

“In-House” Tween® 80 Yöntemi ile Pozitif Kan Kültürlerinden Mikroorganizmaların MALDI-TOF MS Yöntemi ile Doğrudan Tanımlanması: Deneysel ve Klinik Çalışma

Direct Identification of Microorganisms from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS Using an in-House Tween® 80 Method: Experimental and Clinical Study

Serap SÜZÜK YILDIZ¹(ID), Ebru EVREN²(ID), Can Hüseyin HEKİMOĞLU¹(ID), Salih ALTINOK¹(ID), Hüsnüye ŞİMŞEK¹(ID), Zeynep Ceren KARAHAN²(ID), Selçuk KILIÇ¹(ID)

¹ Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı, Ankara.

¹ Ministry of Health General Directorate of Public Health, Department of Microbiology Reference Laboratory and Biological Products, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, İbni Sina Hospital Central Laboratory, Ankara, Turkey.

Makale Atfı: Süzük Yıldız S, Evren E, Hekimoğlu CH, Altınok S, Şimşek H, Karahan ZC ve ark. “In-house” tween® 80 yöntemi ile pozitif kan kültürlerinden mikroorganizmaların MALDI-TOF-MS yöntemi ile doğrudan tanımlanması: deneysel ve klinik çalışma. Mikrobiyol Bul 2020;54(4):523-534.

ÖZ

Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden doğrudan tanımlama yapılarak sonuçların daha erken kliniğe bildirilmesinin mortalite ve morbidite üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmektedir. Özellikle deterjanların kullanıldığı ekstraksiyon yöntemleri, pozitif sinyal veren şişelerden doğrudan tanımlama için kullanılmaktadır. Bu amaçla, özellikle saponin kullanımına dayalı geliştirilen “in-house” yöntemler literatürde yaygın olarak yer almaktadır. Bu çalışmada, deterjan bir madde olan Tween® 80 kullanımı ile doğrudan pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden etkenin tanımlanmasına yönelik basit, kolay uygulanabilir ve güvenilir bir protokol geliştirilmesi, elde edilen protokolün rutin mikrobiyoloji laboratuvarında klinik örneklerde çalışması ve sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma, yöntemin geliştirildiği “deneysel” ve yöntemin uygulandığı “klinik” olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Deneysel aşamada, standart suş ve daha önce 16S rRNA yöntemi ile tanısı konan izolatlarla pozitif sinyal veren kan kültürü şişeleri oluşturulmuştur. Tween® 80 %10'luk çözeltisi distile su ile hazırlanmıştır. Pozitif sinyal veren şişeden 1 ml örnek mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üzerine 100 µl %10'luk Tween® 80 eklenip 10 saniye vortekslenildikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler 14.000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılıp çökeltiler 1 ml distile su ile üç kez yıkanıp 14.000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Çökeltilerden alınan örnekler preparat üzerine sürülüp havada kurutulmuştur. Üzerine önce 1 µl %70 formik asit, sonra 1 µl matriks çözeltisi eklenmiş ve kuruduktan sonra çalışılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında, yöntem, 17 Nisan

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Serap Süzük Yıldız, Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı, Adnan Saygun Caddesi, No: 55, E Blok, Sıhhiye, Ankara
Tel (Phone): +90 312 565 6271, E-posta (E-mail): serapsuzuk@gmail.com

2018-31 Ağustos 2018 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 502 adet pozitif sinyal veren şişeye uygulanmış ve sonuçlar kültür sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Deneysel aşamada ekstraksiyon sonunda elde edilen sonuçlar, kültür sonuçları ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tek mikroorganizma üreyen 462 (%92.1) şişenin 383 (%82.9)'ünde subkültür sonuçları ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Doğru tanımlama yapılan mikroorganizmaların 350 (%91.3)'si bakteri, 33 (%8.7)'ü mantar olarak belirlenmiştir. Bakterilerin 216 (%56.4)'sı gram pozitif, 134 (%34.9)'ü gram negatif olarak belirlenmiştir. Polimikrobiyal üremesi olan 40 (%7.9) şişenin ise 19 (%47.5)'unda en az bir mikroorganizma doğru olarak tanımlanmıştır. Bunların dağılımı gram negatif (n= 10), gram pozitif (n= 8) ve maya (n= 1) şeklindedir. Polimikrobiyal üremesi olan altı şişede hiçbir mikroorganizma tanımlanmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Tween® 80 kullanılarak geliştirilen bu "in-house" yöntemin mikrobiyoloji laboratuvarlarında pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerine rutin uygulanabilir bir yöntem olacağı ve erken tanıya katkı sağlayacağı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: Pozitif kan kültürü; hızlı tanımlama; MALDI-TOF MS; Tween® 80.

