	3	1	75	4	0	100	
<i>Citrobacter freundii</i> (9)	7	1 + 1 (cd)	77.7	9	0	100	
<i>Citrobacter koserii</i> (2)	2	0	100	1	1	50	
<i>Citrobacter youngae</i> (3)	3	0	100	3	0	100	
<i>Enterobacter</i> spp. (32)	29	3	90.6	32	0	100	
<i>Enterobacter cloaca</i> (19)	18	1	94.7	19	0	100	
<i>Enterobacter aerogenes</i> (10)	8	2	80	10	0	100	
<i>Enterobacter hormacherii</i> (3)	3	0	100	3	0	100	
<i>E.coli</i> (88)	62	25 + 1 (cd)	70.5	78	10	88.6	0.001
<i>Klebsiella</i> spp. (70)	63	7	90	67	3	95.7	0.344
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (57)	50	7	87.7	54	3	94.7	0.344
<i>Klebsiella oxytoca</i> (13)	13	0	100	13	0	100	
<i>Morganella morganii</i> (22)	18	3 + 1 (cd)	81.8	21	1	95.4	0.375
<i>Pseudomonas</i> spp. (74)	66	7/1	89.1	70	3 + 1	94.5	0.289
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (65)	58	6 + 1 (cd)	89.2	63	2	96.9	0.125
<i>Pseudomonas putida</i> (4)	4	0	100	3	1 (cd)	75	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (1)	1	0	100	1	0	100	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (4)	3	1	75	3	1	75	1.000
<i>Proteus</i> spp. (11)	10	1	90.9	11	0	100	
<i>Proteus mirabilis</i> (9)	9	0	100	9	0	100	
<i>Proteus vulgaris</i> (2)	1	1	50	2	0	100	
<i>Providencia</i> spp. (8)	5	3	62.5	7	1	87.5	0.500
<i>Providencia rettgerii</i> (5)	4	1	80	5	0	100	
<i>Providencia stuartii</i> (3)	1	2	33.3	2	1 (td)	66.6	1.000

Tablo 1. Çalışmaya Alınan Gram-negatif Bakteri Türleri ve MALDI-TOF MS'nin Tanı Performansı (devamı)

Bakteri cins/tür (sayı; n)	Direkt EMB'den Okuma			Yıkama Sonrası Okuma			p
	Doğru ID (n)	**ID yok + yanlış ID (n)	ID oran (%)	Doğru ID (n)	**ID yok + yanlış ID (n)	ID oran (%)	
<i>Salmonella</i> spp. (3)	3	0	100	3	0	100	
<i>Serratia</i> spp. (17)	12	5	70.5	15	1/1	88.2	0.375
<i>Serratia marcescens</i> (15)	12	3	80	13	1 + 1 (cd)	86.6	1.000
<i>Serratia odorifera</i> (2)	0	2	0	2	0	100	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (25)	25	0	100	25	0	100	
* Diğer (9)	9	0	100	7	2	77.7	
Toplam (468)	382	86	81.6	434	34	92.7	0.001

ID: İdentifikasyon (tanımlama), TD: Tür düzeyinde, CD: Cins düzeyinde.
 * Diğer: *Delftia acidovorans* (n= 2), *Empedobacter brevis* (n= 1), *Hafnia alvei* (n= 1), *Kluyvera ascorbata* (n= 1), *Myroides odoratimimus* (n= 2), *Rauvolfia planticola* (n= 1), *Rauvolfia ornithinolytica* (n= 1).
 ** Tanı olmayan veya yanlış tanımlanan izolat sayıları. Yanlış tanımlanmış izolatlar "cd" veya "td" kısaltmaları ile belirtilmiştir.

