

İdrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile direkt bakteri tanımlanması

Definition of direct bacteria by MALDI-TOF MS system from urinary examples

Ayşe Nuriye VARİŞLİ¹, Gülşen ÇETİN-HAZIROLAN², Altan AKSOY², Neriman AKSU-KOCA²

ÖZET

Amaç: Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE)'de etken bakterinin erken saptanması; uygun antibiyotik tedavisine kısa sürede başlanması ve maliyet açısından oldukça önemlidir. ÜSE'nin tanısında idrar kültürü altın standarttır. Kültür ve antibiyotik duyarlılık testi 48-72 saat sürmektedir. Matrisli aralı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile kültürde üretilen bakteriler birkaç dakika içinde tanımlanırken, direkt klinik örnekten tanımlama genellikle iki saat gibi kısa bir zaman içinde yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, idrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile bakterinin direkt olarak tanımlanması ve tedaviye olabildiğince erken başlanmasına katkı sağlamasıdır.

Yöntem: Hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarına 01 Temmuz - 30 Kasım 2015 tarihleri arasında ÜSE şikayetiyle gönderilen 152 idrar örneği çalışmaya alınmıştır. Rastgele seçilen örneklerin bir kısmına deneysel olarak Gram boyama yapılırken bir kısmına yapılmamıştır. Direkt idrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile bakteri tanımlanması için örneklere formik asit ekstraksiyon metodu uygulanmıştır. Bu örneklere eş zamanlı olarak idrar kültürü de yapılmıştır. 37 °C'de aerobik ve %5 CO₂'li ortamda 18-24 saatlik inkübasyondan sonra anlamlı üreme saptanan plaklardaki kolonilerin

ABSTRACT

Objective: Rapid identification of bacterial pathogens from urine specimens are essential to establish an adequate antibiotic therapy to treat urinary tract infections and it is very important in terms of cost. Urine culture is gold standard in the diagnosis of UTI (Urinary Tract Infection). Urine culture and antibiogram usually takes 48-72 h. The bacteria produced in culture identified within a few minutes while the clinical samples are identified in a short time like two hours by Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The aim of this study is to contribute identification of the direct bacteria by MALDI-TOF MS system and to start early effective treatment of urine specimens.

Methods: We analyzed 152 urine samples with UTI complaints were submitted to the microbiology laboratory between July to November 2015. While some of the samples were experimentally Gram stained, some were not. Formal acid extraction method was applied to urine specimens for direct bacterial identification with MALDI-TOF MS system. In this example, the urine culture was also performed simultaneously. Identification of the colonies in plaque, which was incubated in media at 37 °C in

¹Kırıkkale Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği, Yüksek İhtisas Hastanesi, Kırıkkale
²Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Ayşe Nuriye VARİŞLİ

Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi, Merkez Lab. Mikrobiyoloji Bölümü, 71000 Kırıkkale - Türkiye
Tel : +90 507 766 96 98 E-posta / E-mail : aysenurvarisli@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 11.04.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.02.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.87598

Varışlı AN, Çetin-Hazirolan G, Aksoy A, Aksu-Koca N. İdrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile direkt bakteri tanımlanması.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(2): 101-108

tanımlanması MALDI-TOF MS sistemi ile yapılmıştır.