ABSTRACT

It has been reported that direct identification from blood culture bottles with positive signals and reporting the results to the clinics earlier has positive effects on mortality and morbidity. Extraction methods especially using detergents are used for the direct identification from the bottles which give positive signal. For this purpose, in-house methods developed based on the usage of saponin are widely available in the literature. In this study, it was aimed to develop a simple, easy-to-apply and reliable protocol for identifying the agent directly from the blood culture bottle that gives positive signal with the use of detergent Tween® 80, and to study the obtained protocol in clinical samples in a routine microbiology laboratory and to evaluate the results. The study was carried out in two stages, the experimental stage where the method was developed and the clinical stage where the method was applied. In the experimental stage, blood culture bottles were created with standard strains and isolates previously diagnosed with the 16S rRNA method. 10% solution of Tween® 80 was prepared with distilled water. 1 ml sample was transferred from the bottle that gave positive signal to the microcentrifuge tube, 100 µl of 10% solution of Tween® 80 was added, vortexed for 10 seconds and then incubated for 5 minutes at room temperature. The tubes were centrifuged for 5 min at 14.000 rpm, the supernatant was discarded and the pellet was washed with 1 ml of distilled water and centrifuged at 14.000 rpm for 5 minutes in three times. Samples taken from the pellets were rubbed on the slide and dried on air. Firstly, 1 µl of 70% formic acid, then 1 µl, of matrix solution was added and it was used after drying. In the second stage of the study, the method was applied to the 502 vials giving positive signal in the Microbiology Laboratory of Ankara University Faculty of Medicine İbni Sina Hospital between 17 April 2018-31 August 2018 and the results were compared with the subculture results. The results obtained at the end of extraction in the experimental stage were compared with the subculture results and no statistical difference was found. In 383 (82.9%) bottles among 462 (92.1%) bottles with monomicrobial positive cultures, compatible results with the subculture results were obtained. Of the microorganisms correctly identified, 350 (91.3%) were bacteria and 33 (8.7%) were fungi. On the other hand, 216 (56.4%) of the bacteria were gram positive and 134 (34.9%) of them were gram negative bacteria. At least one microorganism was correctly identified in 19 (47.5%) of 40 (7.9%) bottles with polymicrobial blood cultures. Their distribution was gram negative (n= 10) and gram positive (n= 8) and yeast (n= 1). No microorganisms were identified in six bottles with polymicrobial cultures. According to the results, we believe that this in-house method developed using Tween® 80 will be a routinely applicable method for blood culture bottles that give positive signal in microbiology laboratories and it will contribute to the early diagnosis.

Keywords: Positive blood culture; rapid identification; MALDI-TOF MS; Tween® 80.

GİRİŞ

Kan dolaşım enfeksiyonları, tüm dünyada yatarak tedavi gören hastalarda görülen yüksek mortalite ve morbiditenin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır¹. Kan kültürü kan dolaşım enfeksiyonlarında altın standart olup, pozitif sinyal verdiği andan itibaren hızlı davranılması, kliniğe zamanında doğru sonucun gönderilmesi, hastaların mortalite ve morbi-

