

Stafilokokların Pozitif Kan Kültür Şişelerinden MALDI-TOF MS Sistemi ile Direkt Olarak Tanımlanması

Identification of Staphylococci Directly from Positive Blood Culture Bottles by MALDI-TOF MS System

Abdullah KILIÇ, Mehmet BAYSALLAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
Gulhane Military Medical Academy, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 23.03.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.06.2014

ÖZET

Kan akımı enfeksiyonları tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Stafilokok türleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kan kültürlerinden en sık izole edilen mikroorganizmalardır. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) sistemi direkt olarak pozitif kan kültür şişelerinden bakteri tanımlamasına imkan sağlamaktadır. Bu çalışmada, Gram boyamada gram-pozitif kok gözlenen pozitif kan kültür şişelerinden direkt olarak stafilokokların tanımlanmasında MALDI-TOF MS sisteminin performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, Aralık 2013-Şubat 2014 tarihleri arasındaki üç aylık dönem içerisinde, Gram boyama ile gram-pozitif kok gözlenen, 69 hastaya ait 96 pozitif kan kültür şişesi değerlendirilmiştir. Rutin tanımlama işlemleri için konvansiyonel yöntemler ve BD Phoenix™ (Becton Dickinson, ABD) otomatize mikrobiyoloji sistemi kullanılmıştır. Suşlar ayrıca gerçek zamanlı Taqman PCR (qPCR) yöntemi ile de tanımlanmış ve elde edilen sonuçlar referans kabul edilmiştir. MALDI-TOF MS yönteminde tanımlama için MALDI Sepsityper™ Kit kullanılmış ve tüm ölçümler, Microflex LT cihazı ve FlexControl 3.0 yazılımı (Bruker Daltonics, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Gram-pozitif kok görülen 96 kan kültür şişesinden 90'ında her üç yöntem (qPCR, BD Phoenix, Bruker MALDI-TOF MS) ile de stafilokoklar cins düzeyinde doğru olarak tanımlanmış; Phoenix ve MALDI-TOF ile diğer altı örneğin dördü *Enterococcus faecium*, ikisi *Streptococcus pyogenes* olarak sonuç vermiştir. Referans yöntem olarak alınan qPCR ile 87 örnek tür düzeyinde (15 *S.aureus*, 33 *S.epidermidis*, 29 *S.hominis*, 10 *S.haemolyticus*), üç örnek ise cins düzeyinde tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS ile qPCR sonuçları arasında üç izolatta uyumsuzluk görülmüş; qPCR ile *S.hominis* olarak tanımlanan üç izolattan ikisi MALDI-TOF MS ile *S.haemolyticus* olarak, biri ise *S.epidermidis* olarak tanımlanmıştır. Taqman PCR ile karşılaştırıldığında Bruker MALDI TOF MS sisteminin *S. aureus*'u %100 cins ve tür düzeyinde, koagülaz-negatif stafilokokları (KNS) ise %100 cins ve %96.6 tür düzeyinde tanımladığı tespit edilmiştir. Sonuç

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Abdullah Kılıç, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Etlik, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 304 3412, E-posta (E-mail): abkilic@gata.edu.tr

olarak, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan rutin yöntemler ile karşılaştırıldığında, Bruker MALDI-TOF MS sisteminin direkt kan kültür şişelerinden *S.aureus* ve KNS'leri hızlı ve etkin olarak tanımlama imkanı sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kan kültürü; stafilokok türleri; tanımlama; Bruker MALDI-TOF MS®; BD Phoenix™

