

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜTLE SPEKTROMETRİ YÖNTEMİ İLE POZİTİF
KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞELERİNDEN DİREKT
BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyda DURNA

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Enstitü Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Köroğlu

OCAK-2023

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜTLE SPEKTROMETRİ YÖNTEMİ İLE POZİTİF
KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞELERİNDEN DİREKT
BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyda DURNA

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Enstitü Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

**“Bu tez/...../20.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oy birliği/ Oy çokluğu ile
kabul edilmiştir.”**

JÜRİ ÜYESİ	KANAATİ	İMZA

BEYAN

Bu çalışma simülasyon çalışması olduğundan etik kurul onayına başvurulmamıştır.



TEŞEKKÜR

Hayatımın her alanında her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşim Faruk DURNA ve varlığı ile bana güç veren kızım Mihrimah DURNA'ya

Eğitim hayatım boyunca destek ve ilgilerini eksik etmeyen annem Selma ADATEPE ve babam Şerafettin ADATEPE'ye,

Yüksek lisans eğitimim, tez çalışmam ve çalışma hayatım boyunca bilgisi, tecrübesi, sabrı ve hoşgörüsü ile bana katkılarını sunan ve yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof.Dr.Mehmet KÖROĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinden destek aldığım Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ, Doç. Dr. Özlem AYDEMİR, Doç. Dr. Tayfur DEMİRAY ve Prof .Dr Sema KEÇELİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Şeyda DURNA

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMA SİMGELER	iv
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.SEPSİS TARİHÇESİ	4
2.2.KAN DOLAŞIMI ENFEKSİYONU	4
2.3. KAN KÜLTÜRÜ	5
2.3.1.Kan Kültürü Set Kavramı	5
2.3.2.Alınacak Kan Miktarı	7
2.3.3.Örneklerin İşlenmesi ve İş Akışı	7
2.3.4.Pozitif Sinyal Veren Şişelerin Değerlendirilmesi	8
2.3.5.Pasajların Değerlendirilmesi	8
2.4. MALDI-TOF MS	9
2.5.MALDI-TOF MS İLE POZİTİF KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞELERİNİN TEST EDİLMESİ	11
3. MATERYAL VE METOD.....	12
3.1.ÇALIŞMANIN AMACI.....	12
3.2.ÇALIŞMADA KULLANILAN MALZEMELER	12
3.3.ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI	13
4.BULGULAR.....	15
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	18
KAYNAKLAR	23

KISALTMA SİMGELER

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E.faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>S. hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KDE	Kan dolaşımı enfeksiyonu
SIRS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
KİKDE	Kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları
KKA	Koyun kanlı agar
ÇA	Çikolata agar
EMB	Eozin Metilen-blue agar
MCA	MacConkey agar
SDA	Sabouraud dekstroz agar
CHCA	α -cyano-4-hidroksisinnamik asit
SF	Serum fizyolojik

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Klinik durumlara göre alınması önerilen kan kültürü seti sayısı.	6
Tablo 2: Bakterilerin MALDI-TOF MS ile koloniden ve direkt kan kültür şişesinden identifikasyonunun karşılaştırılması (Jelli Tüp Metodu).	16
Tablo 3: Bakterilerin MALDI-TOF MS ile koloniden ve direkt kan kültür şişesinden identifikasyonunun karşılaştırılması (Ependorf Tüp Metodu).	17



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: MALDI-TOF MS'in Ölçümü.....	3
Şekil 2: MALDI-TOF MS'in çalışma prensibi (Hou, Chiang-Ni ve Teng 2019).	10



ÖZET

Giriş ve amaç: Kan dolaşımı enfeksiyonlarında etken mikroorganizmanın hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi tedaviye erken başlanılmasına olanak sağlayacağından hayati önem taşımaktadır. Bu çalışmada kütle spektrometri yöntemi ile pozitif kan kültürü şişelerinden çeşitli ön hazırlıklar yapıldıktan sonra direkt bakteri identifikasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada hazırlayıp cihaza yüklediğimiz 40 spike örnek pozitif sinyal verdikten sonra 5 ml kan jelli tüplere alındı. Çeşitli süre ve hızda santrifüj aşamasından geçirilen örnek peletleri ince tahta çubuk yardımıyla MALDI-TOF MS slaytlarında ki kuyucuklara inoküle edilip kuruması beklendi. Kuruduktan sonra üzerlerine 1 µl matriks ilave edildi. Bu karışım da kuruduktan sonra slaytlar cihaza yüklenerek identifikasyon sonuçları değerlendirildi.

Bulgular: *E. coli* suşlarında %80, *K. pneumoniae* suşlarında %100, *A. baumannii* suşlarında %66, *E. cloacae* suşlarında %50, *S. aureus* suşlarında %66, *S. epidermidis* suşlarında %66, *S. hominis* suşlarında %50, *S. haemolyticus* suşlarında %25, *E. faecalis* suşlarında %100 koloniden identifikasyon ile uyumlu sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda gram negatif bakterilerde %80 uyumlu sonuç görülürken; gram pozitif bakterilerde %45 uyumlu sonuç görülmüştür

Sonuç: MALDI-TOF MS ile pozitif kan kültürlerinden yapılan direkt identifikasyon sonucunda gram-negatif bakterilerde %80 başarı elde edilirken farklı yöntemler denenmesine rağmen gram-pozitif bakterilerde bu oran %45 olmuştur. Bu konuda özellikle gram-pozitif bakteriler için geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: sepsis, kan kültürü, direkt identifikasyon, MALDI-TOF MS,

ABSTRACT

Introduction and aim: Rapid and accurate detection of the causative microorganism in bloodstream infections is of vital importance as it will allow early initiation of treatment. In this study, it was aimed to investigate the direct bacterial identification after various preliminary preparations were made from positive blood culture bottles with mass spectrometry method.

Materials and Methods: In this study, 40 pre-prepared spike samples were taken into 5 ml blood gel tubes after giving a positive signal. The sample pellets, which were passed through the centrifugation stage at various times and speeds, were inoculated into the wells in the MALDI-TOF MS slides with the help of a thin wooden rod and waited to dry. After drying, 1 µl of matrix was added to them. After this mixture was dried, the slides were loaded into the device and the identification results were evaluated.

Results: Rapid identification results were consistent with the identification from the bacterial colonies with the following ratios: *E. coli* 80%, *K. pneumoniae* 100%, *A. baumannii* 66%, *E. cloacae* 50%, *S. aureus* 66%, *S. epidermidis* 66%, *S. hominis* 50%, *S. haemolyticus* 25%, *E. faecalis* 100%. In line with these results, 80% compatible results were seen in gram-negative bacteria; 45% consistent results were found in gram-positive bacteria

Conclusion: As a result of direct identification from positive blood cultures with MALDI-TOF MS, 80% success was achieved in gram-negative bacteria, while this rate was 45% in gram-positive bacteria despite different methods being tried. In this regard, large and comprehensive studies are needed, especially for gram-positive bacteria.

Keywords: sepsis, blood culture, direct identification, MALDI-TOF MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sepsis hastalarının hayatta kalabilmeleri için hızlı ve doğru ampirik antimikrobiyal tedavi şarttır (Degand, Carbonnella ve Dauphin 2008, Dieckmann, Helmuth, Erhard ve Malorny 2008).