ditesi üzerinde olumlu etkilere neden olmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kan kültürü şişesinden pozitif sinyal alındıktan sonra Gram boyamanın yapılması, subkültürlerin çalışılması, mikroorganizmanın tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testinin raporlanması laboratuvarın uyguladığı yöntemlere bağlı olmakla birlikte, süreç yaklaşık 12-48 saat kadar sürebilmektedir². Laboratuvarlar, sahip oldukları altyapı özelliklerine göre hızlı tanımlamaya yönelik işlemler geliştirebilmektedir. Gram boyama, kan kültürü şişesinden yapılması gereken ilk testtir. Gram boyama kritik bir sonuç vermekle birlikte, uygulama ve değerlendirme aşamalarında standardizasyon sağlanmadığında hataya açık bir yöntem olup, duyarlılık ve özgüllük değerleri değişiklik gösterebilmektedir³. Etkenin adının hızlı ve doğru bir şekilde konması, antimikrobiyal yönetim ve hasta güvenliği için önemlidir. Bu amaçla laboratuvarlar, daha hızlı tanımlama yapabilmek için yeni yöntemler uygulamaya başlamaktadır. Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi [matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)], bakterilerin tanımlanması açısından enfeksiyon hastalıkları kliniklerinde ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında büyük bir çığır açmıştır⁴. MALDI-TOF MS, kan dolaşım enfeksiyonları açısından pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden yapılan subkültürlerden elde edilen gram negatif bakterilerde %90, gram pozitif bakterilerde %60-80 oranında güvenilir tanımlama yapabilmektedir⁵. Laboratuvarlar, bugün ticari olarak satın alınan kitler veya "in-house" yöntemlerle doğrudan pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden tanımlama yapmaya yönelmektedir. Ticari olarak Bruker, Massachusetts, ABD'nin piyasaya sürdüğü MBT Sensityper®, doğrudan kan kültürü şişesinden mikroorganizma tanımlamasına yönelik basit, uygulaması kolay bir yöntemdir, ancak laboratuvar için fazladan maliyete neden olmaktadır⁶. Maliyet etkinliği sağlamak için genellikle birbirine benzeyen basamakları içeren ve özellikle saponinle çalışılan "in-house" yöntemler geliştirilmiştir⁷⁻¹⁰. Kan dolaşım enfeksiyonlarının hem tanısı hem de tedavisi oldukça yüksek maliyetlere sahiptir, bu nedenle hem tanıda hem de tedavide maliyetlerin düşürülmesi önemlidir. Tedavi maliyetleri doğru tanı ile önemli ölçüde azalmaktadır. Tanıya yönelik laboratuvarlarda maliyet etkin yöntemlerin uygulanması, mikrobiyoloji laboratuvarının altyapısı ile yakından ilişkilidir¹¹.

Bu çalışmada, deterjan bir madde olan Tween® 80 kullanımı ile doğrudan pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden etkenin tanımlanmasına yönelik basit, kolay uygulanabilir ve güvenilir bir protokol geliştirilmesi ve elde edilen protokolün rutin mikrobiyoloji laboratuvarında klinik örneklerde çalışılması ve sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Pozitif Sinyal Veren Kan Kültürü Şişelerinin Hazırlanması

Sağlık Bakanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı Merkez Laboratuvarında, daha önce 16S rRNA ile tanımlaması yapılan ya da standart suş olarak çalışılan gram negatif (n= 12) ve gram pozitif (n= 18) toplam 30 bakteri pozitif sinyal veren kan kültür şişesi elde edilmesi için kullanıldı. Çalışmada, son konsantrasyonu 10⁴ CFU/ml bakteri içeren bakteri süspansiyonundan 1 ml [BACTEC™ Plus Aerobic/F culture vial (PAV) ve BACTEC™ Anaerobic/F culture vial (LAV), Becton Dickinson, Birleşik Krallık] kan

kültür şişesine eklendi. Bakteri inokülasyonundan önce her bir şişeye kan dolaşım enfeksiyonu bulgusu olmayan kişilerden alınmış 8-10 ml periferik kan eklendi¹⁰. Pozitif sinyal veren şişeler beş günlük inkübasyon programında 37°C'de Bactec 9060 otomatize kan kültürü cihazına (Becton Dickinson, ABD) yüklendi. Pozitif sinyal veren şişelerden Gram boyama ve koyun kanlı agara ekim yapıldı, eş zamanlı olarak pozitif sinyal veren şişeden Tween® 80 yöntemi ile doğrudan MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) yöntemi ile tanımlama yapıldı. Pozitif kan kültüründen doğrudan bakteri tanımlaması işlemi üç kez tekrarlanarak çalışıldı. Koyun kanlı agarda üreyen bakterilerden de inkübasyon süresi sonunda MALDI-TOF MS ile tanımlama yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Tween® 80 ile Tanımlama Protokolünün Oluşturulması

