

# Bakteriyemi Etkeni Gram Negatif Bakterilerin Hızlı Tanımlanmasında Mikroarray ve Lizis Filtrasyon Sonrası MALDI TOF MS Yöntemlerinin Değerlendirilmesi

## *Evaluation of Microarray and Lysis Filtration Combined MALDI TOF MS Procedures for the Identification of Gram Negative Bacteremia*

Mehmet Soylu\*<sup>©</sup>, Ayşe Arslan\*\*<sup>©</sup>, Şöhret Aydemir\*<sup>©</sup>, Alper Tünger\*<sup>©</sup>

\* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

\*\* Sağlık Bakanlığı Üniversitesi, Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Bursa, Türkiye

**Atf/Cite as:** Soylu M, Arslan A, Aydemir Ş, Tünger A. Bakteriyemi etkeni Gram negatif bakterilerin hızlı tanımlanmasında mikroarray ve lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS yöntemlerinin değerlendirilmesi, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):368-74.

### Öz

**Amaç:** Sepsis olgularında yanlış antimikrobiyal tedavi alan veya tedavi almayan olgularda ölüm oranları kaybedilen her saat başına artış göstermektedir. Bu çalışmada, etkenin konvansiyonel kültür yöntemine oranla daha hızlı tanımlanabilmesi amacıyla konvansiyonel kan kültürü/MALDI TOF yöntemi ile lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS (LFM) ve mikroarray yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Kasım 2015-Şubat 2016 tarihleri arasında Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Erişkin Yoğun Bakım ünitelerinde izlenen hastalardan alınan kan kültürü örneklerindeki 39 Gram negatif etkene mikroarray ve LFM işlemi uygulanıp, ardından MALDI TOF sistemi ile çalışıldı. Bakteri kolonisinden yapılan MALDI TOF tür düzeyinde tanımlama ile lizis filtrasyon sonrası uygulanan MALDI TOF ve mikroarray test yöntemlerinin sonuçları karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Kan kültürü cihazındaki pozitif sinyal süreleri en kısa yedi saat 55 dakika, en uzun 31 saat 22 dakika, ortalama pozitiflik süresi 12 saat 55 dakika olarak belirlendi. Kültür sonrası MALDI TOF identifikasyonu ile LFM identifikasyonun duyarlılığı %82 (32/39), mikroarray yönteminin ise duyarlılığı %87.1 olarak hesaplandı. Lizis filtrasyon sonrası uygulanan MALDI TOF ile mikroarray yöntemlerinin birbirleri ile benzerliği %79.4 (31/39), her üç yöntemin birlikte tutarlı sonuç verdiği örneklerin oranı ise %76.9 (30/39) olarak hesaplandı. En sık saptanan üç etken *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.* ve *Escherichia spp.* kültür sonrası MALDI TOF ve LFM yöntemi ile uyumu Cohen'in kappa katsayısı sırası ile 0.715, 0.843, 0.938; mikroarray yöntemi ile uyumu 0.935, 0.753, 0.938 olarak hesaplandı ve her üç bakteri için de yüksek uyumluluk elde edildi.

**Sonuç:** Elde edilen verilere dayanılarak, hem lizis filtrasyon hem de mikroarray platformunun sepsis tanısını kısaltmaları açısından yararlı olduğu düşünülmüştür. Lizis filtrasyon yöntemi maliyet etkinliği açısından önde bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Sepsis, matrix-yardımlı laser desorpsiyon-ionizasyon kütle spektrometrisi, filtrasyon, mikroarray analizi

### ABSTRACT

**Objective:** Each hour of delay in antibiotics administration increases mortality in sepsis. The aim of this study was to decrease the bacteria identification time to initiate appropriate antibiotic treatment as early as possible.

**Method:** Tests were applied to 39 Gram negative bacteria isolated from blood cultures sent to our laboratory from intensive care units between November 2015- February 2016. The results of bacterial identification tested on both microarray and LFM methods were compared.

**Results:** In the comparison of MALDI-TOF MS after sub-culture, MALDI-TOF after lysis centrifugation and microarray methods, sensitivity was determined as 82% (32/39) in LFM and as 87.1% (34/39) in the microarray method. All three methods had a concordance of 76.9% (30/39). Most common species identified in this study were *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella spp.* and *Escherichia spp.*, and their Cohen's Kappa coefficients for LFM and post-subculture MALDI were calculated as 0.715, 0.843, and 0.938, respectively. In addition, their BC-GN microarray and post-subculture MALDI concordance rates calculated with Cohen's Kappa were 0.935, 0.753 and 0.938, respectively. Both methods showed good correlations with the post-culture MALDI method.