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında, hızlı tespit ve tedaviye ihtiyaç vardır ve bundan dolayı öne çıkan özelliklerin farkında olmak son derece önemlidir. Kan dolaşımı enfeksiyonlarında patojen mikroorganizmanın çok hızlı ve en doğru şekilde izole edilip identifikasyonunun yapılması tedaviye erken başlanılmasına olanak sağlayacağından hayati önem taşımaktadır (Aydın, Kaşıkçıoğlu, Koşucu, Timurkaynak ve Arslan 2014). Pozitif kan kültürü şişesinde en hızlı ve en doğru identifikasyona alt yapı sağlayan yöntemler ampirik tedaviye rehberlik etmede önemli bir rol oynamaktadır (Kempf, Trebesius ve Autenrieth 2000).

Yüksek insidansa sahip olan sepsis dünya genelinde önde gelen ölüm sebepleri arasındadır. Kan dolaşımı enfeksiyonlarında, uzun yıllar Gram negatif bakteriler etken olarak ön plandayken; son yıllarda, *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokok (KNS)'lar ve enterokoklar gibi Gram pozitif bakterilerin daha fazla etken oldukları görülmektedir (Öncül, Topçu, Söyletir ve Doğanay 2008).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışılan kan kültürü yöntemi, kan dolaşımı enfeksiyonuna sebep olan etken mikroorganizmaların izole edilmesi ve antimikrobiyal testlere olanak sağlaması amacıyla yapılan çok önemli ve çok değerli bir tanı yöntemidir. Kan dolaşımına sebep olan etkenin bilinmesi enfeksiyon ve sepsis gibi mortalitesi yüksek durumlarla mücadelede şüphesiz en önemli basamaktır. Ayrıca kültür işleminden elde edilen sonuçlar erken tedavi uygulanabilmesi açısından önemlidir (Yüce, Demirdağ, Kalkan ve ark. 2005).

Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden kanlı agar ve Eozin Metilen-Blue (EMB) agara pasaj alınarak 37°C Etüvde 18-24 saat inkübe edildikten sonra üreyen bakteriler tanımlanabilmektedir. Kültür ekimi yapılırken preparat hazırlanıp gram boyama yapılarak üreyen bakterinin gram pozitif veya gram negatif olduğu klinisyene bilgi verilerek ampirik tedavi başlanılabilir. Geleneksel yöntemlerle bakterinin tür düzeyinde isminin verilmesi uzun sürdüğü (yaklaşık 24 saat) ve kan dolaşımı enfeksiyonunda hızlı ve doğru antimikrobiyal tedaviye başlanmasının hayati önemi olduğu düşünüldüğünde daha hızlı ve doğru sonuç veren yöntemler araştırılmaya gidilmiştir.

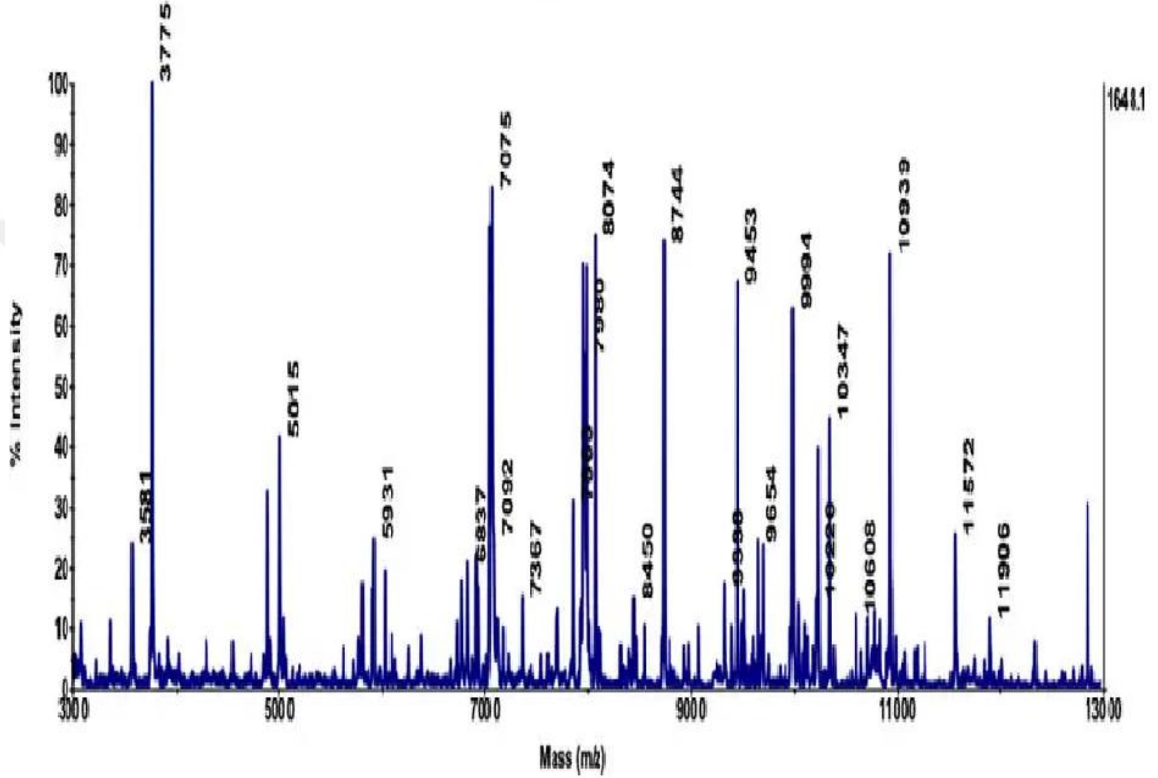
MALDI-TOF MS (Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry) mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılan hızlı, maliyeti düşük, doğru sonuç veren bir kütle spektrometri sistemidir (Croxatto ve Prod'hom 2012, Wieser,Schneider ve Jung 2012). MALDI-TOF MS sisteminde mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edilerek elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilir ve böylece protein profilleri ortaya çıkarılmaktadır. Sistemin veritabanında bulunan ve referans alınan mikroorganizmaların profil spektrumlarına ait grafiksel görüntüler ile elde edilen protein profilleri arasındaki uyumun sonucuna göre mikroorganizmalar cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmektedir (Anhald 1975).

MALDI-TOF MS cihazı ana hatlarıyla üç bölümden oluşmaktadır. Bunlar;

- (a) İyonizasyon kaynağı:** MALDI ve ESI soft iyonizasyon kaynaklarıdır.
- (b) Kütle analizörü:** Lazer dezorbsiyon sistemi çeşitli kütle analizörleri ile kombine edilmektedir. TOF (time of flight) MALDI ile birlikte çoğunlukla kullanılan kütle spektrometresidir.
- (c) Algılama bölümü:** Analizler İyonların kütle yüküne bağlı olarak yapılıp, biyomoleküler yoğunluklarına ve oranına göre sınıflara ayrılmaktadır. (Croxatto ve Prod'hom 2012).

Analiz için kristalize hale gelen örnekler lazer ışınlarına maruz kalır ve lazerden alınan bu enerji, karışımdan iyonların buharlaşmasını ve gaz fazına geçilmesini sağlar. Uçuş

tüpünde geçirdikleri zamana göre serbest hale gelmiş ve elektromanyetik alanda hızlandırılmış iyonların kütle ağırlıkları belirlenir. Kütleye bağlı tek yüklü iyonlardan elde edilen pikler MALDI ile yapılan dezorbsiyon işlemi sonucunda ortaya çıkmaktadır.