ABSTRACT

Bloodstream infections are substantial causes of morbidity and mortality worldwide. Staphylococcus species are the most commonly isolated microorganisms from blood cultures in clinical microbiology laboratories. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) system allows the identification of microorganisms directly from positive blood culture bottles. The aim of this study was to evaluate the MALDI-TOF MS system for the identification of staphylococci directly from the positive blood culture bottles which revealed the presence of gram-positive cocci by staining. A total of 96 positive blood culture bottles that yielded gram-positive cocci by Gram stain were evaluated. These blood cultures were obtained from 69 patients between December 2013-February 2014. Conventional methods and BD Phoenix™ automated bacterial identification system (Becton Dickinson, USA) were used for routine identification. The strains were also identified by real-time Taqman PCR (qPCR) which was considered as the reference method. In MALDI-TOF MS method, MALDI Sepsityper™ Kit was used for the bacterial identification and all measurements were carried out by using Microflex LT instrument and FlexControl 3.0 software (Bruker Daltonics, USA). Of 96 culture bottles positive for gram-positive cocci, 90 were correctly identified as staphylococci at genus level with all the three study methods (qPCR, BD Phoenix, Bruker MALDI-TOF MS). The other six samples were identified as *Enterococcus faecium* (n= 4) and *Streptococcus pyogenes* (n= 2) by both Phoenix and the MALDI-TOF systems. Of the 90 samples, 87 were identified at the species level (15 *S.aureus*, 33 *S.epidermidis*, 29 *S.hominis*, 10 *S.haemolyticus*) and three at the genus level by the reference qPCR method. When comparing the results obtained by qPCR and Bruker MALDI-TOF MS, incompatibility was detected for three isolates. Those isolates were identified as *S.hominis* by qPCR, however two of them were identified as *S.haemolyticus* and one as *S.epidermidis* by MALDI-TOF MS. Compared with real-time Taqman PCR it was detected that Bruker MALDI TOF MS was identified 100% of *S.aureus* to the genus and species level and 100% and 96.6% of coagulase-negative staphylococci (CNS) to the genus and species level, respectively. In conclusion, it was thought that Bruker MALDI TOF MS system may allow rapid and reliable identification of *S.aureus* and CNS directly from positive blood culture bottles compared with the routine methods used in the clinical microbiology laboratory.

Key words: Blood culture; staphylococcus species; identification; Bruker MALDI-TOF MS®; BD Phoenix™

GİRİŞ

Kan akımı enfeksiyonları (KAE), hastanede yatan hastalarda önemli morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Stafilokok türleri klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kan kültürü örneklerinden en sık olarak izole edilen mikroorganizmalardır¹. Stafilokok türleri arasında *Staphylococcus aureus*, hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlar oluşturması ve virülansının yüksek olması nedeniyle önem kazanırken, koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) da KAE'den sıklıkla izole edilmektedir^{2,3}.

Septik şok aşamasının ilk altı saati içerisinde antibiyotik tedavisinin gecikmesi, hastanın yaşama oranını her saat için %7.6 oranında düşürmektedir⁴. Etkili antibiyotik tedavi seçimi ve uygun hasta yönetimi için enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların hızlı

ve uygun yöntemlerle tespit edilmesi önemlidir. Böylece hastanın hastanede yatış süresi azalacak ve buna bağlı olarak da hasta maliyetleri önemli oranda düşecektir⁵.

Kan akımı enfeksiyonlarının tanısında, çoğu laboratuvarlar geleneksel yöntemleri kullanmaktadır. Bu yöntemlerde, hastanın kan örneği önce kan kültür şişelerine alınarak inkübe edilmekte, bakteriyel üreme tespit edildikten sonra 18 ile 48 saat süren tür düzeyinde tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testi işlemleri yapılmaktadır. Zor üreyen mikroorganizmalar için bu süre uzayabilmektedir⁶. KAE'ye neden olan mikroorganizmaların tanımlanma zamanını kısaltmak için gerçek zamanlı Taqman PCR, multipleks PCR, floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve peptid nükleik asit FISH yöntemleri geliştirilmiş ve halen kullanılmaktadır. Ancak pahalı olması, uzman personel gerektirmesi ve sadece hedef alınan mikroorganizmaları tanımlayabilmesi, dezavantajları arasında sayılmaktadır⁷.

Son zamanlarda yeni bir yöntem olarak, MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry), bakterilerin tanımlanmasında tüm dünyada rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanmıştır. MALDI-TOF MS geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında hızlı, güvenilir ve az maliyetli bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem ile plaklarda üremiş olan kolonilerden tanımlama yapılabilirken, direkt olarak pozitif kan kültür şişelerinden de tanımlama yapılabilmektedir⁸. Bu çalışmada, Gram boyamada gram-pozitif kok gözlenen pozitif kan kültür şişelerinden direkt olarak yapılan işlemlerle, MALDI Sepsityper™ (Bruker Daltonics, ABD) kitinin stafilokokların tanımlanmasındaki performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Konvansiyonel yöntemlerle bakterilerin tanımlanması