MALDI-TOF MS için gram-negatif seçici besiyeri olarak günümüze kadar sadece MacConkey agar önerilmiştir. Bu besiyeri içeriğinde bulunan kristal viyole, gram-pozitiflerin üremesini engellerken gram-negatiflerin gelişmesine müsaade eder¹⁴. MacConkey ve EMB agar besiyerlerinin rutin uygulamada birbirine karşı üstünlükleri hakkında fazla sayıda bilimsel çalışma bulunmamaktadır. Ancak, Leininger ve arkadaşları¹⁵, mikrobiyologlar için EMB'nin özellikle *E.coli* gibi çok sık izole edilen gram-negatif patojenin kendine özgü parlak metalik yeşil röfleli olarak üremesini sağlaması nedeniyle daha yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. Anderson ve arkadaşları¹⁶ 2012 yılında MALDI-TOF MS'nin MacConkey agar ile olan tanı performansını araştırdıkları çalışmada, *Enterobacteriaceae* üyeleri için tür düzeyinde tanı oranını %88 olarak saptamış ve uyguladıkları protein ekstraksiyon işlemi sonrası bu değer %96'ya yükseldiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada yazarlar *Pseudomonas* spp. için MacConkey'den yapılan tanılamada tür düzeyi tanı oranını %52 olarak bulmuş ve uyguladıkları ekstraksiyon sonrası bu değer %70'e yükseldiğini saptamışlardır. Bir başka çalışmada ise Bizzini ve arkadaşları¹⁷, yaklaşık 700 gram-negatif izolat için MALDI-TOF MS'nin tanı performansını araştırmış ve MacConkey agarda saptanan tanı değerinin, koyun kanlı agar veya çikolata agardan yapılan tanılamaya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, günümüze kadar, MALDI-TOF MS'nin teknolojisi, işletim yazılımı ve veri tabanlarının önemli ölçüde iyileştirilmiş olmasına rağmen gram-negatif seçici ortamlara göre bu yöntemin performansının çalışıldığı dikkate değer bir başka araştırma yapılmamış olup EMB agar hakkında ise hiçbir veri mevcut değildir.

Bu çalışmada, MALDI-TOF MS'nin EMB agarda üreyen gram-negatif bakterilerin %80'inden fazlasını doğru olarak tanımlayabildiği saptanmıştır. Doğrudan EMB'den yapılan okumada MALDI-TOF MS'nin tanımlama performansı, nispeten daha az renkli, yarı

saydam veya şeffaf kolonilere sahip türlerde mükemmel yakın düzeyde yüksek bulunmuştur. Buna karşın, yoğun düzeyde boya absorbe eden kolonilere sahip bakteri türleri (örneğin, *Acinetobacter* spp. ve *E.coli*) için ise bu oran %70 dolayında saptanmıştır. Dolayısıyla çalışmamızda, bu boyaların giderilmesinin MALDI-TOF MS'nin EMB besiyerindeki tanı performansını artırabileceği olasılığına odaklanılmış ve sonuç olarak, temel laboratuvar ekipmanlarıyla yapılabilecek, basit, hızlı (ortalama 10 dakika, en fazla 30 dakika) ve düşük maliyetli (< 1 USD/izolat) bir boya yıkama yöntemi geliştirilmiştir. Bu işlem-den sonra, EMB'de üretilen bakteri türleri için MALDI-TOF MS'nin tanı performansında önemli iyileşmeler görülmüş ve çalışılan suşların toplam doğru tanı oranının %92'yi aştığı saptanmıştır. Yıkama işlemi, çalışmaya alınan 20 cins bakteriden 12'sinin tanımlama oranlarında %5.7 ile %33.4 düzeyinde yükselme sağlarken altı cinsin tanı oranında değişim olmamıştır. Ancak tanı oranında değişim sağlanmayan bu altı cins bakterinin yıkama öncesi tanı oranlarının mükemmel düzeyde (%100) olduğu görülmüştür. Yıkama ile özellikle *Acinetobacter* spp., *E.coli*, *Providencia* spp., *Citrobacter* spp., ve *Enterobacter* spp. türlerinin tanı oranlarında en yüksek artışlar sağlanırken bunlardan *Acinetobacter* spp. ve *E.coli*'deki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo I).