Bulgular: İdrar örneklerinden direkt bakteri tanımlanmasında, MALDI-TOF MS sisteminin duyarlılığı %76 olarak bulunmuştur. MALDI-TOF MS sistemi ile ekstraksiyon öncesinde bakteriyel yükü belirlemede, Gram boyama yapılmasının test sonuçlarına etkisinin belirlenmesi amacıyla istatistiksel analiz yapılmıştır. Buna göre Gram boyama uygulamasının MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansını üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Kültürde 105 tek çeşit bakteri üremesi olan örneklerde, direkt örnekten MALDI-TOF MS ile ve idrar kültüründen MALDI-TOF MS ile tanımlanan bakterilere bakıldığında; *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium striatum*'da tanımlama oranı yüksek bulunurken, streptokoklar ve nonfermenter Gram negatif bakterilerde tanımlama yapılamamıştır. Deneysel olarak MALDI-TOF MS'in düşük bakteriyel konsantrasyonlardaki güvenli tanımlama düzeyini belirlemek amacıyla; *E. coli* ve *E. faecalis* suşlarının 1×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 , $1,2 \times 10^5$, 6×10^4 ve 3×10^4 kob/mL dilüsyonları yapılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. *E. coli* suşu, 1×10^6 , 5×10^5 ve $2,5 \times 10^5$ kob/mL dilüsyonlarında, *E. faecalis* ise sadece 1×10^6 kob/mL dilüsyonda yüksek düzey güven aralığında bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışmada, MALDI-TOF MS yönteminin duyarlılığı 10^5 ve/veya 10^6 kob/mL tek çeşit Gram negatif bakteriyüri olan örneklerde yüksek (%76) bulunurken, karışık veya 10^3 kob/mL ve altında bakteriyüri veya candidüri olan örneklerde tanımlama yapılamamıştır. Ek olarak MALDI-TOF MS yöntemiyle idrar örneğinden direkt bakteri tanımlanması öncesinde Gram boyama uygulamasının etkinliği araştırılmış ve Gram boyamanın MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansına katkı sağladığı ve bu nedenle çalışmaya alınan örnekler Gram boyama yapılması gerektiği düşünülmüştür. Bu yöntem, idrar kültüründe 10^5 kob/mL tek bakteri üremesi olan hastalarda, klasik kültür yöntemine göre daha hızlı sonuç verebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: idrar örnekleri, MALDI-TOF MS, idrar kültürü, tanımlama

aerobic and 5% CO₂ for 18-24 hours of incubation, were performed with the MALDI-TOF MS system.

Results: The sensitivity of direct sample from MALDI-TOF MS system was found to be 76%. Statistical analysis was performed to determine whether the Gram stain had any effect on the bacterial load and consequently on the identification of the MALDI-TOF MS system. According to this, there was a significant difference between Gram staining group and non - Gram staining group ($p < 0.001$). Higher identification rates were found in *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium striatum* (except streptococci and nonfermenter Gram negative bacteria), 10^5 cfu/mL single culture, MALDI-TOF MS directly from urine culture and MALDI-TOF MS from urine culture. Experimentally, in order to determine the safe identification by MALDI-TOF MS low bacterial concentrations; The *E. coli* and *E. faecalis* strains were identified by MALDI-TOF MS with 1×10^6 , 5×10^5 , 2.5×10^5 , 1.2×10^5 , 6×10^4 and 3×10^4 cfu/mL dilutions. A minimum of 1×10^6 , 5×10^5 and 2×10^5 cfu/mL were identified to reliable scores for *E. coli* strains, while *E. faecalis* was defined at 1×10^6 cfu/mL dilution only.

Conclusion: In this study, MALDI-TOF MS method the sensitivity 10^5 and / or 10^6 cfu/mL higher in the single kind of sample the Gram-mixed or 10^3 cfu/mL or less from the sample with bacteriuria and yeast identification was not possible. It was thought that Gram stain application determined the bacterial load before identification of direct urine specimen with MALDI-TOF MS system and contributed to the diagnostic performance of MALDI-TOF MS system and Gram stainings should be done for the samples taken for this reason. This method is faster in urine culture with 10^5 cfu/mL bacterial growth than conventional culture method.

Key Words: urine samples, MALDI-TOF MS, urine culture, identification

GİRİŞ

Erişkin kadın ve erkeklerde bakteriyel enfeksiyonların en sık sebebi görülme sebebi üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) olup, tüm yaş gruplarında görülebilmektedir. Dünya genelinde yılda yaklaşık 150 milyon ÜSE olgusu gelişmekte olup, bunun tedavi maliyetinin 150 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (1). ÜSE'li hastaların tanısı; idrarda dipstik testi, boyalı-boyasız mikroskopik inceleme ve kültür ile konmaktadır. İdrar kültürü tanıda altın standart olmasına rağmen mikrobiyolojik tanımlama genellikle 24-48 saat sürmektedir. Bu zaman zarfında hastalara bazen gereksiz yere veya yetersiz dozlarda ampirik antimikrobiyal tedavi başlanmaktadır (2,3). Yöntem; kültürde izole edilebilen mikroorganizmaların proteomiklerini saptayarak hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlama sağlamaktadır (4). Bu çalışmanın amacı, idrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile direkt bakterinin kısa sürede tanımlanarak etkin tedavinin erken başlanmasına katkı sağlamak için yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına 01 Temmuz - 30 Kasım 2015 tarihleri arasında üriner sistem enfeksiyonu şikayetiyle poliklinik ve servis hastalarından gelen 10 mL'lik idrar örneklerinden beş mL'si MALDI-TOF MS sistemiyle çalışılmak üzere ayrılmıştır. Kalan beş mL idrar örneği ise 2000 rpm'de beş dk. santrifüjlenmiş ve mikroskopisinde piyüri görülen idrar örnekleri çalışmaya alınmıştır.