Yöntemin geliştirilmesinde, Caspar ve arkadaşlarının¹² saponin ile hazırladıkları hızlı tanımlama protokolü temel alındı. Bu çalışmada, ekstraksiyon işlemi için saponinden daha güçlü bir sürfaktan madde olan Tween® 80 kullanıldı. Çalışmada, distile su ile %10'luk Tween® 80 çözeltisi hazırlandı. Pozitif sinyal veren şişeden 1 ml örnek mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 100 µl %10'luk Tween® 80 eklenip 10 saniye vortekslenildi. Vortekslenen mikrosantrifüj tüpleri 14.000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 1 ml distile su ile üç kez yıkanıp 14.000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Çökeltiden alınan örnekler doğrudan slayt üzerine sürülüp yaklaşık 2 dakika kadar havada kurutuldu. Üzerine önce 1 µl %70 formik asit eklenip havada kurutulduktan sonra 1 µl matriks çözeltisi (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50 acetonitrile-%2.5 trifluoroacetic acid, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) eklenerek kurumaya bırakıldı.

Rutin Mikrobiyoloji Laboratuvarında Pozitif Sinyal Veren Kan Kültürü Örneklerinin Çalışılması

Çalışmaya, prospektif olarak Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında 17 Nisan 2018-31 Ağustos 2018 tarihleri arasında pozitif sinyal veren 502 şişe dahil edildi. Pozitif sinyal veren şişelerden Gram boyama ile subkültür pasajları yapıldı. Eş zamanlı olarak şişelerden Tween® 80 protokolüne göre MALDI-TOF MS cihazında tanımlama yapıldı.

Tween® 80 Yönteminin Geliştirilmesi

MALDI-TOF MS ile yapılan tanımlamada eşik (cut off) değeri 1.5-1.7 arasında olan mikroorganizmalar için ilave inkübasyon basamağı eklenerek yöntem modifiye edildi. Buna göre pozitif sinyal veren şişeden 1 ml örnek mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 100 µl %10'luk Tween® 80 eklenip 10 saniye vortekslenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler daha sonra, 14.000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek yöntemin diğer aşamaları uygulandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, SPSS 20 paket programı kullanılarak yapıldı. Veriler normal dağılım göstermediği için gruplar arası ilişkiler Mann-Whitney U testi, saponin ve Tween®

80 ile elde edilen sonuçlar arasındaki ilişki Wilcoxon testi ve aralıklar arasındaki ilişki Kruskal-Wallis testi kullanılarak değerlendirildi ($p < 0.05$).

BULGULAR

Toplam 30 adet pozitif sinyal veren kan kültürü şişesi oluşturulmuştur. Bu şişelere, standart suşlar veya 16S rRNA ile daha önce tanımlaması yapılmış olan gram pozitif ($n = 18$) ve gram negatif ($n = 12$) bakteri ekilmiştir. "In-house" geliştirilen Tween® 80 ekstraksiyon yöntemi ile doğrudan kan kültürü şişesinden tanımlama yapılmış, elde edilen sonuçlar subkültürden yapılan rutin MALDI-TOF yönteminden elde edilen tanımlar ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, üretici firmanın önerdiği standart eşik değeri olan ≥ 1.7 alınarak bir değerlendirme yapılmış ve şişelerdeki bakterilerin tamamı doğru olarak tanımlanmıştır. Deneysel çalışmada kullanılan bakterilerin listesi Tablo I'de verilmiştir. Analiz sonucuna göre iki yöntem arasında 0.01 korelasyon bulunmuştur.

Elde edilen Tween® 80 protokolü rutinde pozitif sinyal veren şişelerden rutin laboratuvar da çalışmaya dahil edilmiştir. Pozitif sinyal veren şişelere hem doğrudan ekstraksiyon hem de rutin uygulamada yer alan Gram boyama ve subkültür işlemleri uygulanmıştır. Hem çalışılan doğrudan tanımlama hem de subkültürden çalışılan tanımlama sonuçları karşılaştırılmıştır. Çalışmanın klinik aşamasında toplam 502 şişe değerlendirilmiştir. Değerlendirilen şişelerden polimikrobiyal üremesi olan 40 (%7.9) şişe kendi içinde değerlendirilmiştir.

Tek mikroorganizma üreyen 462 (%92.1) şişenin 79 (%17.1)'unda subkültür sonuçları ile uyumlu sonuçlar tespit edilememiştir. Doğru tanımlama yapılamayan şişelerin 56'sında bakteri, 23'ünde ise maya ürettiği belirlenmiştir. Tanımlanamayan bakterilerin ise 34'ü gram pozitif, 14'ü gram negatif olarak tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerde en fazla *Corynebacterium* türlerinin, gram negatiflerde ise *Acinetobacter* türlerinin tanımlanamadığı belirlenmiştir.