EMB besiyerinden yapılan direkt okumada toplam 80 izolat zayıf spektrum nedeniyle tanımlanamamıştır. Buna karşın, yeterli spektrum elde edilemeyen izolat sayısında yıkama işlemi ile %60'tan fazla azalması sağlanmıştır. Ayrıca bu işlem sonrası, bir *Acinetobacter johnsonii* izolatı hariç olmak üzere direkt EMB okumasında yanlış tanımlanan tüm izolatlar doğru tanımlanmıştır. Diğer taraftan, yıkama işlemi ile tanımlama güven değerinin de [confidence level (CL)] yükseldiği gözlenmiş olup direkt okumada iki *A.baumannii*, iki *E.coli*, bir *K.pneumoniae*, bir *C.freundii* ve bir *C.brakii* düşük CL değeri (%50 ile 73.8%) ile tanımlanmışken yıkama sonrası bu izolatların hepsi yüksek güven düzeyinde (%99.5 ile %99.9) tanımlanabilmiştir (veri gösterilmemiştir).

Diğer taraftan, bu çalışmada yıkama işleminin bazı türlerin tanımlama süreçlerine negatif etkisinin olabileceği de saptanmıştır. Çalışmamızda, direkt EMB okumasında doğru tanımlanmışken yıkama sonrası toplam dört izolatın (bir *Acinetobacter radioresistens*, bir *Citrobacter koserii*, bir *Hafnia alvei* ve bir *Rauoltella planticola*) zayıf spektrum nedeniyle tanımlaması yapılamamıştır. Ayrıca, toplam üç izolat (bir *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* ve bir *Providencia stuartii*) direkt EMB okumasında doğru tanımlanmışken yıkama sonrası yanlış tanımlanmıştır. Ancak yıkama işlemi sonrası ortaya çıkan tanımlayamama/yanlış tanımlama sorununun çalışılan toplam suşların oldukça az bir kısmında (yaklaşık %1.5) saptanmış olması, bu düşüşün doğru bir şekilde analiz edilmesi için özellikle hata saptanan türlerden daha fazla izolatın bu amaçla test edilmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Eosin Y ($C_{20}H_8Br_4O_5 \cdot 2Na$; moleküler ağırlık: 691 g/mol), ökaryotik ve prokaryotik hücre yapılarında proteinlerle etkileşime giren ve etanolde çözünebilir asidik bir kırmızı boyadır. Metilen mavisi ($C_{16}H_{18}ClN_3S$; moleküler ağırlık: 319 g/mol), nükleik asitler ve bazı asidik proteinlere bağlanarak onları boyayan su ve etanolde çözünebilir bazik bir boyadır. Bu

çalışmada, üreme esnasında besiyerinden absorbe edilen bu iki boyanın gram-negatif bakteri kolonilerinden uzaklaştırılmasının MALDI-TOF MS'nin tanı performansını arttırabildiği gözlenmiştir. Bu sonuca dayanarak, bazı olası mekanizmaların bu iyileşmede rol oynadığı düşünülmüştür. İlk olarak; bu iki boya, bakteriyel proteinlere bağlanarak onların moleküler kütlelerini değiştirebilir ve bu nedenle direkt okumada cihaz tarafından tespit edilen kütsel protein spektrumlarının referans spektrumla uyumsuzluk göstermesinden dolayı tanımlama sorunu oluşturmuş olabilir. Gerçekten de çalışmamızda saptadığımız en önemli tanı sorunu zayıf spektrum nedeniyle anlamlı bir tanımlama yapılamamış olmasıdır. İkinci olarak, bu iki boyanın matriks çözeltisi ile olabilecek potansiyel etkileşimleri, matriksin bakteriyel proteinleri etkili bir şekilde kristalize etme özelliğini bozuyor olabilir. Üçüncü olarak, EMB besiyerinin içerdiği besinsel öge kompozisyonu tanımlama için önemli olabilecek bazı proteinlerin ekspresyonunda değişime neden olmuş olabilir. Dolayısıyla boyaların ve besiyeri içeriğinin EMB'de üreyen gram-negatif bakterilerin protein spektrumları üzerindeki etkisini anlamak için daha fazla çalışmaya gereksinim bulunmaktadır.