Bu örnekler; bulanık, berrak, kanlı veya pıhtılı olup olmamasına veya gönderilen bölüme bakılmaksızın rastgele seçilmiş ve iki gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki 100 idrar örneğine Gram boyama yapılmazken, ikinci gruptaki örneklerin 52'sinin Gram boyasında tek tip morfolojide bakteri gözlenmiştir. İdrar örneklerinden direkt MALDI-TOF MS sistemi ile bakteri tanımlanması için bu 152 idrar örneğine formik asit ekstraksiyon metodu uygulanmış ve eş zamanlı olarak idrar kültürü de yapılmıştır. Bu amaçla; idrar örnekleri koyun kanlı ve EMB agar besiyerlerine 10 µL hacimlerde ekilmiştir. 37°C'de aerobik ve %5 CO₂'li ortamda 18-24

saatlik inkübasyondan sonra anlamlı üreme saptanan plaklardaki kolonilerin tanımlanması için önce makroskopik morfolojileri değerlendirilmiş daha sonra koloniler MALDI-TOF MS sistemi ile çalışılmıştır.

İdrar örneklerinden MALDI-TOF MS formik asit ekstraksiyon metodu ile direkt bakteri tanımlanması: Her hasta için beş mL idrar örneği, lökositleri uzaklaştırmak için 2.000 rpm'de jelli biyokimya tüpünde bir dk. süreyle santrifüj edilmiş, üst kısım atılarak, jelde biriken çökelti BD Phoenix (USA) ID Broth sıvısı ile iki-üç mL çoğaltılarak çok yavaş vortekslenmiştir. Küçük santrifüj tüplerine alınarak 13.500 xg'de beş dk santrifüj edilmiş, üst kısım atılarak dipteki çökelti kısım aspire edilmiştir. Elde edilen çökelti, 300 µL deiyonize su ve 900 µL absolut etanol ile 13.500 xg'de beş dk yıkanmış, pellet kurutulduktan sonra, 50 µL %70 formik asit ve 50 µL %100 asetonitril eklenerek, bir dk süreyle bakteri hücre bileşenlerinin ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon ürünleri 13.500 xg'de beş dk santrifüj edilerek üst kısım, MALDI-TOF MS ile bakteriyel tanımlama yapılmak üzere MALDI plateyine uygulanmıştır.

MALDI-TOF MS ile direkt idrar örneğinden bakteri tespitinde bakteriyel konsantrasyonun deneysel olarak belirlenmesi: MALDI-TOF MS'nin en düşük bakteriyel konsantrasyondaki güvenli tanımlama düzeyini belirlemek amacıyla; *E. coli* ve *E. faecalis* suşları BD Phoenix (USA) ID Broth sıvısı ile beş mL 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak; 1x10⁶, 5x10⁵, 2x10⁵, 1,2x10⁵, 6x10⁴, 3x10⁴ kob/mL dilüsyonları yapılmış ve formik asit ekstraksiyon metodu uygulandıktan sonra MALDI-TOF MS (Bruker, Almanya) sistemi ile çalışılmıştır.

İstatistiksel analiz: Sonuçların istatistiksel analizi için SPSS ver. 24.0 programı kullanılmıştır. Ki-kare testi uygulanarak p<0,05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 152 idrar örneğinin MALDI-TOF MS ekstraksiyon sonuçları, altın standart olan kültür yöntemi ile kıyaslanmış ve veriler Tablo 1’de özetlenmiştir. Buna göre;

Doğru Negatifler: İdrar örneğinde, MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanamayan, idrar kültüründe üreme olmayan (n:84) ve ürogenital veya cilt florası üyesi bakteri ve patojen bakteri üremesi mevcudiyetinde karışık bakteri üremesi olup tekrarı istenen örnekler (n:7).