Tek mikroorganizma üreyip subkültür sonuçları ile uyumlu tanımlanan 383 (%82.9) şişenin 153 (%39.9)'ünün eşik değeri 1.5-1.7 arasında tespit edilmiş ve bu örneklerde yöntem modifiye edilerek Tween® 80 ile kan kültürü örneğinin oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon basamağı eklenmiştir. Modifiye edilen yöntemle göre 383 (%82.9) mikroorganizmanın eşik değerleri 1.7 ve üstünde tespit edilmiş olup, tanımlama sonuçları subkültürden yapılan sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur. Bu iki yöntem arasında yapılan tanımlama sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Doğru tanımlama yapılan mikroorganizmaların 350 (%91.3)'si bakteri, 33 (%8.7)'ü mantar olarak tespit edilmiştir. Tanımlanan bakterilerin 216 (%56.4)'sı gram pozitif, 134 (%34.9)'ü gram negatif bakteri olarak saptanmıştır. Tween® 80 ile doğru tanımlama yapılan mikroorganizmaların dağılımları ve rutin yöntem ile karşılaştırılması Tablo II'de verilmiştir.

Tüm şişelerin 40 (%7.9)'unda polimikrobiyal üreme belirlenmiştir. Bu şişelerin 32'sinde ikili, sekizinde üçlü üreme tespit edilmiştir. Tween® 80 ile 19 (%47.5) şişede en az bir mikroorganizma tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmaların dağılımı da gram negatif ($n =$

Tablo 1. Protokol Oluşturulmak İçin Çalışılan Pozitif Sinyal Veren Kan Kültürü Örneklerinde Üreyen Bakterilerin Dağılımı ve MALDI-TOF MS Eşik Değerleri

Bakteri adı	Tween® 80 ekstraksiyonu ile tanımlama	Subkültür sonrası tanımlama
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2.6	2.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2.3	2.8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2.3	2.3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2.5	2.6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	2.6	2.5
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766	2.0	2.2
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 12493	2.2	2.2
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 13552	2.5	2.4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698	2.2	2.7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700699	2.0	2.1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	1.9	2.3
<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 12202	2.1	2.0
<i>Escherichia coli</i> CCUG 58543	2.5	2.8
<i>Escherichia coli</i> CCUG 62975	2.7	2.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13442	2.3	2.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13438	2.1	2.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCUG 56233	2.3	2.1
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13476	2.2	2.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955	2.1	2.1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 43498	1.9	2.0
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	2.0	2.2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.8	1.9
<i>Streptococcus salivarius</i>	1.7	1.8
<i>Streptococcus anginosus</i>	1.9	1.8
<i>Streptococcus oralis</i>	1.7	1.7
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.9	2.0
<i>Streptococcus intermedius</i>	2.0	2.0
<i>Streptococcus mitis</i>	1.6	1.9
<i>Streptococcus mutans</i>	1.9	2.3
<i>Streptococcus bovis</i>	1.9	1.9

10), gram pozitif (n= 8) bakteri ve maya (n= 1) şeklindedir. Tween® 80 yöntemi ile doğru tanımlama yapılan şişelerde üreyen mikroorganizmalar ile ekstraksiyon yöntemi ile doğru tanımlanan mikroorganizmalar Tablo III'te verilmiştir.

Mikroorganizmalar	Tween® 80 (İnkübasyonuz)			Tween® 80 (İnkübasyonlu)			Kültür sonrası tanımlama			
	< 1.7	1.7-1.99	> 2.0	Toplam	1.7-1.99	> 2.0	Toplam	1.7-1.99	> 2.0	Toplam
Koagülaz negatif staflokok	58	61	24	143	97	46	143	37	106	143
<i>Escherichia coli</i>	14	14	24	52	13	39	52		52	52
<i>Enterococcus</i> spp.	15	16	5	36	19	17	36	2	34	36
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	13	13	35	12	23	35		35	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	12	10	33	16	17	33		33	33
Diğer <i>Enterobacteriales</i> üyeleri	12	11	10	33	12	21	33	5	28	33
<i>Acinetobacter</i> spp.	15	3	1	19	14	5	19	1	18	19
<i>Candida</i> spp.	11		1	12	6	6	12	4	8	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	1	5	2	3	5		5	5
<i>Ochrobactrum anthropi</i>			4	4		4	4		4	4
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	1		3	2	1	3		3	3
<i>Raoultella ornithinolytica</i>			2	2		2	2		2	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	1		2	2	2	2	1	1	2
<i>Burkholderia cepaciae</i>	1			1	1		1		1	1
<i>Lactobacillus</i> spp.	1			1	0	1	1		1	1
<i>Propionibacterium</i> spp.	1			1	0	1	1		1	1
<i>Streptococcus salivarius</i>		1		1	1		1	1	1	1
Toplam	153	135	95	383	195	188	383	51	332	383
%	39.9	35.3	24.8		50.9	49.1		13.3	86.7	