Bu çalışma, 1200 yatak kapasitesine sahip eğitim hastanemizin, yaklaşık 6000/yıl kan kültür şişesinin işleme alındığı mikrobiyoloji laboratuvarında, Aralık 2013-Şubat 2014 tarihleri arasındaki üç aylık dönem içerisinde gerçekleştirildi. Çalışma esnasında KAE şüpheli hastalardan alınan kan örnekleri BACTEC Plus Aerobic/F kan kültür şişelerine [Becton Dickinson (BD) Diagnostic Instrument Systems, Sparks, ABD] inoküle edildi ve BACTEC 9240 sisteminde (BD, ABD) 5 gün inkübe edildi. Cihaz pozitif sinyal verdikten sonra kan kültür şişelerinden %5 koyun kanlı agar, çikolata agar ve EMB (Eosin Methylene Blue) agara pasajlar yapıldı. Plaklar 35°C'de, aerobik ve %5 CO₂'li ortamlarda 24-48 saat inkübe edildi. Üreyen mikroorganizmalar öncelikle koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz testi ve koagülaz testi ile tanımlandı. Sonrasında BD Phoenix otomatize sistemi (BD, ABD) ile ileri tanımlama işlemi yapıldı⁹.

MALDI Sepsityper™ Kit ile bakterilerin tanımlanması

Gram boyama ile gram-pozitif kok gözlenen pozitif kan kültür şişelerinden 1 ml ependorf tüpe alındı. Üzerine 200 µl lizis solüsyonu (Bruker Daltonics, ABD) ilave edildi ve tüpler 10 saniye vortekslendikten sonra 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pipetle alındı ve pellete 1 ml yıkama solüsyonu (Bruker Daltonics, ABD) ekle-

nerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yine atıldıktan sonra pellet 300 µl deiyonize su ile süspansiyon edildi ve süspansiyona 900 µl etanol ilave edildi. Örnek sonra Bruker standart ekstraksiyon işlemine (etanol/formik asit) tabi tutuldu. Bu işlemde örnek 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Etanolün tam olarak uzaklaştırılması için tekrar 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve süpernatant kısım atıldı. Pellet oda ısısında birkaç dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellete eşit hacimde %70 formik asit (2-50 µl arasında) ve %100 asetronitril karışımı (2-50 µl arasında) ilave edildi. Maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildikten sonra 1 µl süpernatant MALDI plaklarına koyuldu. Burada kuruduktan sonra örneğe 1 µl-siyano-4-hidroksisinamik sit (HCCA) matris solüsyonu (Bruker Daltonics, ABD) ilave edildi ve oda ısısında kuruması beklendi. Kuruduktan sonra Microflex LT MALDI-TOF MS cihazı ile analiz işlemi yapıldı¹⁰.

MALDI-TOF MS sistemi

Çalışmada tüm MALDI-TOF MS ölçümleri, Bruker Microflex LT model FlexControl 3.0 yazılımı (Bruker Daltonics, ABD) kullanılarak yapıldı. Sistemle çalışırken, lineer pozitif iyon modunda, 2000-20.000 Da kütle aralığında, mikroorganizma tanımlama için optimize edilmiş uygun metod ile ölçümler gerçekleştirildi. İyon kaynağı olarak 340 nm'de, 60 Hz'lik nitrojen lazer kullanıldı. Spektrumların elde edilmesi için her bir numunenin ölçümünde, toplamda 240 olacak şekilde 40'arlık paketlerden oluşan lazer atışları gerçekleştirildi. Sistem ölçüm sonuçlarına göre 0-3 arasında skor değeri vermekte olup, üretici firma (Bruker), pozitif kan kültür şişeleri ile yapılan tanımlama çalışmalarında cins ve tür düzeyinde tanımlamada kabul edilebilir skor sınır değerini ≥ 1.8 olarak tavsiye etmektedir¹¹.