Doğru Pozitifler: İdrar kültüründe 10^5 kob/mL ve yukarısında tek çeşit bakteri üremesi olup, direkt örnekten MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılanlar (n:25).

Yanlış Negatifler: Kültürde 10^4 kob/mL ve/veya 10^5 kob/mL iki veya üç çeşit anlamlı bakteri üremesi olan 23 hasta ile 10^3 kob/mL bakteri üremesi veya maya üremesi olan (n:5) ve 10^5 kob/mL *Streptococcus* spp. ve nonfermenter Gram negatif basil üremesi olan (n:8) 13 hasta, MALDI-TOF MS sistemi ile tanımlanamayanlar.

MALDI-TOF MS ile tanımlanan ancak kültürde izole edilemeyen örnek mevcut olmayıp, yanlış pozitif sonuç tespit edilmemiştir.

Bununla birlikte çalışmaya alınan 152 idrar örneğinden rastgele seçilerek Gram boyama uygulanan 52 (%34) örnekte Gram boyamada tek tip morfolojide bakteri saptanırken deneysel olarak 100 (%66) tanesine Gram boyama uygulanmamıştır. 52

örneğin idrar kültürü sonuçlarına göre; 16 tanesinde tek tip Gram negatif basil, dokuz tanesinde iki veya üç çeşit 10^5 kob/mL anlamlı üreme olup, 21 tanesinde üreme olmamıştır. Üç tanesinin kültürü karışık bakteri üremesi nedeniyle kontaminasyon olarak çıkarılırken iki tanesinde 10^4 kob/mL Gram pozitif kok üremiştir. Bir kültürde ise 10^3 kob/mL bakteri üremesi olmuştur. Gram boyama yapılan ve yapılmayan örneklerde MALDI-TOF MS ekstraksiyon sonuçları Tablo 2’de verilmiştir. Buna göre; MALDI-TOF MS sistemi ile doğru pozitif tanımlanan 25 örnekte 10 tanesi, MALDI-TOF MS sistemi ile doğru negatif olarak tanımlanan 91 örnekte ise 24 tanesi Gram boyama yapılan gruptadır. İdrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile tanımlama öncesinde Gram boyama yapılmasının test sonuçlarına etkisinin ortaya çıkarılması amacıyla istatistiksel analiz yapılmıştır. Buna göre Gram boyama uygulanan ve uygulanmayan örneklerde MALDI-TOF MS sonuçları istatistiksel anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çalışmamızda, 10^5 tek çeşit bakteri üremelerinde MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansı değerlendirildiğinde; duyarlılığı %76 olarak, özgüllüğü ise %100 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3).

Kültürde 10^5 kob/mL tek çeşit bakteri üremesi olan 33 örneğin, direkt MALDI-TOF MS ile tanımlama sonuçları, kültür sonuçları ile karşılaştırıldığında; *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis*, *S. aureus* ve *C. striatum*’da MALDI-TOF MS sisteminin tanımlama oranının yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

Tablo 1. İdrar örneklerinden MALDI-TOF MS sistemi ile direkt bakteri tanımlanması yönteminin altın standart olan kültür metodu ile karşılaştırılması

		KÜLTÜR	
		Hasta	Sağlam
MALDI-TOF MS	Hasta	Doğru Pozitifler (A) 25	Yanlış Pozitifler (B) 0
	Sağlam	Yanlış Negatif (C) 36	Doğru Negatif (D) 91
	Toplam	Toplam Hasta (A+C):61	Toplam Sağlam (B+D): 91