Maldi-Tof MS üreticileri tarafından gram-negatif seçici besiyeri olarak önerilen Mac-Conkey agarın araştırmamıza dahil edilmemiş olması bu çalışma ile ilgili bildirmemiz gereken en önemli sınırlılıklardan biridir.

Bu çalışmada, EMB agarda üreyen gram-negatif bakterilerin MALDI-TOF MS ile kabul edilebilir bir düzeyde tanımlanabildiği ve bu çalışmada tanımlanan basit bir yıkama işlemi ile tanı performansının iyi bir düzeye yükseltilebileceği saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; önemli bir patojen topluluğu olan gram-negatif bakterilerin MALDI-TOF MS ile tanısında pratikte karşılaşılan "sınırlı besiyeri" sorununa karşı mikrobiyolojik olarak geleneksel bir besiyeri olan EMB agarın alternatif bir çözüm olabileceği vurgulanmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Vitek MS V3.0 Database for clinical usage. BioMérieux SA, France, 2016.
2. Kassim A, Pflüger V, Premji Z, Daubenberg C, Revathi G. Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. BMC Microbiol 2017;17(1):128.
3. Miller E, Cantrell C, Beard M, Derylak A, Babady NE, McMillen T, et al. Performance of Vitek MS v3.0 for identification of Mycobacterium species from patient samples by use of automated liquid medium systems. J Clin Microbiol 2018;56(8):e00219-18.
4. Levine M. Differentiation of *E.coli* and *A.aerogenes* on a simplified eosin methylene blue agar. J Infect Dis 1918;23;43-7.
5. Washington W Jr, Koneman EW, pp:213-315. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7th Edition, 2016. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.
6. Metsini A, Vazquez M, Sommerstein R, Marschall J, Voide C, Troillet N, et al. Point prevalence of healthcare-associated infections and antibiotic use in three large Swiss acute-care hospitals. Swiss Med Wkly 2018;148: w14617.

7. Walter J, Haller S, Quinten C, Karki T, Zacher B, Eckmanns T, et al. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. *Euro Surveill* 2018;23(32).
8. Marani A, Napoli C, Berdini S, Montesano M, Ferretti F, Di Ninno F, et al. Point prevalence surveys on healthcare acquired infections in medical and surgical wards of a teaching hospital in Rome. *Ann Ig* 2016;28(4):274-81.
9. Erdem H, Inan A, Altindis S, Carevic B, Askarian M, Cottle L, et al. Surveillance, control and management of infections in intensive care units in Southern Europe, Turkey and Iran--a prospective multicenter point prevalence study. *J Infect* 2014;68(2): 131-40.
10. Durdu B, Kritsotakis EI, Lee ACK, Torun P, Hakyemez IN, Gultepe B, et al. Temporal trends and patterns in antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria implicated in intensive care unit-acquired infections: a cohort-based surveillance study in Istanbul, Turkey. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;14:190-6.
11. Guducuoglu H, Gursoy NC, Yakupogullari Y, Parlak M, Karasin G, Sunnetcioglu M, et al. Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1- and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*: high mortality from pandrug resistance. *Microb Drug Resist* 2018;24(7):966-72.
12. Dimopoulos G, Koulenti D, Tabah A, Poulakou G, Vesin A, Arvaniti K, et al. Bloodstream infections in ICU with increased resistance: epidemiology and outcomes. *Minerva Anesthesiol* 2015;81(4):405-18.
13. Eosine Methylene Blue Agar. HiMedia Laboratories Technical Data Sheet. HiMedia Laboratories, India. Available at: <http://www.himedialabs.com/TD/M317.pdf>. Erişim tarihi: 3 Haziran 2018.
14. MacConkey AT. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus typhi abdominalis*. *Lancet* 1900;156(4010):20.
15. Leininger DJ, Roberson JR, Elvinger F. Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens. *J Vet Diagn Invest* 2001;13(3):273-5.
16. Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebouer NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):1008-13.
17. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1549-54.