**Conclusion:** Lysis centrifugation and microarray platforms decrease the identification time in blood culture processing successfully. Results of this study suggest that for the laboratories with MALDI-TOF mass spectrophotometer, the lysis filtration method is a fast and cost-effective method that may be suitable for routine procedures.

**Keywords:** Sepsis, matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry, filtration, microarray analysis

**Alındığı tarih / Received:**  
29.03.2021 / 29.March.2021

**Kabul tarihi / Accepted:**  
13.07.2021 / 13.July.2021

**Erken çevrimiçi / First Published:**  
23.09.2021 / 23.September.2021

### ORCID Kayıtları

M. Soylu 0000-0002-9145-1506  
A. Arslan 0000-0002-4934-4889  
Ş. Aydemir 0000-0001-8354-9100  
A. Tünger 0000-0002-1644-8833

✉ mehmet.soylu@ege.edu.tr

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.  
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.  
Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY)

## GİRİŞ

Kanda bakteri bulunması bakteriyemi olarak belirtilirken, bakteriyemi tablosunun devamı sonucu, immünolojik mekanizmaların da olaya katılmasıyla beliren tablo sepsis olarak tanımlanır<sup>(1)</sup>. Sepsis, yüksek mortalite ve morbidite ile seyreden, her yıl dünya çapında yaklaşık 18 milyon olguya ve %28-50 olguda da ölüme neden olan bir klinik tablodur<sup>(2)</sup>. Sepsise bağlı ölümlerde yaş, enfeksiyon etkeni, enfeksiyonun kazanıldığı yer ve altta yatan primer hastalık önemlidir. Sepsis olgularında ilk 24 saat uygun antimikrobiyal tedaviye başlanması prognoz açısından oldukça önemlidir, yanlış antimikrobiyal tedavi alan veya tedavi almayan olgularda ölüm oranları kaybedilen her saat başına %7.6 oranında artış göstermektedir<sup>(2)</sup>.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteriyeminin kesin tanısı için kullanılan altın standart yöntem kan kültürüdür<sup>(3)</sup>. Kan kültüründe etkenin üretilmesi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması için en az 48-72 saatlik bir süre gerektiğinden, günümüzde spesifik etkeni aynı gün içerisinde saptayabilen ve saptanan etkenin önemli direnç paternlerinin çalışılabileceği moleküler tabanlı testler de kullanılmaya başlanmıştır<sup>(4,5)</sup>.

Bu çalışmada, lizis filtrasyon ve matrix assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI TOF MS) kombine edilerek yapılan identifikasyon ve konvansiyonel kan kültürü sonrası yapılan MALDI TOF MS ile identifikasyon sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (31.07.2014 tarih ve 14-6/3 No.lu karar) onaylanmıştır.

Kasım 2015-Şubat 2016 tarihleri arasında Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Erişkin Yoğun Bakım ünitelerinde takip edilen hastalardan alınan ve BiöMerieux BactALERT™ (BioMérieux, Fransa) kan kültürü sisteminde pozitif sinyal veren kan kültürü

şişeleri değerlendirildi. Sinyal sonrası kan kültürü şişelerinin pozitif sinyal verme süreleri kaydedildi, kan kültürü şişelerinden alınan örnek %5 koyun kanlı agar ve EMB agar besiyerlerine inoküle edildi ve Gram ile boyalı preparatları hazırlandı. İnkübasyon sonrası oluşan koloniler Vitek MALDI TOF MS (BioMérieux, Fransa) sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. Etken Nanosphere Verigene System™ BC-GN mikroarray sisteminin (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) veri tabanında bulunan bakteri grubunun içerisinde ise çalışmaya dâhil edildi.

Eşzamanlı olarak, yönergelere uygun yöntemlerle hazırlanmış solüsyonlar ve gereçler ile doğrudan pozitiflik saptanan kan kültürü şişesinden lizis filtrasyon işlemi uygulanıp ardından Vitek MALDI TOF MS (BioMérieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapıldı<sup>(5)</sup>. Çalışmaya lizis filtrasyon yöntemine uyumlu olmadığı için antibiyotik inhibitörü içeren kan kültürü şişesi alınmadı.