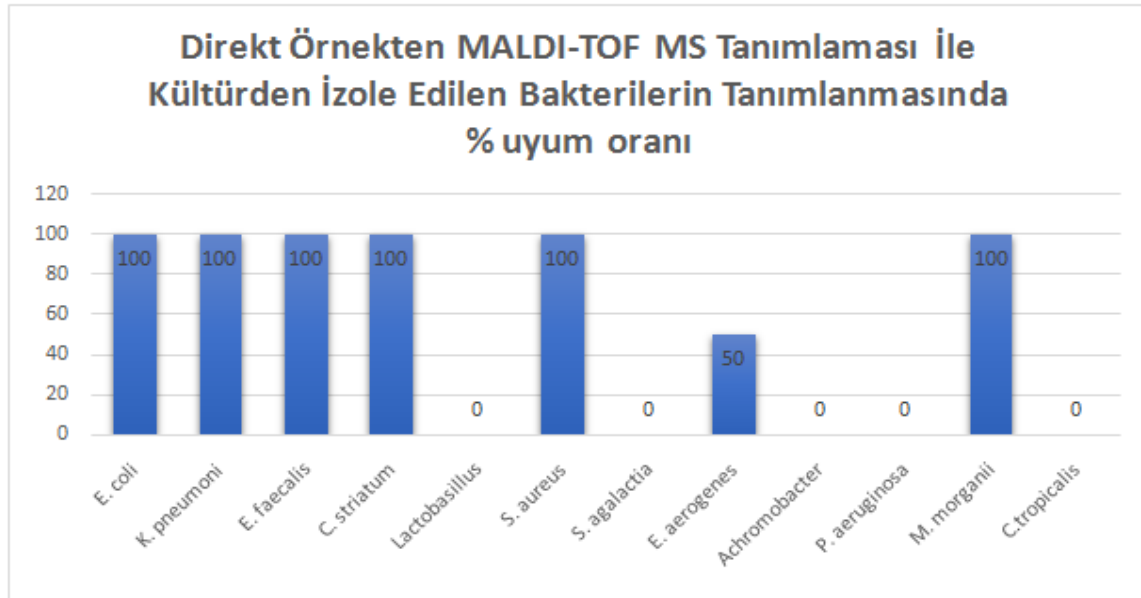
Tablo 2. Gram boyamanın MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansı üzerine etkisi

	Gram boyama yapılan örnekler	Gram boyama yapılmayan örnekler
MALDI-TOF MS ile doğru pozitif tanımlanan örnekler	10	15
MALDI-TOF MS ile doğru negatif tanımlanan örnekler	24	67
MALDI-TOF MS ile yanlış negatif tanımlanan örnekler	18	18
Toplam	52	100

Tablo 3. 10⁵ tek çeşit bakteri üremelerinde MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansı

	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
MALDI-TOF MS	76	100	100	74

PPD: Pozitif Prediktif Değer
NPD: Negatif Prediktif Değer



Şekil 1. Direkt örnekten MALDI-TOF MS tanımlaması ile kültürden izole edilen bakterilerin MALDI-TOF MS ile tanımlanmasına göre uyum oranı (%)

Deneysel olarak MALDI-TOF MS'in düşük bakteriyel konsantrasyonlardaki güvenli tanımlama düzeyini belirlemek amacıyla; *E. coli* ve *E. faecalis* suşlarının 1×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 , $1,2 \times 10^5$, 6×10^4 , 3×10^4 kob/mL dilüsyonları yapılarak MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılmıştır. Buna göre; *E. coli* suşu, 1×10^6 , 5×10^5 ve 2×10^5 kob/mL dilüsyonlarında, *E. faecalis* ise sadece 1×10^6 kob/mL dilüsyonda yüksek düzey güven aralığında belirlenmiştir.

TARTIŞMA

ÜSE erişkin kadınlarda ve erkeklerde bakteriyel enfeksiyonların en sık sebebi olup tüm yaş gruplarında görülebilmektedir (1). Standart kantitatif idrar kültürlerinin sonuçlanması iki-üç günlük bir zaman alır ve bu sürede klinisyenler sıklıkla antimikrobiyal tedavi başlarlar. Bu antibiyotikler çoğu vakada gereksiz, yetersiz veya gerektiğinden daha geniş spektrumlu mikroorganizmaları kapsayan niteliktedir (5). MALDI-TOF MS mikrobiyolojide rutinde sık olarak karşılaştığımız mikroorganizmaların hızlı ve kolay bir şekilde tanımlanmasını sağlayan yeni bir yöntem olup, klasik olarak mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır (6). Bu yöntem daha önceden 16S rRNA gen sekansı ile ayrılabilen yakın türlerin ayrımını bile başarıyla yapabilmektedir (7). Klinik örneklerden MALDI-TOF MS sistemi ile direkt bakteri tanımlanması, laboratuvardaki örneklerin alınmasından birkaç saat sonra klinik açıdan yararlı sonuçlar elde edilmesini sağladığı için gelecekte kullanışlı yöntemler arasında yerini alabilir (8). Hem laboratuvar sayısının hem de laboratuvarlara gelen örnek sayısının her geçen gün artması nedeniyle mikrobiyolojide de laboratuvar otomasyonuna doğru bir eğilim görülmektedir. MALDI-TOF MS basit, otomatize, kütle spektrofotometresinde özel deneyim gerektirmeyen, hızlı sonuç veren, yüksek işlem hacimli, ucuz bir sistemdir. Her laboratuvar, tanımlama için kullanılan bu sistemlerden kendine uygun olanını seçmekle, daha ekonomik ve doğru tanıya giderek hasta tedavisine katkıda bulunabilir (9). Yapılan çalışmalara göre idrar örneklerinden direkt tanımlama için mikrolitrede 10^5 kob/mL ve üzeri bakteri varlığı