Şekil 1: MALDI-TOF MS'in Ölçümü

Kan dolaşımı enfeksiyonları ve sepsis hastalarında etken mikroorganizmanın hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi tedavinin yönlendirilmesi açısından hayati öneme sahiptir. Bu çalışmada, simüle örnekler kullanılarak kütle spektrometri yöntemi ile pozitif sinyal alınan kan kültürü şişelerinden çeşitli ön hazırlıklar yapıldıktan sonra direkt bakteri identifikasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.SEPSİS TARİHÇESİ

"Sepsis" kelimesi, çürümüş et ve çürüme için eski Yunancadan türetilmiştir. 1914'te Hugo Schottmüller, sepsisin ilk bilimsel tanımını "sepsis, yerel bir enfeksiyöz kaynaktan kan dolaşımına mikrobiyal istilanın neden olduğu ve uzak organlarda sistemik hastalık belirtilerine yol açan bir durumdur." sözleri ile yapmıştır.. Sepsis ve septiseminin, bakteriyemiye ek olarak bir dizi kötü tanımlanmış klinik duruma atıfta bulunduğu düşünülmüş ve pratikte bu terimler genellikle birbirinin yerine kullanılmıştır. Bununla birlikte, sepsis belirti ve semptomları olan hastaların yarısından daha azında pozitif kan kültürü sonuçları veya enfeksiyöz bir hastalığın diğer mikrobiyolojik sonuçları vardır (Brun-Buisson, Meshaka, Pinton ve Vallet 2004). William Osler (1849-1919), sepsiste enfeksiyonun değil de konak tepkisinin önemli rolünü ilk fark eden kişi olmuştur: "Birkaç durum dışında, hasta enfeksiyondan ziyade vücudun enfeksiyona verdiği tepkiden ölüyor gibi görünüyor." söylemiyle bu durumu işaret etmiştir.

2.2.KAN DOLAŞIMI ENFEKSİYONU

Tüm dünyada özellikle hastanelerde yatmakta olan hastalarda en önemli morbidite ve mortalite sebeplerinden biri kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE)'dur. (Kim ve Weinstein 2013). Enfeksiyon hastalıklarının devam ederken veya malignensi, yanıklar, intravasküler kateter, immünsüpresyon, travmatik ve cerrahi yaralar gibi risk faktörlerinin varlığında bazı mikroorganizmalar hastanın kanına karışarak bakteriyemi

ve fungemiye sebep olmaktadır. Kan dolaşımı enfeksiyonları, sınırları olan bir hastalığa sebep olabileceği gibi hayati tehlikesi olan sepsis, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), çoklu organ yetmezliği, septik şok gibi çeşitli klinik tablolara da sebep olabilmektedir (Ntusi, Aubin, Oliver, Whitelaw ve Mendelson 2010).

2.3. KAN KÜLTÜRÜ

Kan kültürleri, enfektif endokardit, nedeni bilinmeyen ateş, fungemi ve bakteriyeminin tanısı için en önemli tahlildir. Kan kültürlerinin tanısında önemli bir yere sahip olduğu diğer enfeksiyonlarda; kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları (KİKDE), septik artrit, protez enfeksiyonları (eklem, vasküler greft vb.), osteomyelit ve pnömoni gibi enfeksiyon hastalıklarıdır (KLİMUD 2017).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en hızlı ve özenle yapılması gereken işlerden biri kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısıdır. Pozitif sonuç veren kan kültürleri kan dolaşımı enfeksiyonlarının %35'ini oluştursa da bu teknikle etken mikroorganizmanın izole edilmesi ve izole edilen etken mikroorganizma ile identifikasyon ve antibiyogram testleri yapılması sayesinde altın standart yöntemdir (KLİMUD 2017).

2.3.1.Kan Kültürü Set Kavramı

“Bir kan kültürü seti” söylemi ile tek bir damar girişiyle alınan kanın belli miktarlarda aktarılacak dağıtıldığı kan kültür şişelerinin tamamı kast edilmektedir. En ideal set, bir aerobik kan kültür şişesi ve bir anaerobik kan kültür şişesinden oluşmalıdır. Bu durum çocuk hastalarda değişmektedir. Sadece aerobik kan kültür şişesi içeren setlerin, hem aerobik hem anaerobik kan kültür şişesi içeren setlere göre; stafilokoklar, Enterobacteriaceae üyeleri ve anaerobların üretilme oranının düşük olduğu bildirilmiştir (KLİMUD 2017).

Tablo 1: Klinik durumlara göre alınması önerilen kan kültürü seti sayısı.

Klinik durum	Kan kültürü set sayısı	Öneriler
Bakteriyemi veya fungemi şüphesi olan durumlar	2 kan kültür seti	Farklı iki damardan art arda iki set alınır.
Abdominal sepsis, menenjit, artrit, pnömoni, osteomyelit, ve diğer bakteriyemi olasılığı olan durumlar	2-3 kan kültür seti	Farklı damarlardan art arda üç set alınır veya farklı iki damardan art arda iki set alınır, üçüncü set 4-6 saat sonra alınır.
Enfekte olmuş endovasküler cihazların sebep olduğu; kalp pili, greft veya protez kapak endokarditi gibi durumlar	4 kan kültür seti	Dört setin hepsi 24 saat içinde alınır. Farklı damarlardan iki veya üç set art arda alınır, üreme 24 saat içinde yoksa bir set veya farklı iki damardan art arda iki set alınır.
Sebebi bilinmeyen ateş	4 kan kültür seti	Dört setin hepsi 24 saat içinde alınır. Farklı damarlardan iki veya üç set art arda alınır, üreme 24 saat içinde yoksa bir set veya farklı iki damardan art arda iki set alınır.
Enfektif endokardit	5-6 kan kültür seti	Hastanın durumu kritik ise bir saat içinde üç set alınır ya da ilk 24 saat içinde farklı zamanlarda farklı venlerden üç set alınır. 48 saat inkübe edilir üreme yoksa aynı şekilde iki veya üç set daha alınır

2.3.2.Alnacak Kan Miktarı

Yetişkin hastalarda 20-30 ml kan, her kan kültürü seti için alınması gereken ideal kan hacmidir. Etken mikroorganizmaların saptanması kan kültürü şişesine alınan kan hacmi ile doğrudan ilişkilidir. Bir ml kan hacmindeki artışın etken mikroorganizmaların saptanma oranını %3 artırdığı tespit edilmiştir. Kan hacmindeki azlık veya gereksiz fazlalık yalancı negatif sonuçlar çıkmasına sebep olmaktadır.

Çocuk hastalarda tahmin edilenden çok daha yüksek (%38-68) olan düşük düzey bakteriyemilerde [≤ 10 Koloni Oluşturan Birim (KOB/mL)] zaten düşük olan mikroorganizmaların izole edilebilmesi için kan hacminin minimum 2 ml olması gerekmektedir. Bu sebeple, çocuk hastalarda da alınabilecek en fazla kan hacmi çocuğun total kan hacmi ve kilosu göz önünde bulundurularak belirlenip alınabilecek en fazla kan ile kan kültürünün yapılması son derece önemlidir. Hastanın sağlığını tehlikeye atmadan toplam kan hacminin en fazla %4-5'ini tek seferde alarak kan kültürü yapılabilir. Bu oran çocuk hastalarda, toplam kan hacminin minimum %1'i olmalıdır.

Kan kültürlerinde kontaminasyonu azaltmak, etken mikroorganizmanın izole edilme olasılığını arttırmak ve kültürün pozitif sinyal verme süresini kısaltmak için alınan kan hacmini arttırmak son derece önemlidir. Böylece hızlı ve doğru sonuç elde edilmiş olur (KLİMUD 2017).