Son olarak aynı kan kültürü şişelerinden alınan 0.7 mL örnek kullanılarak kapalı sistem nükleik asit ekstraksiyon ve amplifikasyon sonrasında nanopartikül problemleri ile çalışan Nanosphere Verigene System BC-GN mikroarray (Nanosphere Inc. Northbrook, ABD) test yöntemi ile Gram negatif etkenin ve direnç genlerinin tanımlanması gerçekleştirildi<sup>(4)</sup>.

Ardından, rutin olarak uygulanan ve bakteri kolonisinden yapılan MALDI TOF MS ile tür düzeyinde tanımlama ile lizis filtrasyon sonrası uygulanan MALDI TOF MS (LFM) ve mikroarray test yöntemlerinin sonuçları karşılaştırıldı. İstatiksel analiz yöntemi olarak Cohen'in Kappa katsayısı SPSS 18.0 programı ile belirlendi<sup>(6)</sup>. En sık saptanan üç bakteri olan *Klebsiella*, *Acinetobacter* ve *Escherichia* türlerinin kültür sonuçları ile lizis filtrasyon ve mikroarray testleri ile uyumu hesaplandı. Cohen'in kappa değerinin değerlendirilmesinde Landis ve Koch'un tablosu kullanıldı<sup>(7)</sup>. Kültür sonrası MALDI TOF MS yöntemi ile elde edilen sonuç altın standart kabul edilerek duyarlılık hesaplandı<sup>(8)</sup>. Altın standart olarak kullanılan kültür sonrası MALDI TOF MS yönteminin moleküler bir yöntemle verifikasyonu yapılamadığı için özgüllük değerlendirilmedi.

Lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS prosedürü (LFM): Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden alınan 2 mL kan kültürü örneği ile 1 mL lizis tampon çözeltisi (% 0.6 Brij 97+0.4M CAPS; pH=11.7) karıştırıldı ve 5 saniye vortekslenildi. İki dakika sonra elde edilen lizat, 0.45 µm kalınlığında 2 cm çapında bir polietersülfon filtreden 40 saniye boyunca vakumlu aspiratör yardımı ile el yapımı iki yollu bir filtre tutucusu kullanılarak süzüldü. Fothergill ve ark.<sup>(5)</sup> çalışmasında, kullanılan filtre tutucu ticari bir firmanın üretmiş olduğu yüksek maliyetli bir filtre tutucu sistemi ile yapılmıştır fakat bu çalışmada demir boruların tutturulması ile elde edilmiş el yapımı bir filtre tutucu vakum düzeneği hazırlanarak çalışıldı. Filtrede kalan pellet, üç kez 3 ml yıkama tamponu çözeltisi (20 nM Sodyum fosfat +% 0.05 Brij 97 +% 0.45 NaCl, pH=7.2) ile yıkandı. Filtredeki pellet, bir polyester uçlu swab ile (Cleanmo™ TX743, Guandong, Çin) Vitek™ MS tepsisine aktarıldı. Pellet 1 uL CHCA (α-Siyano-4-hidroksisinnamik asit) matriksi ile kaplandıktan sonra identifikasyon Vitek™ MS cihazı aracılığıyla gerçekleştirildi. Filtreleme işleminden sonra, kullanılan filtreler filtre tutucudan çıkarıldı ve filtre tutucu %0.5 sodyum hipoklorit ile temizlendi. Bu yöntemin kan örneği başına toplam maliyeti, hasta başına yaklaşık 13 ABD doları olarak hesaplandı. Örnek hazırlık aşamaları ve Vitek MALDI TOF MS (BioMérieux, Fransa) cihazıyla identifikasyon aşaması yaklaşık 15 dakika sürdü.