gerekmektedir. Yeterli mikroorganizmanın bulunduğu örneklerde, önce yavaş sonrasında hızlı santrifüj yapılmak suretiyle etken mikroorganizmaların saflaşması sağlandıktan sonra direkt örnekten inceleme yapılabilir (10).

MALDI-TOF MS yöntemi ile klinik örneklerden doğrudan bakteri izolasyonu konusunda yapılan çalışmalara bakıldığında; Kohling ve ark. (11), tarafından ÜSE şüpheli ve bakteriyel yükü belirlenmemiş 107 idrar örneğinde, MALDI-TOF MS ile yapılan tanımlamada MALDI-TOF MS sisteminin duyarlılığını %60,4 olarak bulmuşlardır. Ayrıca MALDI-TOF MS'in performansı ile ilgili olarak ilginç bir olay tespit edilmiştir. Buna göre alfa defensin isimli peptitlerin idrarda bulunması bakteriyel pikleri baskılamakta ve idrar örneklerinden doğrudan tanımlamayı önlediği belirlenmiştir. Defensin olmaksızın yapılan testlerde ise MALDI-TOF MS sisteminin direkt idrardan tanımlama duyarlılığı %97,1 olarak tespit edilmiştir. İdrar örneklerinde doğrudan bakteri izolasyonu amacıyla yapılan başka bir çalışmada, 10^5 kob/mL tek çeşit bakteri içeren 220 idrar örneğinde MALDI-TOF MS yöntemi ile doğrudan %91,8 oranında tür düzeyinde, %92,7 oranında ise cins düzeyinde doğru tanımlama yapılabilmektedir (8). Çin'de yapılan bir çalışmada da idrar kültüründe tek tip 10^5 bakteri izole edilen örneklerde, MALDI-TOF MS yöntemi ile 430 adet direkt idrar örneklerinden 387 (%90)'unda doğru tanımlama, 44 adet kültürde iki tip 10^5 bakteri izole edilen örneklerde ise MALDI-TOF MS yöntemi ile direkt idrar örneklerinden 4 (%9)'unda iki tip bakteri, 20 (%45) örnekte ise iki bakteriden yalnızca biri tanımlanabilmiştir (12). Veron ve ark. (13), %78,9; Rosselló ve ark. (14), %90, İñigo ve ark. (15), ise %89,1 oranında idrar örneklerinden doğrudan MALDI-TOF MS sistemi ile duyarlılık bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, MALDI-TOF MS sisteminin duyarlılığını %67, özgüllüğünü %100, negatif prediktif değerini (NPD) %94 ve pozitif prediktif değerini (PPD) %100 olarak bulunmuştur (16). Çalışmamızda da MALDI-TOF MS'in 10^5 tek çeşit bakteri üremelerinde duyarlılığı %76, özgüllüğü %100, PPD'i %100 ve NPD'i %74 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlarımız çalışmalara uyumlu olduğu görülmüştür.

İdrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile tanımlamanın yapılamadığı bazı çalışmalarda düşük bakteriüri sebebiyle oluşan çökeltinin yetersiz olmasından dolayı, MALDI-TOF MS sisteminin tanımlama sınırının altında olduğu düşünülmüş ve bu durumlar için tanı algoritmaları geliştirilmesi sonucuna varılmıştır (14). Bu nedenle yapılan bir çalışmada, idrar örneklerine Gram boyamayı takiben MALDI-TOF MS yöntemi uygulanmış, kültür sonucuna göre üç kısım derecelendirme yapılmıştır. Buna göre Gram boyama ve kültür sonucu %85,4 örnekte tam uyumlu, %4,6 örnekte kısmi uyumlu, %10 örnekte uyumsuz olarak bulunmuş ve Gram boyamada tek tip morfolojide görülen ve MALDI-TOF MS ile çalışılan örneklerde, %93 oranında doğru tanımlama sağlanmıştır (17). Çalışmamıza göre Gram boyamanın bakteriyel yükü belirlemek ve MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansına etkisini araştırmak amacıyla rastgele seçtiğimiz örnekler iki gruba ayrılmış ve Gram boyama uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$). Buna göre Gram boyamanın bakteriyel yükü belirlediği ve MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansına katkı sağladığı ve bu nedenle çalışmaya alınan örneklere Gram boyama yapılması gerektiği düşünülmüştür. Yine yapılan bir diğer çalışmada, doğrudan idrar örneklerine diafiltrasyon metodu ile birlikte MALDI-TOF MS sistemi beraber uygulanmış ve sonuçlar türler arasında farklılık göstermiştir. *E. coli*'de 10^8 , 10^7 ve 10^6 kob/mL örneklerde güvenli (>2), 10^5 kob/mL'de orta güven aralığında (1,8) tanımlama yapılabilirken, *Staphylococcus saprophyticus*'ta 10^7 kob/mL'de orta güven aralığında ve bunun altındaki miktarlarda ise güvenilir olmayan tanımlama ($<1,7$) yapılmıştır. Viridans streptokoklarda ve koagülaz negatif stafilokok (KNS)'lerde ise 10^5 kob/mL'de tanımlama yapılamamıştır (16). MALDI-TOF MS güvenli tanımlama skorlamasının deneysel olarak bakteri türleri ve yükleri arasındaki farklılığı ortaya koymak amacıyla yapılan bir çalışmada; güvenilir tanımlama skoru için en az olması gereken bakteri yükü; *E. coli* için 8×10^4 kob/mL, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* için ise $1,2 \times 10^5$ kob/mL olarak belirlenmiştir (8). Deneysel olarak MALDI-TOF MS'in düşük bakteriyel konsantrasyonlardaki güvenli

tanımlama düzeyini belirlemek amacıyla yaptığımız çalışma sonucuna göre ise *E. coli* ve *E. faecalis* suşlarının 1×10^6 , 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, $1,2 \times 10^5$, 6×10^4 , 3×10^4 , kob/mL dilüsyonları yapılarak MALDI-TOF MS ile tanımlaması yapılmış ve *E. coli* suşu, 1×10^6 , 5×10^5 ve $2,5 \times 10^5$ kob/mL dilüsyonlarında, *E. faecalis* ise sadece 1×10^6 kob/mL dilüsyonda yüksek düzey güven aralığında tanımlanmıştır. Buna göre bu veriler ve MALDI-TOF MS ile tanımlanabilen bakterilerin kültür sonucuna göre uyum oranları göz önüne alındığında, idrardaki bakteriyel yükün Gram negatif bakterilerde en az $>10^5$ kob/mL, *E. faecalis*, *S. aureus* ve *C. striatum*'da ise $\geq 10^6$ kob/mL olması gerektiği düşünülmüştür.