2.3.3.Örneklerin İşlenmesi ve İş Akışı

Kan kültürleri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında otomatize kan kültürü sistemleri kullanarak takip edilir. Cihaz üreme olan şişeleri tespit edip pozitif sinyal yakarak belirtir. Pozitive dönmeyen şişeler beşinci günün sonunda negatif sinyal vermektedir. İnkübasyon süresinin kısılması ve kontaminasyon oranlarının azalması bu sistemlerin kullanılmasının sağladığı en büyük faydalardandır. Kan kültürü şişesi cihaza yüklendikten sonra pozitif sinyal alma süresi; toplanan kan miktarına, kandaki mikrobiyal yüke ve patojenik mikroorganizmanın büyüme hızına bağlıdır. Otomatik kan kültürü sistemleri için standart inkübasyon süresi beş gündür. Beş gün içinde pozitif sinyal vermeyen şişeler negatif kabul edilir. Fakat hastanın klinik tablosu gerçekten bir kan dolaşımı enfeksiyonundan şüphelendiriyor ve kan kültürü negatif

çıkıyorsa, zor üreyen ya da kültürü yapılamayan mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlar akla gelmelidir (KLİMUD 2017).

2.3.4.Pozitif Sinyal Veren Şişelerin Değerlendirilmesi

- a) Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesi en kısa sürede cihazdan çıkartılır.
- b) Şişenin kapak kısmı dezenfektan ile silinip ve kurutulur.
- c) Enjektör ile şişeden alınan kandan preparat hazırlamak için lama bir damla damlatılır. Daha sonra yayılıp gram boyama yapılır. Burada amaç mikroorganizmanın gram-negatif bakteri, gram-pozitif bakteri ya da maya olup olmadığını tespit edip klinisyene ön bilgi vermektir.
- d) Kültür ekimi için koyun kanlı agar (KKA) ve Eozin-metilen mavisi agar (EMB)’a 1-2 damla enjektör ile şişeden çektiğimiz kan damlatılıp tek koloni düşürme tekniği ile ekim yapılır. Plaklar 35-37 °C etüvde 24-48 saat süreyle inkübe edilir.
- e) Boyama sonucunda maya görüldüğünde gerek görülürse Sabouraud dekstroz agar(SDA)’a 1-2 damla kan damlatılıp yine tek koloni düşürme tekniği ile ekim yapılır. Plaklar 35-37 °C etüvde 24-48 saat süreyle inkübe edilir.
- f) Plaklar günlük olarak ilgili uzman tarafından değerlendirilir (KLİMUD 2017).

2.3.5.Pasajların Değerlendirilmesi

Besiyerlerinde üreyen ve etken olduğu düşünülen tüm mikroorganizmalara identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık testi yapılır. Bu testlerin sonucuna göre klinisyen hastaya en etkili antimikrobiyal tedaviye başlar.

İşlem süresi oldukça uzun olduğu için erken tanı açısından yetersiz kalsa bile kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında kan kültürü altın standart yöntemdir. Bazı teknik sınırlamalar günümüzde kullanılan otomatize kan kültür sistemlerindeki gelişmelere rağmen tam anlamıyla ortadan kalkmamıştır (Karakoç 2014). Kan kültürünün geleneksel mikrobiyolojik tanı yöntemleri kullanılarak yapılması ile sonuçlar en az 48-72 saat ve bazı durumlarda daha uzun sürelerde verilmektedir.

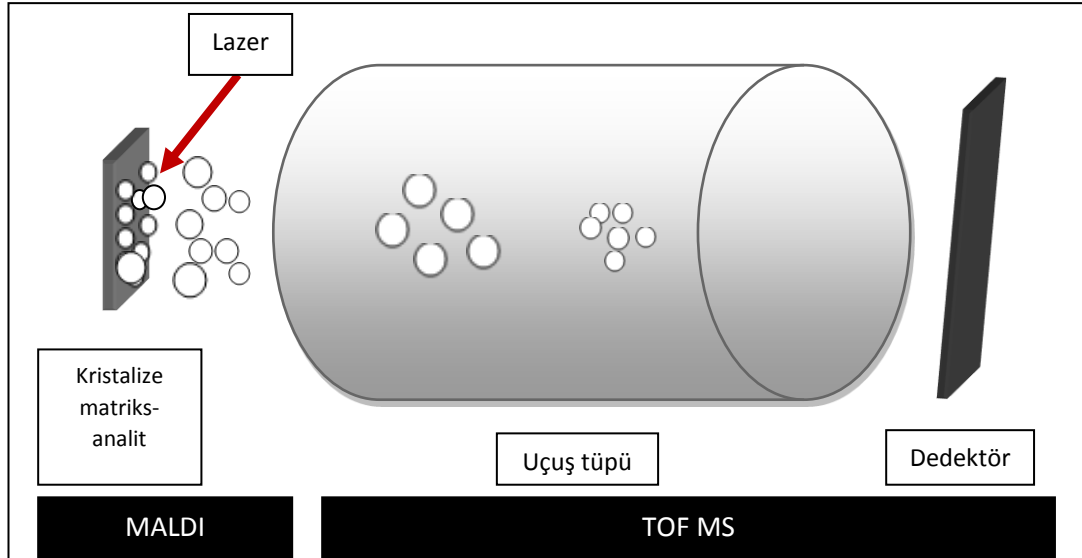
Kan kültürünün alınma zamanı, kan kültürü seti sayısı, alım teknikleri, alınan örnek miktarı, cilt antisepsisi, kullanılan besiyeri, inkübasyon koşulları, örneği alan sağlık personelinin bu konuda eğitilmiş olup olmaması gibi örneğin alınmasından

sonuçlanmasına kadar her aşamada çok fazla faktör kan kültürü sonucunun laboratuvar ve klinik açıdan değerlendirilmesini etkilemektedir (Ntusi, Aubin, Oliver, Whitelaw, Mendelson 2010). Tüm aşamalar en doğru şekilde yapılsa bile KDE'lerin en fazla %35'inde kan kültürlerinden etken izole edilebilmektedir (Reinhart, Bauer, Riedemann, Hartog 2012). Tanıya katkı sağlayan daha hızlı ve kolay uygulanabilir testlerin geliştirilmesi ve kan kültürüne ek bu testlerinde kullanılması bu sebeple çok önemlidir.

2.4. MALDI-TOF MS

Kütle spektrometresi, bir maddenin kütle/yük (m/z) oranını ölçen analitik bir tekniktir. Bu alanda araştırmaların başlaması 150 yıl geçmişe dayanmaktadır ve yıllar içinde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Teknik, 1950'lerden beri mikroorganizmalar üzerinde çalışan ve kütle spektrometresi ile bakterileri tanımlamaya çalışan bilim adamlarının da ilgisini üzerine çekmiştir. İlk kez kütle spektrometresi kullanılarak bakterilerin tanımlanmasını Fenselau ve Anhalt başarmıştır (Anhalt ve Fenselau 1975). Karas ve ark. (1987), bilim dünyasına “matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon (MALDI)” kavramını UV ışını ve matriksi kullanıp alanin aminoasitini iyonize etmeyi başarak kazandırmışlardır. Daha sonra yaptıkları çalışmalarla yüksek ağırlıklı bir proteini iyonize etmeyi başaran Tanaka ve ark. bu buluş sayesinde Nobel ödülünü kazanmışlardır. Kütle spektrometri yöntemi olarak uçuş zamanını kullanan Cain ve ark. (1994), MALDI-TOF MS ile bakterilerin ilk kez tanımlanmasını sağlamışlardır. Günümüzde FDA onaylı iki ticari yöntem MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, MA, ABD) ve VITEK MS (bioMérieux, Durham, NC, ABD)'dir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından bu iki sistem kullanılmaktadır (Procop et al. 2017, Hou, Chiang-Ni ve Teng 2019). MALDI-TOF MS prosedüründe, identifikasyonu yapılacak bakterinin besiyerinde üremiş kolonilerinden az miktarda öze veya özel kalemler ile alınıp bir metal plak (slayt) üzerine yayılıp üzerine matriks eklenip karıştırılır. Matriks solüsyonu organik solvent ve saf su içeren bir bileşimdir. En sık kullanılanı α -cyano-4-hidroksisinnamik asittir (CHCA). Bakterinin hücre zarını parçalayarak protein moleküllerinin (çoğunlukla ribozomal proteinler) birbirlerinden kopmasını sağladıktan sonra Solventler (asetonitril, etanol, aseton, metanol, kloroform gibi) buharlaşarak ortamdan