Nanosphere Verigene™ BC-GN mikroarray testi: BC-GN mikroarray testi, üretici talimatlarına göre gerçekleştirildi. Bu test, *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* bakterilerinin cins düzeyinde tespiti ve *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia marcescens* bakterilerinin tür düzeyinde tespiti için, *rpsA*, *ompA/mrkC*, *gyrB/metB*, *atpD*, *oppA*, *yggE*, *ompA*, *sodA*, *chiC/ampC* genlerini hedefleyen probalara sahip bir mikroarray platformu kullanılmaktadır. Ayrıca *bla*<sub>CTX-M'</sub>, *bla*<sub>KPC'</sub>, *bla*<sub>NDM'</sub>, *bla*<sub>VIM'</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> ve *bla*<sub>OXA</sub> direnç belirleyicilerini de belirleyebilme yeteneğine sahip bir testtir. Çalışma prosedürü olarak her bir örnek için Verigene™ Processor SP'ye bir ekstraksiyon tepsisi, bir test kartuşu ve bir utility tepsisi yerleştirildi. Test kartuşunun numune kuyucuna 700 µl kan kültürü sıvısı örneği konuldu, 2.5 saat

sonra, test kartuşu Verigene™ Processor SP'den çıkarıldı ve reaktif paketi substrat tutucusundan ayrıldı. Substrat tutucu, analiz için Verigene™ okuyucusuna yerleştirildi ve identifikasyon sonuçlandırıldı. Örnek başına BC-GN mikroarray testi için tahmini maliyet 100 ABD Doları olarak hesaplandı. Örnek hazırlık aşamaları ve test aşamalarının sonuçlanmasıyla yaklaşık üç saatte identifikasyon gerçekleştirildi.

## BULGULAR

Kan kültürü pozitiflik sinyal süreleri en kısa 7 saat 55 dakika, en uzun 31 saat 22 dakika, ortalama pozitiflik süresi 12 saat 55 dakika olarak kaydedildi.

Çalışmaya alınan toplam 39 etkenin konvansiyonel kültürden elde edilen koloniler kullanılarak MALDI TOF MS yöntemiyle yapılan identifikasyonunda en sık saptanan üç etken *Klebsiella pneumoniae* (12, %30.76), *Acinetobacter baumannii* (11, %28.2) ve *Escherichia coli* (7, %17.94) olarak sıralanmıştır. Kültür sonrası MALDI TOF yöntemi, LFM ve mikroarray yöntemleri ile elde edilen identifikasyon sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 1'de sunulmuştur.

Dört kültür şişesinden yapılan LFM tanı yöntemiyle sonuç elde edilemezken, iki kan kültürü şişesinden yapılan çalışmada konvansiyonel kültür yöntemiyle elde edilenden farklı bakteri tanımlanması gerçekleştirildi. Lizis filtrasyon yöntemi kullanılarak tanımlama yapılamayan dört şişenin üçünün kültüründe *Acinetobacter baumannii*, bir örnekte de *Citrobacter freundii* identifiye edildi. Farklı cins tayini yapılan iki örnekten birincisinde konvansiyonel yöntemle *Acinetobacter baumannii* olarak identifiye edilen bakteri *Clostridium perfringens*, ikincisinde ise konvansiyonel yöntemle *Klebsiella pneumoniae*, olarak identifiye edilen bakteri *Escherichia coli* olarak tanımlandı.

Çalışmaya alınan 39 örneğin üçünde (%7.69) mikroarray yönteminde "NO\_CALL" hatası alınmış ve bu örnekler "tanımlama yapılmadı" olarak kabul edildi. Mikroarray yöntemiyle tanımlanamayan etkenler kültür ve ardından MALDI TOF yöntemiyle sırasıyla *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens* ve

Tablo 1. Kullanılan üç yöntemle elde edilen identifikasyon sonuçları.