Subkültür sonucu	Doğrudan tanımlama sonucu	MALDI-TOF MS ile eşik değeri
<i>Klebsiella pneumoniae</i> /Enterococcus faecium	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.71
<i>Staphylococcus epidermidis</i> /Streptococcus cristatus/Neisseria subflava	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.755
<i>Staphylococcus epidermidis</i> /Acinetobacter baumannii	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.753
<i>Klebsiella pneumoniae</i> /Acinetobacter baumannii	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.897
<i>Serratia marcescens</i> /Acinetobacter baumannii	<i>Serratia marcescens</i>	1.909
<i>Serratia marcescens</i> /Klebsiella pneumoniae	<i>Serratia marcescens</i>	1.506
<i>Acinetobacter baumannii</i> /Neisseria subflava	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.853
<i>Ochrobactrum anthropi</i> /Staphylococcus haemolyticus	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2.053
<i>Klebsiella pneumoniae</i> /Enterobacter cloacae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.866
<i>Staphylococcus epidermidis</i> /Pseudomonas aeruginosa	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.932
<i>Staphylococcus epidermidis</i> /Pseudomonas aeruginosa	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.042
<i>Staphylococcus hominis</i> /Pseudomonas aeruginosa	<i>Staphylococcus hominis</i>	1.969
<i>Staphylococcus hominis</i> /Streptococcus pneumoniae	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.865
<i>Klebsiella pneumoniae</i> /Escherichia coli/Enterococcus faecalis	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.947
<i>Enterococcus faecium</i> /Acinetobacter baumannii	<i>Enterococcus faecium</i>	1.879
<i>Staphylococcus epidermidis</i> /Corynebacterium minutissimum	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.785
<i>Staphylococcus epidermidis</i> / Acinetobacter baumannii/Klebsiella pneumoniae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.748
<i>Escherichia coli</i> /Enterococcus faecalis	<i>Escherichia coli</i>	1.987
<i>Candida parapsilosis</i> /Streptococcus salivarius	<i>Candida parapsilosis</i>	1.836

TARTIŞMA

Bu çalışmada, pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden doğrudan ekstraksiyon için ilk kez %10'luk Tween® 80'in kullanıldığı bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmamız, deneysel ve klinik olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Deneysel aşamada pozitif sinyal veren kan kültürü örnekleri ile yöntem geliştirilmiş, ikinci aşamada ise pozitif sinyal veren hastalara ait kan kültürü şişelerinde değerlendirme yapılmıştır. Ekstraksiyonda, degradasyon özelliği saponine göre daha yüksek ve daha ucuz olan Tween® 80 kullanılmıştır.

Son yıllarda, MALDI-TOF MS kullanımı ile birçok laboratuvar "in-house" çalışma yöntemleri geliştirilerek sepsis tanısında daha erken sonuçlar elde etme çabasıdadır. Yapılan çalışmalarda, özellikle gram negatif bakterilerin gram pozitiflere göre tanımlanma duyarlılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir¹²⁻¹⁵. Çalışmamızda da benzer şekilde, gram negatif bakterilerin tür düzeyinde tanımlanma oranlarının gram pozitiflere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MALDI-TOF MS kullanımı için hazırlanan ekstraksiyon yöntemlerinde en önemli kısıtlayıcı noktalar, kalın hücre duvarına sahip gram pozitif bakteriler ile mukus tabakası kalın olan gram negatif bakterilerdir. Bu sorunları gidermek adına Zhou ve arkadaşlarının¹⁰ geliştirdiği yöntemde boncuklar kullanılarak ekstraksiyon yöntemlerinin duyarlılığının artırılması hedeflenmiştir. Araştırmacılar, geliştirdikleri yöntemle hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin tanımlanma oranlarının arttığını göstermişlerdir.