uzaklaşırlar. Matriks-analit karışımı kurduğunda kristalleşir. Ardından, plaka üzerindeki bu karışıma lazer ışığı darbeleri (belirli bir dalga boyundaki ultraviyole ışık) uygulanır. Matriks, lazerin enerjisini emer ve onu ısıya dönüştürür. Üretilen ısı, analit içindeki moleküllerin proton (H^+) kazanıp veya kaybederek iyonlaşmasına neden olur ve bu yüklü iyonlar elektrik alanında m/z oranına göre hareket eder. Bu hareket, cihazdaki elektrotlar tarafından hızlandırılır. İyonlar uçuş tüpünden geçerken reflektörler (iyon aynaları) tarafından en arkadaki dedektöre yansıtılır. Küçük iyonlar daha hızlı hareket eder ve dedektöre daha büyük iyonlardan daha erken ulaşır. Şekil 2’de MALDI-TOF MS’in çalışma prensibi basitçe şematize edilmiştir. Dedektör, analitin kütle spektrumunu oluşturmak için iyonların uçuş süresini (uçuş süresi kütle spektrometrisi, TOF MS) hesaplar. Bu spektrumlar daha sonra cihazın veri tabanındaki mikroorganizmaların tüm spektrumları ile karşılaştırılır ve tanımlanır. Tüm bu işlemlerin her bir bakteriyi incelemenin birkaç dakika sürdüğü ve uygulanmasının basit olduğu düşünüldüğünde, MALDI-TOF MS'nin anaerobik bakterilerin tanımlanmasını geleneksel yöntemlere göre hızlandırdığı görülmektedir. Ayrıca ekipman satın alındıktan sonra yapılacak takip çalışmalarının maliyeti de bu yaklaşımın bir diğer avantajıdır (Elssner, Kostrzewa, Maier ve Kruppa 2011, Clark, Kaletaa, Arora ve Wolk 2013, Singhal, Kumar, Kanaujia ve Virdi 2015).



Şekil 2: MALDI-TOF MS'in çalışma prensibi (Hou, Chiang-Ni ve Teng 2019).

2.5.MALDI-TOF MS İLE POZİTİF KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞELERİNİN TEST EDİLMESİ

MALDI-TOF MS, kan kültürü şişelerinde üreyen mikroorganizmaların standart yöntemle tanımlanmasından çok daha hızlı bir şekilde tanımlanması için kullanılabilir. Pozitif şişeler, katı ortama alt kültürlenebilir ve kısa bir inkübasyon süresinden (örn. 2-4 saat) sonra MALDI-TOF MS ile büyüme testi yapılabilir. Alternatif olarak, kan kültürü şişeleri doğrudan test edilebilir. Kan kültürü şişeleri kandan ve üreme ortamından makromoleküller içerdiğinden, bu uygulama ön işlem gerektirir. İşleme, diferansiyel santrifüjleme ve yıkamalar, kan hücrelerinin seçici lizisi, serum ayırıcı tüpler veya filtrasyon kullanılarak gerçekleştirilebilir; Sepsityper (Bruker Daltonics, ABD) kullanılarak ticari işleme mevcuttur(Mart-Rossello GA, Munoz-Moreno MF, Garcia-Loygorri-Jordan de Urries MC, Bratos-Perez MA. Kütle spektrometrisini (MALDI-TOF) geliştirmek için diferansiyel bir santrifüj protokolü ve doğrulama kriteri, kan kültürü büyütme şişeleri kullanılarak mikrobiyal tanımlamaya yol açar (Eur 2013). Sonuçlar elde edildiğinde geçerli olsa da, verim genellikle doğrudan koloni testi kadar iyi değildir ve çoğu çalışmada gram-pozitif organizmalardan daha yüksek oranda gram-negatif organizmalar tanımlanmıştır (Nonnemann, Bjarnsholt 2013)

3. MATERYAL VE METOD

3.1.ÇALIŞMANIN AMACI

Kan dolaşımı enfeksiyonları ölüm oranı oldukça yüksek enfeksiyonlardandır. Bu enfeksiyonların teşhisinde kan kültürü altın standart olmakla birlikte geleneksel kan kültürlerinde etkenin izole edilmesi ve identifikasyonu 18-24 saat sürmektedir. Kan dolaşımı enfeksiyonlarında hızlı ve doğru tedaviye geçilmesi hayati önem taşıdığından bu süreyi kısaltmak ve doğru ampirik tedaviye başlamak için çok farklı yöntemler üstünde çalışılmış denemeler yapılmıştır. Son yıllarda bakteri üremesi olmuş plaklardan identifikasyon için kullanılan lazer destekli MALDI-TOF MS cihazı ile pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden alınan bir miktar kanın çeşitli ön hazırlıklardan geçirildikten sonra cihazda okutulması ile direk identifikasyon yapılması ve geleneksel yöntemlerin kullanılmasında beklenen 18-24 saatlik sürenin yaklaşık 1 saate indirgenmesi amaçlanmıştır.

3.2.ÇALIŞMADA KULLANILAN MALZEMELER

- BacT/ALERT® BPA kan kültür şişesi
- BacT/ALERT® otomatize kültür cihazı
- VITEK® MS
- 16x100'lük 8,5 ml BD Vacutainer plastik SST jelli tüp
- 5 cc'lik enjektör
- 1.5ml ependorf tüp
- Mikropipet ve mikropipet ucu (sarı, beyaz)
- %100'lük Asetonitril
- %70'lük Formik asit
- %100'lük Eetanol

3.3.ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Bu çalışma simülasyon çalışması olduğundan etik kurul onayına başvurulmamıştır.

Çalışmada 40 adet spike örnek kullanıldı. Simülasyon çalışmalarımızda laboratuvarda bulunan kültür koleksiyonundan standart bakteri suşlarından, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603™, *Escherichia coli* ATCC 25922™, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853™, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213™ ve laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan ve kaynağı kan kültürü olan boncuklu saklama besiyerinde stoklanmış, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus* kullanıldı.

Uygulanan yöntemde ilk önce tüm bakterilerden 0,5 McFarland yoğunluğunda süspanse edilip vortekslendikten sonra her birinden steril polipropilen tüplere 10 µl aktarıldı. 10 ml %0,9 serum fizyolojik (SF) tüm polipropilen tüplere ilave edildip vortekslendikten sonra yine her birinden BacT/AlertALERT-FN Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kan kültürü şişelerine 0,5 ml ekim yapılarak spike/simüle örnekler hazırlanmış oldu. Son olarak tüm kan kültürü şişelerine 10 ml kan eklenerek BacT/ALERT® 3D Microbial Detection System (3D, bioMérieux Inc., Durham, NC, ABD) cihazına yerleştirildi.