Gerçek zamanlı Taqman PCR (qPCR) ile bakterilerin tanımlanması

Stafilokok türleri direkt olarak kan kültür şişelerinden, TaqMan teknolojisi kullanılarak Kılıç ve arkadaşlarının¹² uyguladığı prosedüre uygun olarak tespit edildi. Tanımlamada, stafilokok cinsi için *tuf*, *S.aureus* için *nuc*, *S.epidermidis* için *atlE*, *S.hominis* için *gap*, *S.haemolyticus* için *mvaA* genleri özgül hedef bölge olarak kullanıldı. Çalışmada 7500 ABI Prism Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, ABD) cihazı kullanıldı. Taqman PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlar referans olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, Aralık 2013-Şubat 2014 tarihleri arasında 643 hastadan toplanan 917 kan kültür şişesi işleme alınmış ve 105 hastaya ait 137 kan kültür şişesinde pozitiflik saptanmıştır. Bu hastaların 69'undan alınan 96 kan kültür şişesinden yapılan Gram boyamada gram-pozitif koklar görülmüş; bunların da 90'ında stafilokok türleri, 6'sında diğer gram-pozitif koklar tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan her üç yöntem ile 90 stafilokok türü cins düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır. Taqman PCR ile 87 örnek tür düzeyinde (15 *S.aureus*, 33 *S.epidermidis*, 29 *S.hominis* ve 10 *S.haemolyticus*), üç örnek cins düzeyinde tanımlanmış, 6 örnek stafilokok türleri için negatif bulunmuştur. Taqman PCR ile negatif olan örnekler, hem BD Phoenix hem de Bruker MALDI-TOF sistemi ile 4'ü *Enterococcus faecium*, 2'si *Streptococcus pyogenes*

Tablo I. Kan Kültüründen İzole Edilen Mikroorganizmaların BD Phoenix ve Bruker MALDI-TOF Sonuçlarının, Referans Yöntem Kabul Edilen Taqman PCR Sonuçları ile Karşılaştırmalı Değerlendirmesi

Suşlar	qPCR*	Tanımlanan izolat sayısı			
		Cins düzeyinde		Tür düzeyinde	
		BD Phoenix	MALDI-TOF	BD Phoenix	MALDI-TOF
<i>S.aureus</i>	15	15	15	15	15
<i>S.epidermidis</i>	33	33	33	29 ^a	33
<i>S.hominis</i>	29	29	29	22 ^b	26 ^c
<i>S.haemolyticus</i>	10	10	10	10	10
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	3	3	3	3
Toplam	90	90	90	79	87

* Referans yöntem olarak kabul edilmiştir; ^a BD Phoenix ile 2'si *S.haemolyticus*, diğer ikisi *S.hominis* ve *S.aureus* olarak tanımlanmıştır; ^b BD Phoenix ile 4'ü *S.epidermidis*, 3'ü *S.haemolyticus* olarak tanımlanmıştır; ^c Bruker MALDI-TOF MS ile 2'si *S.haemolyticus*, 1'i *S.epidermidis* olarak tanımlanmıştır.

nes olarak sonuç vermiştir. Referans yöntem olan Taqman PCR ile karşılaştırıldığında, BD Phoenix ve Bruker MALDI-TOF MS sistemlerinin, stafilokokların tümünü cins düzeyinde tanımladığı (%100), BD Phoenix'in 79 (%87.7), Bruker MALDI-TOF MS'in 87 (%96.6) izolatu tür düzeyinde doğru tanımladığı görülmüştür (Tablo I). Bruker MALDI-TOF ile tanımlanan tüm mikroorganizmaların skorları 1.8'in üzerindedir.

Taqman PCR ile MALDI-TOF MS sonuçları arasında 3 izolatta uyumsuzluk görülmüş; qPCR ile *S.hominis* olarak tanımlanan 3 izolattan 2'si MALDI-TOF MS ile *S.haemolyticus* olarak, bir izolat ise *S.epidermidis* olarak tanımlanmıştır. Taqman PCR ile BD Phoenix değerlendirildiğinde, 11 izolatta uyumsuzluk olduğu izlenmiş; qPCR ile *S.hominis* olarak tanımlanan 7 izolatu 4'ü BD Phoenix ile *S.epidermidis*, 3'ü *S.haemolyticus* olarak sonuç vermiştir. *S.epidermidis* olarak tanımlanan 4 izolatu 2'si *S.haemolyticus*, diğer 2'si *S.hominis* ve *S.aureus* olarak tanımlanmıştır (Tablo I).