Yine bazı çalışmalara göre bazı spesifik mikroorganizmaların MALDI-TOF MS sistemi ile klinik örneklerden doğrudan izolasyonu konusunda sorunlar belirtilmiştir. Doğrudan pozitif kan kültürlerinde yapılan çalışmalarda, protein ekstraksiyonu yapılsa bile mayaları tanımlama seviyesi düşüktür (18). Buna benzer bir durum streptokokları tanımlamak için de söylenmiştir (17,19). Bununla birlikte çalışmamızda, kültürde 10^3 kob/mL tek çeşit bakteri üremesi olan ve 10^5 kob/mL maya veya nonfermente Gram negatif basil veya *Streptococcus* spp. üremesi olan 13 örnek ve 10^4 ve/veya 10^5 kob/mL iki veya üç çeşit bakteri üremesi olan 23 örnek MALDI-TOF MS ile tanımlanamamıştır. Çalışma sonuçlarımıza ve yapılan çalışmalara bakıldığında, MALDI-TOF MS sisteminin nonfermente Gram negatif basil, *Streptococcus* spp. ve mayaların adlandırılmasında, tanımlamadan kaynaklanan bir sorun teşkil etmesi nedeniyle çok yeterli olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada MALDI-TOF MS yönteminin duyarlılığı 10^5 ve/veya 10^6 kob/mL tek çeşit Gram negatif bakteriüri olan örneklerde yüksek bulunurken, karışık veya 10^3 kob/mL ve altında bakteriüri veya candidüri olan örneklerde tanımlama yapılamamıştır. Bu nedenle, MALDI-TOF MS sistemi ile idrar örneğinden direkt bakteri tanımlama öncesinde Gram boyama uygulamasının etkinliği araştırılmış ve istatistiksel olarak ($p<0,001$) MALDI-TOF MS sisteminin tanı performansına katkı sağladığı ve bu nedenle çalışmaya alınan örneklere Gram boyama yapılması

gerektiği kanaatine varılmıştır. Bu yöntem ile idrar kültüründe 10^5 kob/mL tek çeşit bakteri üremesi olan hastalarda klasik kültür yöntemi için harcanacak olan 24 saatlik süre yerine 2-3 saat içinde klinisyene

sonuç verilebilmekte olup, hastaya uygun antibiyotik tedavisinin başlanmasına katkı sağlayabilecektir. Ancak altın standart olan kültür yöntemiyle bu verilerin doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Stamm WE, Norrby RS. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis*, 2001;183: 1-4. doi: 10.1086/318850.
2. McIsaac WJ, Hunchak CL. Over estimation error and unnecessary antibiotic prescriptions for acute cystitis in adult women. *Med Decis Making*, 2011;31(3): 405-11. doi: 10.1177/0272989X10391671.
3. Deville WL, Yzermans JC, Van Duijn NP, Bezemer PD, Van der Windt DA, Bouter LM. Theurine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy. *BMC Urol*, 2004; 4:4.
4. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, LaScola B, Fournier PE, Rolain JM. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 2009; 49:543-51.
5. Sundqvist M, Kahlmeter G. Pre-emptive culturing will improve the chance of getting it right when empirical therapy of urinary tract infections fails. *J Antimicrob Chemother*, 2009; 64:227-8.
6. Yılmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H. Mikrobiyolojik tanılamada MALDI-TOF MS uygulamaları. *TAF Prev Med Bul*, 2014;13(5):421-6.
7. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012;93(3):965-74.
8. Ferreira L, Juanes F, Gonza'Lez-A'Vila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernández A, Gonza'Lez B. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2010; 48(6):2110-5. Doi:10.1128/Jcm.02215-09.
9. Hasçelik G, Mikrobiyolojik tanıma yeni yöntemler. *Ankem Derg*, 2013;27(Ek 2):154-6.
10. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*, 2010;16(11):1614-9.
11. Kohling HL, Bittner A, Muller KD, Buer J, Becker M. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol*, 2012; 61: 339-44.
12. Wang XH, Zhang G, FanYY, Yang X, Sui WJ, Lu XX. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining maldi-tof ms with uf 1000i urine flow cytometry. *J Med Microbiol*, 2013; 92 (3); 231 -5.
13. Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, Hostis GL. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015; 34(9):1787-95.
14. Rosselló GA, Rodríguez MP, Ortiz de Lejarazu LR. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by massspectrometry (MALDITOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2015;33(2):89-94. doi: 10.1016/j.eimc.2014.02.022.
15. Íñigo M, Coello A, Fernández-Rivas G, Rivaya B, Hidalgo J, Quesada MD, 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.
16. DeMarco M, Burnham C. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. *Am J Clin Pathol*, 2014; 141(2): 204-12 doi: 10.1309/ajcpqyw3b6jlkilc.
17. Burillo A, Rodríguez-Sánchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodríguez Créixems M, Bouza E. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PLoSOne*, 2014; 9(1): e86915. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086915>.
18. Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, Marín M, Cercenado E, Rodríguez-Créixems M et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight massspectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 2014; 20(7):421-7. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12455>.
19. Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, Van den Brule AJ. An evaluation of three processing method sand 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. doi: 10.1007/s10096-011-1480.