Otomatize kan kültür sisteminden pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerin direkt identifikasyonunda iki metod üzerinde çalışıldı:

1.Metod (Jelli Tüp Metodu): Pozitif sinyal veren kan kültürü şişeleri hafifçe alt üst edilerek steril enjektörler ile 5 ml kan 16x100'lük 8,5 ml jelli tüplere alındı. Tüpler 3000 rpm/10 dk santrifüj edildi Üstte kalan süpernatant mikropipet kullanılarak dışarıya atıldı. Kalan pelletin üzerine 1 ml SF eklendi hafifçe çalkalanarak jelle yapışan bakterilerin SF ile karışması sağlandı. Karışım 1,5 ml'lik Eppendorf tüplerine aktarıldı. Eppendorf tüpler 13500 rpm / 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı üzerine 800 µl %100'lük etanol eklendi. 13500 rpm / 2 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Tekrar 13500 rpm / 2 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Pelet oda ısısında 10 dk bekletilerek kurutuldu.

15 µl %100'lük asetonitril ve 10µl %70'lik formik asit eklendi. Tekrar 13500rpm /2 dk santrifüj edildi. Bu şekilde ön hazırlığı biten örneklerin pelletleri ince tahta çubuk

(pamuksuz ahşap eküvyon çubuk) yardımıyla MALDI-TOF MS slaytlarındaki kuyucuklara inoküle edilip kuruması beklendi. Kuruduktan sonra üzerlerine 1 µl matriks solüsyonu eklendi. Matriks, kuruduktan sonra slaytlar cihaza yüklenerek identifikasyon sonuçları değerlendirildi.

2. Metod (Ependorf Tüp Metodu): Pozitif sinyal veren kan kültürü şişeleri hafifçe alt üst edilerek steril enjektörler ile 1 ml kan alınıp 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılır. Tüp 500 rpm de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant başka bir tüpe alınır bu yeni tüp 13000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır pelet üzerine 1 ml SF eklenip vortekslenir ve yine 13000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Tekrar süpernatant atılır pelet üzerine 5 µl formik asit eklenip 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakılır. Süre dolunca 5 µl asetonitril eklenir vortekslenir ve 13000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır peletten tahta cübük ile az miktarda alınıp slayta yayılır kuruyunca üzerine 1 µl matriks damlatılır ve cihaza yüklenip analiz edilir.

4.BULGULAR

1.Metod (Jelli Tüp Metodu): Çalışmada kullanılan beş *E. coli* suşunun; dört tanesi tanımlanırken bir tanesini cihaz okumamıştır. *E. coli* suşlarında başarı oranı; %80 olarak tespit edilmiştir. beş adet *K. pneumoniae* suşlarının hepsi doğru tanımlanmıştır (başarı oranı; %100). *P.aeruginosa* suşlarından dört tanesini doğru tanımlamış bir tanesini okumamış başarı oranı; % 80 bulunmuştur. *A. baumannii* suşlarının iki tanesi doğru tanımlarken bir tanesi tanımlanamamış olup, başarı oranı; %66 olarak saptanmıştır. *E. cloacae* suşlarının yarısı tanımlanırken yarısı tanımlanamamış ve başarı oranı; %50 olarak tespit edilmiştir. *S. aureus* suşlarında iki tanesi doğru tanımlanırken üç tanesi tanımlanamamış ve başarı oranı %40 bulunmuştur. *S. epidermidis* suşlarından da iki tanesi doğru tanımlanırken üç tanesi tanımlanamamış ve başarı oranı; %40 olarak saptanmıştır. *S. hominis* suşlarında yarısı doğru tanımlanırken yarısı tanımlanamamış başarı oranı; %50 olarak saptanmıştır. *S. haemolyticus* suşlarından bir tanesi tanımlanmış üç tanesi tanımlanamamış olup, başarı %25 olmuştur, *E. faecalis* suşlarında hepsini doğru tanımlamış ve başarı oranı; %100 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak bakıldığında; gram negatif bakterilerde %80 oranında uyumlu sonuç çıkarken, gram pozitif bakterilerde %45 uyum oranı saptanmıştır.

2.Metod (Ependorf Tüp Metodu): Çalışmada kullanılan *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının hepsi doğru tanımlanmıştır (başarı oranı; %100). *P.aeruginosa* suşlarından dört tanesi doğru tanımlanmış ve bir tanesi tanımlanamamış olup, başarı %80 olarak bulunmuştur. *A. baumannii* suşlarında hepsini doğru tanımlanmıştır (başarı oranı; %100). *E. cloacae* suşlarının yarısı tanımlanırken yarısı tanımlanamamıştır (başarı oranı; %50). *S. aureus* suşlarından üç tanesi doğru tanımlanırken iki tanesi tanımlanamamıştır (başarı oranı; % 60). *S. epidermidis* suşlarından iki tanesi doğru

tanımlanırken üç tanesi tanımlanamamıştır (başarı oranı; %40). *S. hominis* suşlarının yarısı doğru tanımlanırken yarısı tanımlanamamıştır (başarı oranı; %50). *S. haemolyticus* suşlarında iki tanesi tanımlanmış iki tanesi tanımlanamamıştır (başarı oranı; %50). *E. faecalis* suşlarının hepsi doğru tanımlanmıştır (başarı oranı; %100). Genel olarak bakıldığında; gram negatif bakterilerde %90 oranında uyumlu sonuç çıkarken, gram pozitif bakterilerde %55 oranı saptanmıştır..

Tablo 2: Bakterilerin MALDI-TOF MS ile koloniden ve direkt kan kültür şişesinden identifikasyonunun karşılaştırılması (Jelli Tüp Metodu).

Bakteri adı		Direkt identifikasyon		Koloniden
		Tür	Tanımlanamayan	Tür
Gram negatifler	<i>Escherichia coli</i> (n=5)	4	1	5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=5)	5	0	5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=5)	4	1	5
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=3)	2	1	3
	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	1	1	2
Gram pozitifler	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5)	2	3	5
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=5)	2	3	5
	<i>Staphylococcus hominis</i> (n=4)	2	2	4
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=4)	1	3	4
	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=2)	2	0	2
TOPLAM		25	15	40

Tablo 3: Bakterilerin MALDI-TOF MS ile koloniden ve direkt kan kültür şişesinden identifikasyonunun karşılaştırılması (Ependorf Tüp Metodu).

Bakteri adı		Direkt identifikasyon		Koloniden
		Tür	Tanımlanamayan	Tür
Gram negatifler	<i>Escherichia coli</i> (n=5)	5	0	5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=5)	5	0	5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=5)	4	1	5
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=3)	3	0	3
	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	1	1	2
Gram pozitifler	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5)	3	2	5
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=5)	2	3	5
	<i>Staphylococcus hominis</i> (n=4)	2	2	4
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=4)	2	2	4
	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=2)	2	0	2
TOPLAM		29	11	40

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Morbidite ve mortalitesi oldukça yüksek olan kan dolaşımı enfeksiyonlarında, hızlı ve doğru antimikrobiyal tedavi hayati önem taşımaktadır. Bu sebeple pozitif kan kültürü şişelerinden direkt identifikasyon yönteminin optimize olması erken ampirik tedavide büyük rol oynamaktadır. Kan dolaşımı enfeksiyonlarında ilk 6 saat içinde antibiyotik tedavisine başlamak oldukça önemli olmakla birlikte bu süreye eklenen her bir saat hastanın yaşama olasılığını %7,6 oranında düşürmektedir (Kumar, Roberts, Wood, Light, Parrillo, Sharma, et al. 2006). Ayrıca ampirik tedavide geniş spektrumlu ilaçların kullanılması bakterinin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine sebep olmakla birlikte tedaviyi olumsuz etkilemektedir (Barlam, Cosgrove, Abbo, MacDougall, Schuetz, Septimus, et al. 2016). Kan kültüründen direkt identifikasyon yöntemleri, geliştirilip yüksek başarılı şekilde çalışır hale gelmesi ile patojen bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanmasının önüne geçilmesi ve hastaların yaşama devam etme olasılığının artırılmasında önemli bir yer edinecektir. Bu tez çalışmasında, simüle örnekler kullanılarak kütle spektrometri yöntemi ile pozitif sinyal alınan kan kültürü şişelerinden çeşitli ön hazırlıklar yapıldıktan sonra direkt bakteri identifikasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