Geliştirdiğimiz yöntemle, tek mikroorganizma üremesi olan şişelerde MALDI-TOF MS ile %82.9 oranında doğrudan tanımlama yapılabilmesi mümkün olmuştur. Ancak, polimikrobiyal üremesi olan kan kültürü şişelerinde, rutin çalışmalarda da olduğu gibi, bazı problemlerle karşılaşmıştır. Benzer şekilde, doğrudan tanımlama geliştirilen ekstraksiyon yöntemlerinde de polimikrobiyal şişelerden yapılan tanımlamalarda benzer sorunlar yaşandığı bildirilmiştir^{14,16}. Çalışmamızda, toplam 40 polimikrobiyal üremesi olan şişenin 19 (%47.5)'unda en az bir mikroorganizma doğru olarak tanımlanmıştır. Bu durumda, tanımlanan tek mikroorganizmanın bile kliniğe bildirilmesi ve ampirik tedaviye yön vermesinin tüm mikroorganizmalar tanımlanmaya kadar kliniğe önemli bir bilgi sağlanacağı kanısına varılmıştır. Geliştirdiğimiz yöntemin polimikrobiyal şişelerde de literatürle benzer sonuçlara sahip olduğu belirlenmiştir^{14,17}.

Viridans streptokoklar ve *Streptococcus pneumoniae* tanımlanmasında MALDI-TOF MS sistemleri ile doğru tanımlama yapabilmek için kullanıcılar tarafından farklı protokoller geliştirilebilmektedir¹³. Bu nedenle, çalışmanın deneysel aşamasında bu bakterilere yer verilmiştir. Çalışmada, bu iki bakteri grubunun ürettiği şişe sayısı az olmakla birlikte, tanımlamaların doğru olarak yapıldığını söyleyebiliriz. *S.salivarius*'un ürettiği bir şişede ise tanımlamanın yapılamadığı tespit edilmiştir.

Doğrudan kan kültürü şişesinden tanımlama yapılması, erken tanı için büyük önem taşımaktadır. Erken tanı, doğru ampirik tedavinin başlamasına katkı sağlayarak klinik yarar da göstermektedir^{18,20}. Bu amaçla, tüm dünyada yaygın olarak pozitif sinyal veren şişe-

den Gram boyama uygulaması yapılmaktadır. Ancak Gram boyama, yorumlamada bazı sorunlara ve yanlış tanımlamalara neden olabilmektedir^{19,22}. MALDI-TOF MS sistemi kullanılarak geliştirilen doğrudan şişeden tanımlama yöntemleri ile beraber Gram boyama sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi erken tanı olasılığını da güçlendirebilir.

Tanısal mikrobiyoloji, teknolojinin de yaygın kullanımı ile her gün farklı yenilikler ile karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte, geliştirilen her yöntemin laboratuvarlarımızda uygulanması, getireceği mali yük ya da kapasite sorunlarından dolayı mümkün olamayabilir. Bu gelişime paralel olarak laboratuvarlar yerel yöntemler geliştirebilmekte ve bu yöntemleri valide ederek laboratuvar uygulamalarına koyabilmektedir. Valide edilmiş yöntemler, ticari yöntemlerden çok daha ucuza sağlanabilmektedir. Ülkemizde de bu tür yerel yöntemlerin geliştirildiği çalışmalar laboratuvar rutininde uygulanmaktadır^{21,22}.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi aşamasında bazı kısıtlılıklar da mevcuttur. En önemli kısıtlılıklardan biri, kan kültür şişelerinin mikrobiyolojik olarak değerlendirilmesidir. Bunun nedeni, halen ülkemizde kan kültür set tanımının tüm hastane ve klinikler tarafından tam anlaşılabilmiş bir kavram olmamasıdır. Çalışmamızda, hastalardan alınan bazı kan kültürlerinin tek şişe olarak gönderilmesi nedeni ile şişe bazında değerlendirilme yapılmasına karar verilmiştir. Bir diğer önemli nokta, anaerop mikroorganizmalara yönelik değerlendirmenin yapılamamış olmasıdır. Bu durum, bir önceki sorunun kaynağı ile aynıdır. Kliniklerden anaerop şişeler gönderilmediği için anaerop mikroorganizmaların değerlendirilmesi için yeterli anaerop üreme gerçekleşmemiştir. Bir diğer önemli kısıtlılık ise maliyettir. Rutin çalışmada elde edilen tanımlamaların 16S rRNA doğrudanması yüksek maliyet nedeni ile yapılamamış ve yeni yöntemin doğrudan tanımlaması ile rutin tanımlama yöntemlerinin karşılaştırılması olarak planlanmıştır. Araştırmacılar olarak üzerinde durduğumuz bir diğer kısıtlılık, yöntemin tek merkezde çalışılmış olmasıdır. Çalışmamızda tek merkez seçilmesindeki amaç, yöntem standardizasyonunun sağlanmasıdır. Bir sonraki aşamada, yöntemin çok merkezli olarak yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi planlanmaktadır.