TARTIŞMA

KAE'ler yıllık toplamda 1.8 milyon epizod ve 250.000 ölüm ile Avrupa ve Kuzey Amerika'da mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerindendir¹³. Gram-pozitif mikroorganizmalar KAE'nin yarısından sorumlu tutulmaktadır. *S.aureus* ve KNS'ler gram-pozitif koklar arasında en sık olarak izole edilen mikroorganizmalardır¹³. Tedavinin uygun yönlendirilmesi için *S.aureus* ile ilişkili KAE ile diğer stafilokok türlerinin neden olduğu kontaminasyonların birbirinden ayrılması ve stafilokok izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması önemlidir³. KAE'ye neden olan mikroorganizmaların hızlı ve doğru tanımlanmasının, uygun antibiyotik kullanımını sağladığı, hasta ölüm oranını ve hasta yatış günü sayısını düşürdüğü ve böylece hasta maliyetini azalttığı birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır^{14,15}. Gram boyama çoğu laboratuvar tarafından ampirik tedavinin yönlendirilmesi için kullanılmakta ve hasta prognozuna önemli katkı sağlamaktadır¹⁶. Birçok laboratuvar da tanımlama için otomatize mikrobiyolojik sistemler kullanılmaktadır.

Bu sistemler ile pozitif kan kültür şişelerinden uygun besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra üreyen mikroorganizmalar 18 ile 48 saat sonunda tür düzeyinde tanımlanabilmektedir⁶.

Günümüzde MALDI-TOF MS sistemi, mikroorganizmaların direkt ve hızlı tanımlanmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından kullanılmaya başlanan bir yöntemdir. Bu sistemin kullanılmasıyla, kültürde üremiş mikroorganizmalar birkaç dakika içerisinde tanımlanırken, pozitif kan kültür şişelerinden 30-35 dakika içinde tanımlama işlemi yapılabilmektedir¹⁶. Son yıllarda özellikle Bruker MALDI-TOF MS sistemi kullanarak, pozitif kan kültür şişelerinden mikroorganizma tanımlanmasını optimize etmek için birçok çalışma yapılmıştır¹⁷⁻²⁴. Schubert ve arkadaşları¹⁷ üç aylık süre içerisinde, Bactec 9240 sisteminde pozitif olan 500 kan kültür şişesini Bruker MALDI-TOF MS ile değerlendirmişler ve 379'u gram-pozitif olan bakterilerin %86.3 oranında tür düzeyinde tanımlandığını; bu oranın stafilokoklar için %89.4 olduğunu bildirmişlerdir. Juiz ve arkadaşları¹⁸ 53'ü gram-pozitif kok olan 85 pozitif kan kültür şişesini değerlendirmişler ve testin *S.aureus*'u cins ve tür düzeyinde sırasıyla %100 ve %83 oranında, KNS'leri ise cins ve tür düzeyinde sırasıyla %100 ve %85 oranında doğru tespit ettiğini bulmuşlardır. Saffert ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında, 180 pozitif kan kültür şişesi MALDI-TOF ile değerlendirilmiş; *S.aureus*'un %93.7 oranında hem cins hem de tür düzeyinde, KNS'lerin ise %70.8 cins, %62 tür düzeyinde tanımlandığı tespit edilmiştir. Benzer olarak 507 pozitif kan kültür şişesinin değerlendirildiği bir çalışmada⁶, MALDI-TOF MS ile *S.aureus*'un cins ve tür düzeyinde tanımlanma oranları sırasıyla %90 ve %87, KNS'lerin ise sırasıyla %64 ve %34 olarak saptanmış; 167 pozitif kan kültür şişesinin değerlendirildiği bir başka çalışmada²⁰ da Bruker MALDI-TOF MS sisteminin *S.aureus*'u %81.1, KNS'leri ise %74.4 oranında tanımlayabildiği bildirilmiştir. Kroumova ve arkadaşları²¹ 79 pozitif kan kültür şişesinden direkt mikroorganizma tanımlama işlemi yapmışlar ve MALDI-TOF MS ile tüm stafilokokların doğru tanımlandığını rapor etmişlerdir. Jamal ve arkadaşlarının¹⁶ çalışmasında, MALDI-TOF MS ile 160 hastadan alınan ve pozitif sinyal veren kan kültür şişeleri değerlendirilmiş ve *S.aureus*'un %100, KNS'lerin ise %68.3 oranında tanımlandığı tespit edilmiştir. Loonen ve arkadaşlarının²² 101, Prod'hom ve arkadaşlarının²³ 78 ve Ferroni ve arkadaşlarının²⁴ 320 pozitif kan kültür şişesini MALDI-TOF MS sistemiyle değerlendirdikleri çalışmalarında; *S.aureus*'un sırasıyla %85, %100 ve %100, KNS'lerin ise sırasıyla %70, %82.6 ve %95.8 oranında tür düzeyinde doğru olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Dolayısıyla, çeşitli merkezlerde yapılan Bruker MALDI-TOF MS sisteminin performansının değerlendirildiği çalışmalar dikkate alındığında; *S.aureus*'un %90-100 arasında cins düzeyinde, %81-100 arasında tür düzeyinde, KNS'lerin ise %64-100 oranında cins düzeyinde, %34-100 arasında tür düzeyinde tanımlandığı görülmektedir.