Direkt identifikasyon yöntemlerinde esas hedeflenen kan kültürü şişesinden alınan belli bir miktardaki kan-besiyeri karışımı örneğinin içinde üreyen bakterileri kandan ayırmaktır. Bu amaçla çeşitli çalışmalarda; farklı yıkama yöntemleri, farklı santrifüj aşamaları, kimyasallar veya ticari kitler kullanılarak en iyi sonuçlar alınmaya çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında herhangi bir hazır kit kullanılmadan mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilecek bir yöntem kullanılmaya çalışıldı. Bu çalışmada, BacT/ALERT® otomatize kan kültür sisteminden pozitif sinyal veren 40

kan kültürü şişesi, kanlı agar ve EMB agara pasajlanarak 37°C etüvde 18-24 saat inkübe edildikten sonra besiyerinde üreyen kolonilerden ve pozitif kan kültürü şişesinden çeşitli ön hazırlıklar yapılarak direkt olarak MALDI-TOF MS ile okuma yaptırılarak sonuçlar karşılaştırıldı. *E. coli* suşlarında %80-100, *K. pneumoniae* suşlarında %100 *P.aeruginosa* suşlarında %80, *A. baumannii* suşlarında %66-100, *E. cloacae* suşlarında %50, *S. aureus* suşlarında %40-60, *S. epidermidis* suşlarında %40, *S. hominis* suşlarında %50, *S. haemolyticus* suşlarında %25-50, *E. faecalis* suşlarında %100 oranında direkt identifikasyon ile koloniden identifikasyon arasında uyumlu sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda jelli tüp metodunda gram negatif bakterilerde %80 oranında uyumlu sonuç görülürken; gram pozitif bakterilerde %45 oranında uyumlu sonuç görüldü. Ependorf tüp metodunda ise metodunda gram negatif bakterilerde %90 oranında uyumlu sonuç görülürken; gram pozitif bakterilerde %55 oranında uyumlu sonuç saptanmıştır.

Çalışmamızda direkt identifikasyon yöntemlerinin gram pozitif bakterilerde düşük başarı oranına sahip olduğu saptanmıştır. Gram negatif bakterilerde ise direkt identifikasyon yönteminde yüksek oranda başarı elde edilmiştir. Gram pozitif bakteri içeren pozitif kan kültürlerinden hazırlanan ve cihaza yüklenen pellette eritrositlerin yoğun olarak kalması başarı yüzdesini düşürmüştür. Farklı yöntemler denenerek özellikle gram pozitif bakterilerde kalan eritrositler uzaklaştırılmaya çalışılmış fakat başarılı okunamamıştır.

Azrad ve ark, (2019). jelli tüp yöntemiyle çalışmışlar santrifüj devir/süresi ve en önemlisi örnek hazırlandıktan sonra slayta yüklenen kısım bizim çalışmamızdan farklıdır. Bizim çalışmamızda, slayta pellet sürülürken Azrad ve ark'nın çalışmasında slayta süpernatant damlatılmıştır. Yine metodun optimize edilmesi aşamalarında yaptığımız çalışmalarda süpernatant cihaza yüklendiğinde okuma gerçekleşmemiştir. Bunun üzerine süpernatanttan hazırladığımız preparatı gram boyayıp incelediğimizde, bakterinin çok az olduğu görülmüştür. Cihazın okumama sebebi olarak süpernatantta bakteri kalmadığı tespit edildikten sonra slayta pellet sürme yöntemi denenmiş ve başarılı bulunmuştur.

Azrad ve ark, (2019). Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden 5 ml kanı jelli tüpe aktarıp 3000 rpm de 10 dk santrifüj etmişler. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatantı atıp jel üzerine 1 ml salin ekleyip tekrar 13000rpm de 2 dk santrifüj edip süpernatanttan

MALDI-TOF MS analizi için MALDI hedef plakasına (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) 1 µl süpernatant bırakıldı matrix ekleyip cihazda analiz etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada gram pozitif bakterilerde %6 oranında, gram negatif bakterilerde ise %5 oranında uyumlu sonuç yakalamışlardır. Bu çalışmanın metodunu denediğimizde çok düşük uyumlu sonuç almamız üzerine eklediğimiz etanol ve formik asit-asetonitril aşamaları çalışmanın başarı oranını yüksek oranda artırmıştır. Yine bu çalışmada uygulanan Sepsityper metodu ile yüksek oranda uyumlu sonuç yakalamışlardır. Fakat bizim amacımız hiçbir kit ve kimyasal kullanmadan yapılan çalışmalarda ki başarı oranını artırmak olduğu için direkt identifikasyon yöntemi üzerine çalışıp bu yöntemin verdiği doğru sonuçları olabildiğince artırmak olmuştur.

Shota ve ark, (2016). yaptıkları çalışmada üç farklı yöntemi karşılaştırmışlar ve direkt identifikasyonda başarı yakaladılar da, Sepsityper ve saponin yöntemlerinin başarı oranının sadece santrifüjleme ile kimyasal ve ticari kit kullanılmadan yapılan yöntemle göre önemli ölçüde yüksek oranda başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Santrifüjleme yönteminde; gram pozitiflerde %26, gram negatiflerde ise %75 uyumlu sonuç yakalamışlardır. Direkt identifikasyon için pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden 6 ml kanı jelli tüpe aktarıp 3000 rpm de 15 dk santrifüj etmişler. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatantı atıp jel üzerine 3 ml steril damıtılmış su ekleyip yeniden süspansiyon edildi, yavaşça karıştırıldı ve yeni bir tüpe aktarıldı. Tüp tekrar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek bakteri hücreleri peletlendi ve süpernatant atıldı. Etanol/formik asit eklenip tekrar santrifüj işlemleri yapıldıktan sonra süpernatanttan MALDI-TOF MS analizi için MALDI hedef plakasına 1 µl süpernatant bırakıldı matrix ekleyip cihazda analiz etmişlerdir. Gram negatiflerin direkt identifikasyonundaki oran ticari kitle yapılan identifikasyona oldukça yakinken gram pozitiflerde bu oranlar arasında yüksek fark bulmuşlardır. Gram pozitif bakterilerde bu araştırmacılar da nispeten daha düşük başarı elde etmişlerdir. Ayrıca kullandıkları üç yöntemde de *Klebsiella oxytoca*'nın iki suşu *Raoultella ornithinolytica* olarak tanımlanmıştır. Gram pozitiflerde bazı Stafilocokların tür düzeyinde yanlış tanımlandığı görülmüştür. Bu durumlar direkt identifikasyonun tek başına kullanılamayacağını göstermektedir.

Juiz ve ark, (2013). 60 gram pozitif izolatın sepsityper yöntemi ile %96,7'sini, santrifüjleme yöntemi ile %80'ini, 24 gram negatif izolatın ise sepsityper yöntemi ile % 95,8'ini, santrifüjleme yöntemi ile %95,8'ini doğru tanımlayabilmişlerdir.

Schubert ve ark. (2011). 341 gram pozitif izolatın sepsityper yöntemi ile %87,4'ünü, santrifüjleme yöntemi ile %56'sını, 98 gram negatif izolatın ise sepsityper yöntemi ile % 89,8'ini, santrifüjleme yöntemi ile %85,7'sini doğru tanımlayabilmişlerdir.