Kültür sonrası VITEK MS sonucu	Kültür sonuç süresi (dakika)	LFM sonucu	Verigene BC-GN mikroarray sonucu	Mikroarray direnç paterni
<i>A. baumannii</i>	651	yok	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>A. baumannii</i>	654	<i>C. perfringens</i>	NO CALL HATASI	
<i>K. pneumoniae</i>	560	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	OXA+CTX-M+NDM
<i>S. marcescens</i>	747	<i>S. marcescens</i>	NO CALL HATASI	
<i>K. pneumoniae</i>	915	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CTX-M
<i>C. freundii</i>	667	yok	<i>C. freundii</i> + <i>Enterobacter</i>	
<i>A. baumannii</i>	590	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>E. coli</i>	475	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>A. baumannii</i>	505	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	
<i>K. oxytoca</i>	630	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	NDM
<i>E. coli</i>	1902	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>E. cloacae</i>	481	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	
<i>C. koseri</i>	724	<i>C. koseri</i>	<i>Citrobacter</i> spp.	CTX-M
<i>K. pneumoniae</i>	691	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	624	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+NDM
<i>A. baumannii</i>	910	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	683	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M
<i>K. pneumoniae</i>	749	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>K. pneumoniae</i>	538	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
<i>A. baumannii</i>	714	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>P. aurescens</i>	583	<i>P. aurescens</i>	<i>P. aurescens</i>	
<i>E. coli</i>	1334	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>A. baumannii</i>	754	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>A. baumannii</i>	662	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	940	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>E. cloacae</i>	538	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	
<i>E. coli</i>	1064	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>C. freundii</i>	688	<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter</i> spp.	OXA
<i>K. pneumoniae</i>	694	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>A. baumannii</i>	928	yok	<i>Acinetobacter</i> spp.	
<i>E. coli</i>	535	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>P. aurescens</i>	970	<i>P. aurescens</i>	<i>P. aurescens</i>	
<i>E. coli</i>	1271	<i>E. coli</i>	NO CALL HATASI	
<i>K. pneumoniae</i>	508	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>A. baumannii</i>	821	yok	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>A. baumannii</i>	1744	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	OXA
<i>E. coli</i>	693	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
<i>K. pneumoniae</i>	508	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M+OXA
<i>K. pneumoniae</i>	582	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	

Tablo 2. Kültür ile LFM metodları ile en sık saptanan üç etkenin Cohen'in kappa değeri ve uyum değerlendirilmeleri.

Kültür ve LFM uyumu	Cohen'in Kappa değeri	Değerlendirme
<i>Acinetobacter</i> spp	0.715	Önemli derecede uyuma olması
<i>Escherichia</i> spp	0.843	Neredeyse kusursuz uyuma olması
<i>Klebsiella</i> spp	0.938	Neredeyse mükemmel uyuma olması

Tablo 3. Kültür ve mikroarray metodları ile en sık saptanan üç etkenin Cohen'in kappa değeri ve uyum değerlendirilmeleri.

Kültür ve mikroarray uyumu	Cohen'in Kappa değeri	Değerlendirme
<i>Acinetobacter</i> spp	0.935	Neredeyse kusursuz uyuma olması
<i>Escherichia</i> spp	0.753	Önemli derecede uyuma olması
<i>Klebsiella</i> spp	0.938	Neredeyse kusursuz uyuma olması

*Escherichia coli* olarak tanımlandı.

Kültür sonrası MALDI TOF MS tanımlaması ile LFM yöntemi karşılaştırıldığında %82 (32/39) benzerlik saptandı. Kültür ile kombine MALDI TOF MS altın standart olarak kabul edildiğinde, duyarlılık

%82 olarak hesaplandı. Mikroarray ile kültür yönteminin sonuçları birbiriyle %87.1 (34/39) oranında benzerlik gösterdi. Kültür ile kombine MALDI TOF MS altın standart olarak kabul edildiğinde, duyarlılık %87.1, LFM ile mikroarray yöntemlerinin birbirleri ile benzerliği %79.4 (31/39) saptandı. Her üç yöntemle

min birlikte tutarlı sonuç verdiği örneklerin oranı ise %76.9 (30/39) olarak hesaplandı. Kültür yöntemi ile LFM yöntemleri ile en sık saptanan üç etken olan *Acinetobacter*, *Escherichia* ve *Klebsiella* cinsleri ele alınarak iki yöntem arasındaki uyum Cohen'in kappa katsayısı değerleri Tablo 2'de paylaşılmıştır. Aynı şekilde en sık saptanan üç etken ele alındığında, kültür yöntemi ile mikroarray yönteminin uyumundan elde edilen Cohen'in kappa katsayısı değerleri Tablo 3'te sunulmuştur.

## TARTIŞMA

Sepsis, tanısı ve tedavisinde zorluklar yaşanan ve yüksek morbidite ile mortaliteye sahip klinik tablolardan birisidir.