Bu çalışmada, pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden doğrudan tanımlama yapabilen "in-house" bir yöntem geliştirilmiş ve klinik olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. "In-house" yöntemde, deterjan lizisine dayanan bir ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Laboratuvarlarımızda mevcut malzemelerin kullanımı ile geliştirilen bu ekstraksiyon yönteminin hazırlanması ve uygulanması oldukça kolaydır. Özellikle tek mikroorganizma üreyen kan kültürü şişelerinde kullanımının etkin ve etkili olduğu kanısındayız.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul kararı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Klein S, Zimmermann S, Kohler C, Mischnik A, Alle W, Bode KA. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol* 2012; 61(3): 323–31.
2. Morency-Potvin P, Schwartz DN, Weinstein RA. Antimicrobial stewardship: How the microbiology laboratory can right the ship. *Clin Microbiol Rev* 2016; 30(1): 381-407.
3. Boyanova L. Direct Gram staining and its various benefits in the diagnosis of bacterial infections. *Postgrad Med* 2018; 130(1): 105-10.
4. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49(4): 543–51.
5. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *Int J Microbiol* 2015; 2015: 827416-26.
6. Nonnemann B, Tvede M, Bjarnsholt T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *APMIS* 2013; 121(9): 871-7.
7. Machen A, Drake T, Wayne Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PLoS One* 2014; 9(2): e87870.
8. Jakovljević A, Bergh K. Development of a rapid and simplified protocol for direct bacterial identification from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *BMC Microbiol* 2015;15:258-66.
9. Riederer K, Cruz K, Shemes S, Szpunar S, Fishbain JT. MALDI-TOF identification of Gram-negative bacteria directly from blood culture bottles containing charcoal: sepsityper(R) kits versus centrifugation-filtration method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 82(2): 105-8.
10. Zhou M, Yang Q, Kudinha T, Sun L, Zhang R, Liu C, et al. An improved in-house MALDI-TOF MS protocol for direct cost-effective identification of pathogens from blood cultures. *Front Microbiol* 2017; 8: 1824-35.
11. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol* 2012; 50(10): 3324-28.
12. Caspar Y, Garnaud C, Raykova M, Bailly S, Bidart M, Maubon D. Superiority of SDS lysis over saponin lysis for direct bacterial identification from positive blood culture bottle by MALDI-TOF MS. *Proteomics Clin Appl* 2017; 11: 5-6.
13. Süzük Yıldız S, Kaşkatepe B, Altınok S, Çetin M, Karagöz A, Savaş S. Comparison of MALDI-TOF and 16S rRNA methods in identification of viridans group streptococci. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51(1): 1-9.
14. Tanner H, Evans JT, Gossain S, Hussain A. Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF. *BMC Res Notes* 2017; 10(1): 48-55.
15. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis* 2016; 52: 37-42.
16. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009; 4(11): e8041.
17. Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, Patel R. Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73(1): 21-6.
18. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137(9): 1247-54.

19. Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One* 2012; 7(3): e32589.
20. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1542-8.
21. Yakupoğulları Y, Otlu B, Çelik B, Gözükara Bağ HG. 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. *Mikrobiyol Bul* 2019; 53(1): 1-11.
22. Genç Bahçe Y, Toyran A, Aksoy A. Direct identification and determination of antimicrobial susceptibility of gram negative bacilli using the Phoenix™ FX system in blood cultures flagging positive. *Mikrobiyol Bul* 2019; 53(2): 119-33.