Bizim çalışmamızda, gerçek zamanlı Taqman PCR yöntemi referans kabul edilerek, Bruker MALDI-TOF MS sistemi 96 pozitif kan kültür şişesi üzerinden değerlendirildiğinde, *S.aureus*'un %100 cins ve tür düzeyinde, KNS'lerin ise %100 cins ve %96.6 tür düzeyinde tanımlandığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız, önceki bazı çalışmalar^{18,21,23,24} ile uyumlu olarak bulunmuş; ancak diğer bazı çalışmalardan^{6,16,19,20,22} elde edilen tanımlama oranlarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar arasındaki farkların,

Bruker MALDI-TOF MS öncesi kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin farklı olmasından, tanımlama skorlarının yüksek tutulmasından²⁵ ve kullanılan kan kültür şişelerinin bir kısmının tanımlamayı negatif yönde etkileyen kömür içermesinden²⁶ kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Gram-pozitif hücre duvarı lizise dirençli olduğu için uygun ekstraksiyon protokollerinin seçilmesi önemlidir²³. Kullandığımız ekstraksiyon yönteminin standardize edilmiş olması ve kan kültür şişelerinde kömür bulunmaması, bu çalışmadaki tanımlama oranlarının yüksek çıkmasında etken faktörler olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, klinisyenler için KAE'ye sıklıkla neden olan *S.aureus* ve KNS'lerin tanımlanması ve muhtemel deri kontaminasyonundan dolayı ayrımlarının yapılması, antibiyogram sonucu çıkana kadar uygun ampirik tedavi seçeneği için önemlidir. Çalışmada kullanılan Bruker MALDI-TOF MS sistemi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan rutin yöntemlerle karşılaştırıldığında, pozitif kan kültür şişelerinden *S.aureus* ve KNS'leri çok daha hızlı ve etkili bir biçimde tanımlamakta ve birbirlerinden ayırabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Foster AG. Rapid identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. J Clin Microbiol 2013; 51(11): 3717-9.
2. Gröbner S, Kempf VA. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by real-time PCR directly from positive blood culture bottles. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26(10): 751-4.
3. Mirrett S, Weinstein MP, Reimer LG, Wilson ML, Reller LB. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3279-81.
4. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 2006; 34(6): 1589-96.
5. Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3119-25.
6. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. PLoS One 2011; 6(8): e23285.
7. Calderaro A, Martinelli M, Motta F, et al. Comparison of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assays with culture-based matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts from blood cultures and cerebrospinal fluid cultures. Clin Microbiol Infect 2013 Dec 4. [Epub ahead of print]
8. Schmidt V, Jarosch A, März P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(3): 311-7.
9. Kilic A, Guclu AU, Senses Z, Bedir O, Aydogan H, Basustaoglu AC. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and Pantone-Valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 94(4): 607-14.
10. 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.
11. Meex C, Neuville F, Descy J, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. J Med Microbiol 2012; 61(Pt 11): 1511-6.

12. Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. *Res Microbiol* 2011; 162(10): 1060-6.
13. Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(6): 501-9.
14. Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One* 2012; 7(3): e32589.
15. Clerc O, Prod'homme G, Senn L, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(4): 355-60.
16. Jamal W, Saleem R, Rotimi VO. Rapid identification of pathogens directly from blood culture bottles by Bruker matrix-assisted laser desorption laser ionization-time of flight mass spectrometry versus routine methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76(4): 404-8.
17. 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.
18. Juiz PM, Almela M, Melción 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* 2012; 31(7): 1353-8.
19. 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.
20. Wüppenhorst N, Consoir C, Lörch D, Schneider C. Direct identification of bacteria from charcoal-containing blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(10): 2843-50.
21. Kroumova V, Gobbato E, Basso E, Mucedola L, Giani T, Fortina G. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011; 25(15): 2247-9.
22. Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. 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* 2012; 31(7): 1575-83.
23. Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1481-3.
24. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, 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.
25. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(11): 1631-8.
26. Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT™ (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2): 192-5.