Çeşitli çalışmalarda, sepsislerin %27-74'ünde Gram pozitif bakterilerin, %20-64'ünde Gram negatif bakterilerin etken olduğu, %15 ve daha az oranda ise polimikrobiyal etken izole edildiği gösterilmiştir<sup>(9,10)</sup>. Kan kültüründe izole edilen Gram negatif etkenlerin sıklıkları ülkelere ve bildirilen merkezlere göre değişiklik göstermekle birlikte, ülkemizde yapılan bir çalışmada Gram negatif sepsis etkenleri %57.1 saptanmıştır ve sıklık sırası çoktan aza sırasıyla; *Escherichia coli*, *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp, *Enterobacter* spp, *Proteus* spp olarak bildirilmiştir<sup>(11)</sup>. Çalışmamızdaki olgu sayılarının kısıtlı olması ve sadece Verigene System BC-GN (Nanosphere, ABD) mikroarray sisteminin veri tabanında bulunan bakterilerin çalışmaya alınması nedeniyle, elde edilen veriler ışığında çalışmamızdaki etken dağılımları ülkemizdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında benzer etken dağılımını yansıtmamıştır.

Günümüzde MALDI TOF MS teknolojisinin yaygınlaşmasıyla lizis filtrasyonun ile kombine edilerek başarılı bir hızlı tanı yöntemi geliştirilmiştir. Fothergill ve ark.'nın<sup>(5)</sup> LFM tekniği kullandıkları çalışmasında 131 izolat üzerinde yapılan çalışmada, tür düzeyinde tanımlama uyumu, subkültür sonrası yapılan Vitek MS (bioMérieux, Fransa) uygulaması ile %99 olarak saptanmıştır.

Kültür sonrası MALDI TOF uygulamasının 16s rRNA

genotipleme yerine altın standart olarak kabul edilebilirliği ile ilgili çeşitli görüşler vardır<sup>(8)</sup>. Kültür sonrası MALDI TOF uygulaması ile karşılaştırıldığında bu çalışmada LFM yönteminin duyarlılığı %82 olarak saptanmıştır. Bu çalışmadaki başarı oranının benzer çalışmalara göre düşük olmasının nedeni olarak el yapımı filtre tutucunun teknik olarak kullanım zorluğu yaratması ve çalışılan bakteri sayısının sınırlı olması şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca LFM yönteminin; kullanıcının becerisine dayalı bir yöntem olması, LFM yöntemi ile çoklu etken bulunan ve kömür içeren kan kültürü şişelerinden yapılan çalışmalarda başarı oranının düşük olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir<sup>(5,12)</sup>.

Mikroarray yöntemi, son yıllarda mikrobiyoloji alanında önemli gelişim göstermiş, umut verici bir hızlı tanı yöntemidir<sup>(13,14)</sup>. Mancini ve ark.'nın<sup>(13)</sup> Verigene System BC-GN mikroarray sistemi kullanılarak Gram negatif etkenler üzerinde yapmış oldukları çalışmada, 102 pozitif kan kültürü çalışılmış ve konvansiyonel kültür yöntemiyle %97.9 oranında uyumlu sonuç bulunmuştur. Yapılan bir maliyet/etkinlik çalışmasında Hill ve ark.<sup>(14)</sup> Verigene System BC-GN yönteminin hastalara doğru antibiyoterapi başlanmasını 33 saat daha erkene aldığını ve 33 hastanın dâhil edildiği bu çalışmada antibiyotik ve diğer ek hasta giderlerinde 70.000 ABD Doları tasarruf sağlandığı bildirilmiştir. Kim ve ark.'nın<sup>(15)</sup> bu çalışmada, kullandığımız LFM ve mikroarray yöntemlerinin kullanıldığı benzer çalışmada iki yöntem arasındaki uyumun %99.1 olarak saptandığı bildirilmiştir.

Sunulan bu çalışmada, Verigene System mikroarray testi ile konvansiyonel kan kültürü sonrasında yapılan MALDI TOF MS identifikasyon sonuçları arasında 34/39 uyum saptanmıştır. Kültür sonrası MALDI TOF ile tanımlama yöntemi altın standart olarak değerlendirildiğinde mikroarray testinin duyarlılığı %87.1 olarak hesaplanmıştır. Araştırmanın ilk başladığı dönemde alınan iki "NO\_CALL" hatasının deneyim eksikliğine bağlı kullanıcı hatası kaynaklı olabileceği yorumu yapılmıştır, 33 No.lu kan kültürü şişesinde alınan "NO\_CALL" hatasının nedeni ise belirlenemmiştir.