Loonen ve ark. (2012). 52 gram pozitif izolatın sepsityper yöntemi ile %65,4'ünü, santrifüjleme yöntemi ile %44,2'sini, 47 gram negatif izolatın ise sepsityper yöntemi ile % 95,7'sini, santrifüjleme yöntemi ile %91,5'ini doğru tanımlayabilmişlerdir.

Birbirinden bağımsız olarak çalışma yapan; Juiz ve ark., Schubert ve ark., Loonen ve ark.'nın çalışma sonuçlarında sepsityper kiti ile yapılan çalışmalarda santrifüjleme ile yapılan çalışmalardan daha yüksek uyumlu ve doğru sonuç bulunmuştur. Ayrıca saponin ile sepsityper yönteminden alınan sonuçlarında birbirine yakın olduğunu ortaya koymuşlardır. Saponin ile yapılan çalışmalarda en önemli avantaj sepsityper ile yapılan çalışmalardan 12-14 kat daha düşük maliyeti olmasıdır. Her iki yöntemde de çalışma süresi aynı bulunduğundan saponin kullanarak çalışmanın daha düşük maliyetli olması sepsityper çalışmasına alternatif olmasına yol açmıştır.

Direkt santrifüjleme ile yapılan yöntemde gram pozitiflerde görülen düşük tanımlamalar bu çalışmalar için en önemli endişe kaynağı olmuştur. Bunun nedeni kesin olmamakla birlikte akıllara birkaç unsuru getirmiştir. Gram pozitif bakterilerin kalın hücre duvarına sahip oldukları ve bu duvarın parçalanamaması sonucu MALDI-TOF MS için gerekli olandan daha az protein ekstraktı elde edilmesi ile sistem bakteriyi tanımlayamamaktadır. Bu nedenle özellikle gram pozitiflerde hücre duvarını hedef alan aşamalar yöntemlere eklenerek çalışmanın uyumlu sonuçlarının artırılabilceği düşünülmüştür. Yanlış yapılan tanımlamalar için ise bazı gram pozitif kokların protein yapılarının birbirine benzerlik göstermesi sebep olarak düşünülmektedir.

MALDI-TOF MS ile pozitif kan kültürlerinden yapılan direkt identifikasyon sonucunda gram negatif bakterilerde elde edilen %80-90 başarı ve farklı yöntemler denenmesine rağmen gram-pozitif bakterilerde elde edilen %45-55 başarı bu konuda özellikle gram pozitif bakteriler için geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

Kan kültüründen MALDI-TOF MS ile direkt identifikasyonun tedaviye çok önemli olumlu katkıları olacağı görülse de henüz rutin kan kültürü yönteminin yerini alması beklenmemektedir.



KAYNAKLAR

- Anhalt JP, Fenselau C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*, 47:219–225.
- Aydın M, Kaşıkçıoğlu C, Koşucu Nergis S, Timurkaynak F, Arslan H (2016). Kan Dolaşımı İnfeksiyonu Etkenleri ve Antibiyotik Direnç Oranları. , 83 - 86.
- Azrad M, Keness Y, Nitzan O. *et al.* (2019). Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect Dis* 19, 72
- Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, MacDougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, et al. (2016). Implementing an antibiotic stewardship program: guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect*. 62:51–77.
- Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P ve Vallet B. 2004. EPİSEPSİS: Fransız yoğun bakım ünitelerinde şiddetli sepsisin epidemiyolojisi ve sonuçlarının yeniden değerlendirilmesi. *Yoğun Bakım Med*. 30:580–588.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 26(3):547-603.
- Degand, N., E. Carbonnelle, B. Dauphin, J. L. Beretti. M. Le Bourgeois, Semet-Gaudelus, C. Segonds, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni.2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol*.46:3361-3367.
- Dieckmann R, R. Helmuth M. Erhard and B. Malorny 2008. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by

whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.*74:7767-7778.

Elssner T, Kostrzewa M, Maier T, Kruppa G. (2011). Microorganism identification based on MALDI-TOF-MS fingerprints. In: Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism. Elssner T, Kostrzewa M, Maier T, Kruppa G (Eds.), Springer, Dordrecht, pp.99-113.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013;32:699–704.).

Fenselau C, and P. A. Demirev 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*20:157-171.

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010 Jun;48(6):2110-5. doi: 10.1128/JCM.02215-09. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20392910; PMCID: PMC2884468.

Gülfem Ece (2013). Kan Kültüründe Üreyen İzolatların Dağılım ve Antibiyotik Duyarlılık Profilinin İncelenmesi.Haseki Tıp Bülteni

Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug*, 27(2):404-414.

Juiz P.M, Almela M, Melción C, Campo I, Esteban C, Pitart C, et al.

A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS

Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 31 (2012), pp. 1353-1358

Kan Dolaşımı Örnekleri, Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları İçin Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi. KLİMUD, 2017.

Karakoç AE. Güncel rehberler ışığında sepsis, klasik ve hızlı tanı yöntemleri, ulusal hemokültür rehberi. *ANKEM Derg* 2014;28(Ek 2):46-51.

Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. Clin Microbiol Infect 2013;19:513-20.

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med;34:1589–96.

Loonen A.J.M, Jansz A.R, Stalpers J, Wolffs P.F.G, van den Brule A.J.C. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 31 (2012), pp. 1575-1583

Nonnemann B, Bjarnsholt T. Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi ile doğrudan pozitif kan şişelerinden patojenik mikroorganizmaların tanımlanması. APMIS 2013;121:871–7.

Ntusi N, Aubin L, Oliver S, Whitelaw A, Mendelson M. Guideline for the optimal use of blood cultures. S Afr Med J 2010;100:839-43.

Öncül O. Hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 575-604.

Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. (2017). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Koneman Renkli Atlas ve Tanısal Mikrobiyoloji Kitabı. 7th ed, Ülger Toprak N, Kal Çakmaklıoğulları E, Yurttutan Uyar N, Güney M, Tunçkanat F, Kaşifoğlu N, Aydoğan H, Özen N, Hipokrat yayınevi, Ankara.

Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: Molecular diagnostics and biomarkers. Clin Microbiol Rev 2012;25(4):609-34.

Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, Kostrzewa Novel M, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-

TOF) mass spectrometry Journal of Molecular Diagnostics, 13 (6) (2011), pp. 701-706

Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol, 6:791.

Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. (2016). Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. Int J Infect Dis. Nov;52:37-42.

Yüce P, Demirdağ K, Kalkan A ve ark. Kan Kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2005;19:17-21.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Şeyda DURNA

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu:-

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2019-2023 Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı

2014-2018, Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

2011-2013, İstanbul Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

2007-2011, 75. Yıl Cumhuriyet Anadolu Sağlık Meslek Lisesi

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2013-2023, Laborant

IV- Mesleki Deneyimi

2013-2015, Marmara Üniversitesi Hastanesi Farmakoloji
Laboratuvarı/İSTANBUL

2015-2023, Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Mikrobiyoloji Laboratuvarı/SAKARYA

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

Makaleler

Ayhancı T, Durna Ş, Aydemir Ö, Koroğlu M, Altındış M. Klinik Örneklerden İzole Edilen Streptococcus Agalactiae Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları, J Biotechnol and Strategic Health Res. 2020;4(1):20-25

VII- Bilimsel Etkinlikleri

- I. Sakarya Hemovijilans Sempozyumu 6 Mart 2019, Sakarya.
- Deney Hayvanları Kullanma Sertifika Programı (Marmara Üniversitesi)

VIII- Diğer Bilgiler

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri