

**Steril Vücut Sıvılarında Bulunan Etkenlerin
Matriks ile Desteklenmiş Lazer
Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle
Spektrometresi (MALDI TOF MS) İle Hızlı
Tanısı**

Yücel DUMAN, Barış OTLU, Yusuf YAKUPOĞULLARI, M. Sait TEKEREKOĞLU

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

- Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan yeni, hızlı bir yöntemdir.
- Bu sistem klasik olarak; kültür plağında üretilen bakteri veya mantar kolonisinden etkeni dakikalar içerisinde tanımlayabilmektedir.
- Sistemin bakteri izolatlarında bildirilen duyarlılık ve özgüllük değerleri %84-%95, maya izolatlarında ise %85-%100 arasında değişmektedir.



- Son yayınlarda, MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak klinik örnekten etkenin direkt olarak tanımlanması için çalışmalar artmaktadır.
- Bu konuda en fazla çalışma kan ve idrar örneklerinden yapılmıştır.
- Yayımlanmış çalışmalarda; MALDI-TOF MS ile $>10^7$ m.o/ml içeren kan kültür örneklerinde $\geq 80\%$ etkenlerin doğru tanımlandığı bildirilmektedir.
- Kan ve idrar örnekleri dışında direkt steril vucut sıvısı (SVS) örneklerinden yapılan çalışmalar kısıtlı sayıda ve elde edilen sonuçlar değişken özelliktedir.

AMAÇ

- Çalışmamızda, kan ve idrar dışı steril vücut sıvısı (SVS) örneklerinde bulunan etkenlerin MALDI-TOF MS sistemi ile direkt olarak tanısının yapılması amaçlanmıştır.



GEREÇ VE YÖNTEM

- Laboratuvarımıza gönderilen SVS örnekleri MALDİ-TOF MS sistemi ve standart kültür yöntemleri ile değerlendirildi.

Örneklerin seçimi:

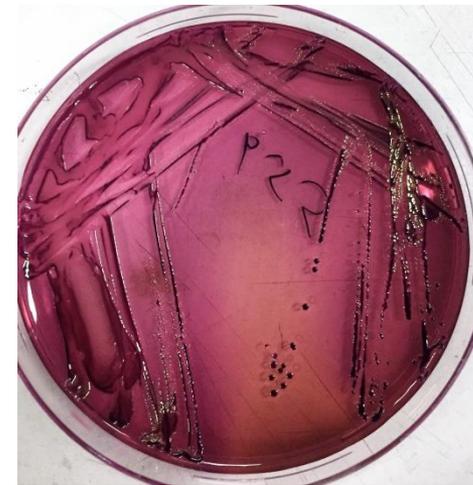
- Çalışmamıza; hastanemiz tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına Mart - Ağustos 2016 tarihleri arasında gönderilen beyin omurilik sıvısı (BOS), safra, parasentez, eklem sıvısı gibi steril vücut sıvıları dahil edilmiştir.
- Çalışmaya alınan örnekler konvansiyonel yöntemler ile kültür işlemine alınarak enfeksiyon etkenleri tanımlandı.
- Ayrıca MALDİ-TOF MS sistemi ile direkt klinik örnekler değerlendirildi.



GEREÇ VE YÖNTEM

Konvansiyonel yöntemlerle bakterilerin tanımlanması:

- Laboratuvarımıza gönderilen beyin omurilik sıvısı, safra, parasentez, eklem sıvısı gibi steril vücut sıvı örneklerinden %5 koyun kanlı agar, çikolata agar ve EMB (Eosin Methylene Blue) agara ekim yapıldı.
- Plaklar 35°C'de, aerobik ve %5 CO₂'li ortamlarda 24-48 saat inkübe edildi.



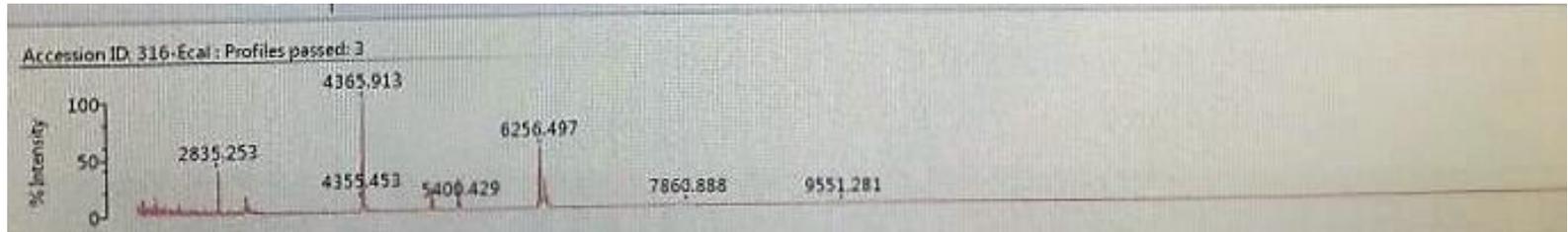
- Üreyen mikroorganizmalar öncelikle koloni morfolojisi, Gram boyama gibi konvansiyonel yöntemler ile tanımlandı.



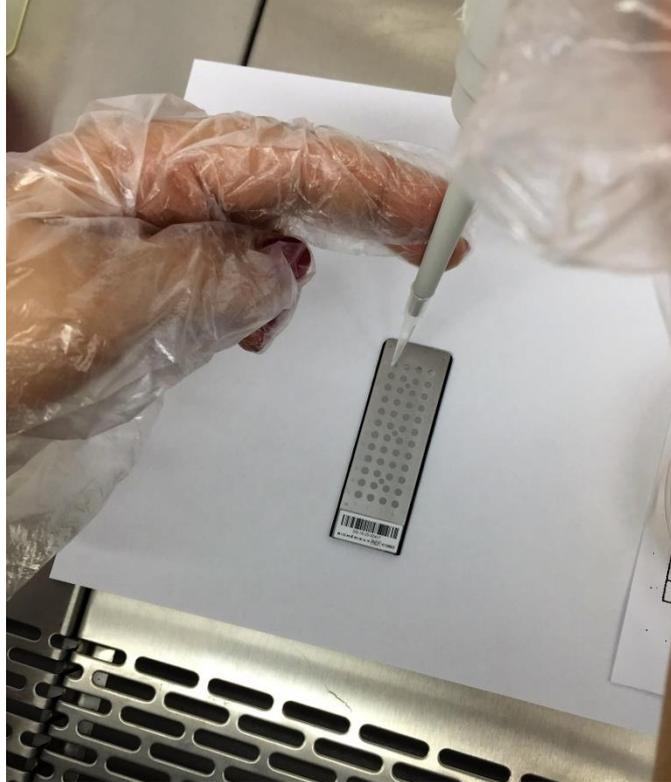
GEREÇ VE YÖNTEM

Steril Vücut Sıvılarının MALDI-TOF MS'a Hazırlanması (VITEK-MS, BioMerieux)

- Klinik örnekler lökositleri uzaklaştırmak için 2000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım başka bir tüpe alınarak 13.500 rpm'de 5 dk tekrar santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak pellet kısım aspire edildi.
- Bu sayede ortamda kalan kan hücresi bileşenleri de uzaklaştırılmış oldu.
- Elde edilen pellet, 300 µl deiyonize su ve 900 µl absolut etanol ile 13.500 xg'de 5 dk yıkandı.



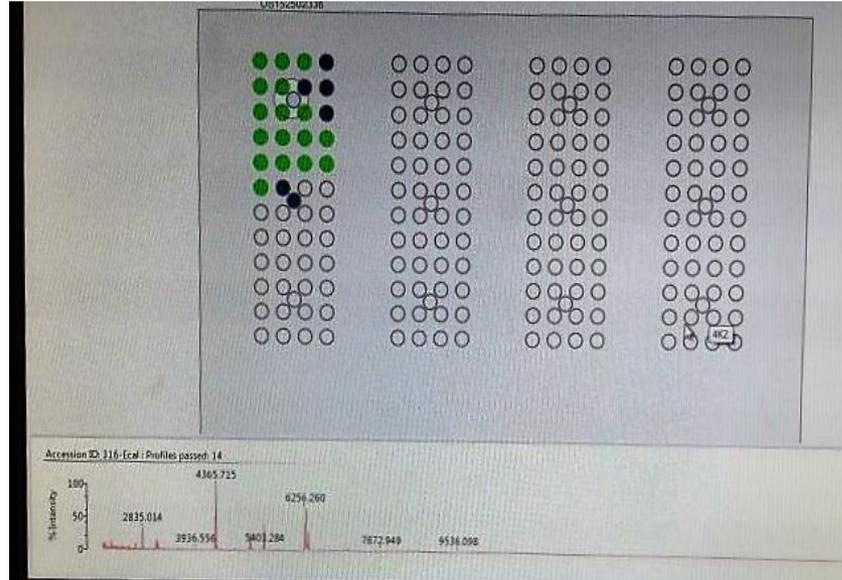
- Pellet kurutulduktan sonra, 50 μ l %70 formik asit ve 50 μ l %100 asetonitril eklenerek, 1 dk süreyle bakteri hücre bileşenlerinin ekstraksiyonu yapıldı.
- Ekstraksiyon ürünleri 13.500 xg'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant, Maldi-tof MS'de bakteriyel identifikasyon yapılmak üzere MALDI plate'ine uygulandı.



GEREÇ VE YÖNTEM

Verilerin değerlendirilmesi

- İşleme alınan SVS klinik örneklerinden kültürde üreme olanların sonuçları ile MALDI-TOF MS sistem sonuçları karşılaştırıldı.
- Bakteriyel kültür temel tanı yöntemi olarak kabul edilip, MALDI-TOF MS sisteminin sonuçları karşılaştırılarak değerlendirildi.

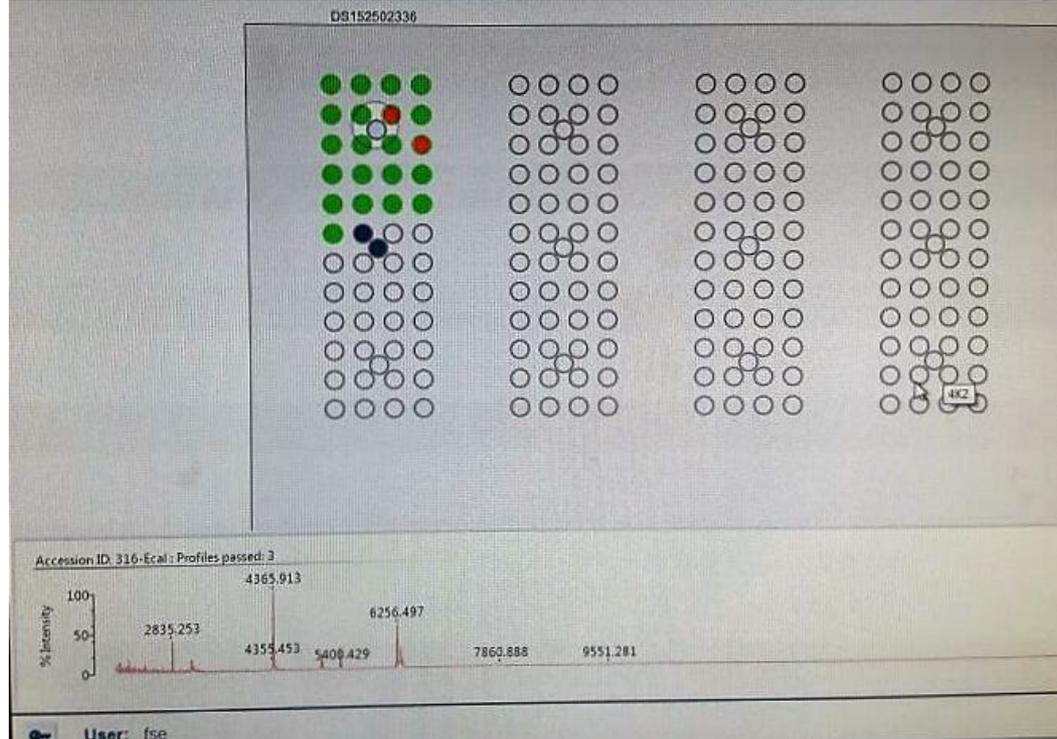


SONUÇLAR

- Altı aylık sürede değerlendirilen 563 SVS örneğinin 72'sinin kültüründe üreme oldu.
- Üreme olan klinik örneklerden 37'si BOS, 22'si parasentez, 12'si eklem sıvısı, 1'i safra idi.
- İzole edilen etkenler sırası ile;
 - 20 *A. baumannii*, 5 *P. aeruginosa*, 3 *K. pneumoniae*, 3 *E. coli*,
 - 4 *Enterococcus faecium*, 7 *S. aureus*, 20 KNS ve 5 *Candida spp.* üredi.
- Beş kültürde ise birden fazla gram negatif bakteri üredi.

SONUÇLAR

- MALDI-TOF MS ile direkt klinik örnekten yapılan değerlendirilmede, kültürde üreyen 31 gram negatif etkenin 23'ü doğrulandı.
- Gram pozitif etkenden ise sadece 4 *E. faecium* kültürle tam uyumlu olarak doğrulandı.



SONUÇLAR

	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	Test gücü
<i>A. baumannii</i>	%79	%98.1	%93.7	%93	%93.1
<i>P. aeruginosa</i>	%50	%100	%100	%97.1	%93.1
<i>K. pneumoniae</i>	%100	%100	%100	%100	%100
<i>E. coli</i>	%100	%100	%100	%100	%100
Gram negatif m.o	%79.3	%95.4	%92	%87.5	%89
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	%100	%100	%100	%100	%100
Gram pozitif m.o	%13.3	%97.7	%80	%61.8	%63
KNS	-	-	-	-	-

TARTIŞMA

- MALDI-TOF MS; kültür ortamında üretilen bakteri ve mayalar hızlı tespit edilerek, etkili sonuçlar veren bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.
- Bu yöntem ile kültürde üretilen etkenler birkaç dakika içerisinde tanımlanırken, direkt klinik örnekten identifikasyon genellikle 2 saat gibi kısa bir sürede yapılabilmektedir.
- SVS örneklerinde enfeksiyon etkenlerinin hızlı tespiti, hastaların yönetim süresini kısaltmak amacıyla önemlidir.



TARTIŞMA

- MALDI-TOF MS hızlı tanımlama yapabilmesi nedeni ile konvansiyonel ve otomatize tanımlama yöntemlerine bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.
- Literatürde direkt klinik örnekten MALDI-TOF MS ile identifikasyon genellikle kan ve idrar örneklerinde bildirilmektedir.
- Yapılan çalışmalarda idrar örneklerinden Veron ve ark(4) %78.9, Rossello ve ark(7) %90, Inigo ve ark(8) ise %89.1 oranında duyarlılık bildirmişlerdir.
- Kan kültür örneklerinde ise Robinson ve ark(9) %91, Schubert ve ark(10) %86.3, Barnini ve ark(3) Gram negatif bakterilerde %100, gram pozitif bakterilerde %96 oranında duyarlılık belirlemişlerdir.

TARTIŞMA

- Çalışmamızda SVS örneklerinin direkt MALDI-TOF MS ile incelenmesi sonucunda gram negatif bakterilerde duyarlılığının yüksek olduğu gözlenmiştir.
- İzole edilen gram negatif bakterilerin tamamı irdelendiğinde duyarlılık %79.3 olarak belirlendi.
- Özellikle *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında duyarlılık %100 olarak saptandı.
- Gram pozitif bakterilerde ise sadece 4 *E. faecium* direkt olarak örnekten belirlendi.
- Kültürde üretilen *S. aureus* ve KNS'lar ile *Candida spp.* izolatlarının direkt örnekten MALDI-TOF MS ile incelenmesinde, sonuç elde edilememiştir.
- Benzer şekilde, birden fazla gram negatif bakteri üreyen beş kültürde sonuç alınamamıştır.

TARTIŞMA

- Gram pozitif bakterilerin ve mayaların belirlenememesi örnek alımı sırasında oluşan cilt kontaminasyonundan ve buna bağlı olarak örnekte birden fazla bakteri olabileceğinden,
- veya klinik örneklerin az miktarda bakteri ihtiva etmeleri ve alınan örnek miktarının yetersiz olmasından kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

TARTIŞMA

- Bu sonuçlar bize yeterli miktarda ve cilt florası ile kontamine edilmeden alınan SVS örneklerinde enfeksiyon etkenlerinin hızlı bir biçimde MALDI-TOF MS ile tanımlanmasının mümkün olabileceğini göstermektedir.
- Aynı gün hatta birkaç saat içinde enfeksiyon etkeninin tanımlanması, bize daha erken ve etkin antibiyotik seçiminde avantaj sağlayacaktır.
- Gelecekte klinik örneklerden direkt identifikasyon için protokollerin geliştirilmesi ile MALDI-TOF MS konvansiyonel ve otomatize bakteri tanımlama yöntemlerinin yerini alabilecek bir yöntem olma potansiyeli göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(11):1620-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03290.
2. Yilmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H. Applications of MALDI-TOF MS in Microbiological Identification. *TAF Prev Med Bull*. 2014;13(5):421-6
3. Barnini S, Ghelardi E, Brucculeri V, Morici P, Lupetti A. Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate. *BMC Microbiol*. 2015;15:124. doi: 10.1186/s12866-015-0459-8.
4. Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, Hostis GL et al. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34(9):1787–95.
5. Segawa S, Sawai S, Murata S, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta*. 2014; 435:59-61. doi: 10.1016/j.cca.2014.04.024.
6. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Böcher S, et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis*. 2010;42(9):716-8. doi: 10.3109/00365541003754493.
7. March Rosselló GA, Gutiérrez Rodríguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, et al. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(2):89-94. doi: 10.1016/j.eimc.2014.02.022.
8. Íñigo M, Coello A, Fernández-Rivas G, et al. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples, Combining Urine Screening Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2016;54(4):988-93. doi: 10.1128/JCM.02832-15.
9. Robinson AM, Ussher JE. Preparation of positive blood cultures for direct MALDI-TOF MS identification. See comment in PubMed Commons below *J Microbiol Methods*. 2016;127:74-6. doi: 10.1016/j.mimet.2016.05.026.
10. Schubert S, Weinert K, Wagner C, et al. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn* 2011; 13(6): 701-6.