Verigene System BC-GN iki saat içerisinde sonuç vermesi, kullanım kolaylığı, aynı şişede birden fazla etkeni yakalayabilmesi, direnç geni saptayarak klinisyene ESBL üretimi ve karbapenem direnci bilgisi verilebilmesi, antibiyotik inhibitörlü şişelerle çalışabilme ve yüksek duyarlılık gibi avantajlara sahiptir<sup>(16,17)</sup>. Bu sistemin dezavantajları, hasta başı maliyetlerinin yüksek olması, laboratuvar da ek alana gereksinim duyulması, saptayabildiği patojenlerin ve direnç genleri için mevcut veri tabanının kısıtlı olmasıdır. Bu çalışmada saptanan verilere dayanarak, Verigene System BC-GN mikroarray platformunun bakteriyemili hastalar için iki saat içerisinde yüksek doğrulukta bakteri identifikasyonu sağladığı yorumu yapılabilir. Çalışmamızın sonuçlarında mikroarray testinden elde edilmiş direnç genlerinin varlığı bir diğer moleküler yöntemle verifiye edilememiştir.

Sonuç olarak, hem LFM yöntemi hem de mikroarray platformunun bakteriyemi tanı sürelerini kısaltmaları açısından yararlı olduğu düşünülmüştür. Mikroarray sisteminin pozitif sinyal alınmış inhibitör içeren veya içermeyen kan kültürü şişesinden üç saat içerisinde identifikasyon ve direnç geni bilgisi verebilmesi, kişiye bağımlı kullanım hatalarını en aza indirmesi, çoklu etkeni tanıyabilmesi gibi avantajlarının yanında, saptayabildiği etken sayısının ve direnç geninin kısıtlı olması ve maliyet yüksekliği gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Lizis filtrasyonunun 15 dakika içerisinde çok daha geniş veritabanında identifikasyon yapabilmesi, mikroarray testi ile benzer duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması, hasta başı maliyetinin çok daha düşük olması ve ek alana gereksinim duyulmaması gibi avantajları vardır. Dezavantaj olarak uygulama zorluğu, inhibitörlü şişeden sonuç verilememesi, testi yapanın deneyimine göre sonuçların değişebilmesi ve direnç bilgisi eksikliği gösterilebilir.

**Etik Kurul Onayı:** Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (31.07.2014 tarih ve 14-6/3 No.lu karar) onaylanmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14-TIP-056 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

**Ethics Committee Approval:** This study was conducted with the approval of Ege University Clinical Research Ethics Committee (07.31.2014/14-6/3).

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** Ege University, Scientific Research Committee (14-TIP-056).

## KAYNAKLAR

1. Doğanay M, Nozokomiyal sepsis: önemi ve tanımlar. *Hastane Enfeksiyon Derg.* 1998;2(4):179-81.
2. Perman SM, Goyal M, Gaieski DF. Initial emergency department diagnosis and management of adult patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012;20:41. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-20-41>
3. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):235-51. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-09>
4. Wojewoda CM, Sercia L, Navas M, et al. Evaluation of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2072-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00831-13>
5. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):805-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.02326-12>
6. Cohen J. A Coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20(1):37-46. <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-174.
8. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'homme G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):693-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-10>
9. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ.* 2003;326(7383):262-6. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7383.262>

10. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.  
<https://doi.org/10.4161/viru.27372>
11. Müderris T, Yurtsever SG, Baran N, et al. Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılık paternlerinin son beş yıldaki değişimi. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2019;76(3):231-42.  
<https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.65902>
12. 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.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-012-1638-2>
13. Mancini N, Infurnari L, Ghidoli N, et al. Potential impact of a microarray-based nucleic acid assay for rapid detection of Gram-negative bacteria and resistance markers in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2014;52(4):1242-5.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00142-14>
14. Hill JT, Tran KD, Barton KL, Labreche MJ, Sharp SE. Evaluation of the nanosphere Verigene BC-GN assay for direct identification of gram-negative bacilli and antibiotic resistance markers from positive blood cultures and potential impact for more-rapid antibiotic interventions. *J Clin Microbiol*. 2014;52(10):3805-7.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01537-14>
15. Kim SY, Park JS, Hong YJ, et al. Microarray-based nucleic acid assay and MALDI-TOF MS analysis for the detection of Gram-negative bacteria in direct blood cultures. *Am J Clin Pathol*. 2019;151(2):143-53.  
<https://doi.org/10.1093/ajcp/aqy118>
16. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*. 2010;375(9710):224-30.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61569-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61569-5)
17. Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Evaluation of FilmArray and Verigene systems for rapid identification of positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3433-6.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01417-14>