

MALDI-TOF MS İle Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Hızlı Bakteri Tanımlanması; Kan Dışı Steril Vücut Sıvıları İçin Tween 80 İle Ön Ekstraksiyon İşlemi Yarar Sağlar Mı?

Rapid Bacterial Identification from Positive Blood Culture Bottles By MALDI-TOF MS; Is Pre-Extraction with Tween 80 Useful for Sterile Body Fluids Other Than Blood?

Fatih Çubuk*¹, Mürşit Hasbek**²

* Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı, Ankara, Türkiye

** Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

Atf/Cite as: Çubuk F, Hasbek M. MALDI-TOF MS ile pozitif kan kültürü şişelerinden hızlı bakteri tanımlanması; Kan dışı steril vücut sıvıları için Tween 80 ile ön ekstraksiyon işlemi yarar sağlar mı? Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2024;54(1):24-31.

Öz

Amaç: Çalışmamızda Tween 80 ile ön ekstraksiyon işleminin kan dışı steril vücut sıvısı ekilen ve pozitif sinyal alınan kan kültürü şişeleri için uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada steril vücut sıvıları ekilmiş pozitif kan kültürü şişelerinden uygun agar besiyerine pasajlar alınmıştır. Bakteri kolonilerinden MALDI-TOF MS ile bakteri tanımlama yapılmıştır. Ayrıca pozitif kan kültürü şişelerine Tween 80 ile ön ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.

Bulgular: Tween 80 ile ön ekstraksiyon işlemi sonrası yapılan tanımlama çalışmalarında tür düzeyinde %53.6 ve cins düzeyinde ise %81.4 başarı elde edilmiştir. Ön ekstraksiyon işlemi sonrası gram pozitif ve gram negatif bakteriler için cins düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0.808$). Bu ön işlem tür düzeyinde özellikle gram negatif bakterilerde daha başarılı sonuçlar sağlamıştır ($p=0.021$).

Sonuç: Ön ekstraksiyon işlemi gram negatif bakteriler için başarılı sonuçlar sağlamıştır. Bununla birlikte gram-pozitif bakteriler için tür düzeyinde sınırlı aktivite göstermiştir. Farklı Tween 80 konsantrasyonları veya başka kimyasallar kullanarak yeni protokoller geliştirmek, gram pozitif bakteri tanımlama verimliliğini artırmanın yararlı bir yolu olabilir.

Anahtar kelimeler: MALDI-TOF MS, Tween 80, ön ekstraksiyon, beyin omurilik sıvısı, eklem sıvısı

ABSTRACT

Objective: Our study aimed to investigate the feasibility of pre-extraction with Tween 80 for blood culture bottles in which a sterile body fluid, excluding blood, was added and a positive signal was received.

Methods: In the present study, passages were taken from positive blood culture bottles inoculated with sterile body fluids onto the appropriate agar media. Bacterial identification was made with MALDI-TOF MS from bacterial colonies. In addition, pre-extraction with Tween 80 was applied to positive blood culture bottles.

Results: In the identification studies carried out after the pre-extraction process with Tween 80, success rates of 53.6% and 81.4% were obtained at species and genus levels, respectively. After the pre-extraction process, no statistically significant difference was observed at the genus level for gram-positive and gram-negative bacteria ($p=0.808$). This pretreatment provided more successful results at the species level, especially in gram-negative bacteria ($p=0.021$).

Conclusion: The pre-extraction process provided successful results for gram-negative bacteria. However, it showed limited activity at the species level for gram-positive bacteria. Developing new protocols using different concentrations of Tween 80 or other chemicals may be a useful way to increase the efficacy of gram-positive bacteria identification.

Keywords: MALDI-TOF MS, Tween 80, pre-extraction, cerebrospinal fluid, synovial fluid

Alındığı tarih / Received:
27.09.2023 / 27.September.2023

Kabul tarihi / Accepted:
13.11.2023 / 13.November.2023

Yayın tarihi / Publication date:
25.03.2024 / 25.March.2024

ORCID Kayıtları

F. Çubuk 0000-0002-8976-7691
M. Hasbek 0000-0002-5217-8607

✉ fatih.cubuk.0587@gmail.com

GİRİŞ

Steril vücut boşluklarını etkileyen enfeksiyonlar, artan morbidite ve mortalite riski ile ilişkilendirilmektedir⁽¹⁻³⁾. Hızlı ve etkin mikrobiyolojik tanı yaklaşımı, bu tür enfeksiyonlarda etken bakterilerin belirlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca antimikrobiyal seçimine rehberlik ederek tedaviyi ve ölüm veya komplikasyon riskini azaltmayı mümkün kılmaktadır^(1,2). Kültür işlemlerinin uzun zaman alması, özellikle hayatı tehdit eden enfeksiyonların mikrobiyolojik tanısında bakteriyel tanımlama süreçlerini hızlandıracak yaklaşımları önemli hale getirmektedir^(1,4,5).

Tanımlama işlemleri için Matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresinin (MALDI-TOF MS) kullanılmasıyla birlikte, birçok bakteri konvansiyonel yöntemlere kıyasla daha kısa bir sürede başarılı şekilde tanımlanabilmektedir⁽⁶⁾. MALDI-TOF MS temel olarak bakteri kolonilerinin analiz edilmesi şeklinde uygulanmaktadır. Otomatize kültür sistemleri kullanılması halinde, bakteriyel tanımlama için pozitif kan kültürü şişelerinden Gram boyama sonucuna göre uygun agar besiyerlerine pasaj yapılmaktadır. Bu işlem tanımlama prosedürüne yaklaşık 24 saatlik bir süre eklenmesini gerektirmektedir^(6,7).

Son dönemlerde ticari ekstraksiyon kitleri veya kurum içi protein ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak, MALDI-TOF MS ile doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden hızlı bakteri tanımlanmasını hedefleyen çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir^(6,8-10). Bununla birlikte, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral sıvı ve eklem sıvısı gibi diğer steril vücut sıvısı kültürleri ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır^(7,11). Ayrıca bu çalışmalar ile elde edilen sonuçlarda çeşitli kısıtlılıklar olduğu bildirilmektedir^(7,11).

Pozitif kan kültürü şişelerine yönelik uygulanan kurum içi ekstraksiyon işlemleri için saponin, sodyum dodesil sülfat, trifloroasetik asit, Triton X-100 ve Tween 80 gibi çeşitli kimyasallar kullanılabilir⁽¹²⁾. Tween 80 uygun maliyetli ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla bulunabilen bir

deterjandır. Tween 80 ile ekstraksiyon adımı içeren çalışmalarda pozitif kan kültürü şişeleri için başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir^(13,14).

Çalışmamızda Tween 80 ile ön ekstraksiyon işleminin kan dışı steril vücut sıvısı ekilen ve pozitif sinyal alınan kan kültürü şişeleri için uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma; Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (01.06.2021 tarih ve 2021-06/03 sayı) onaylanmıştır.

Bu çalışma Eylül 2021 ile Eylül 2022 tarihleri arasında prospektif olarak gerçekleştirilmiştir. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen steril vücut sıvısı örnekleri Gram boyalı preparat incelemesinin ardından 1-3 ml BACTEC Peds Plus/F (Becton Dickinson, ABD) içerisine ekilerek BACTEC FX otomatize kültür sistemi cihazında (Becton Dickinson, ABD) 5-7 gün inkübe edilmiştir. Aynı hastaya ait sadece ilk pozitif kültür şişesi çalışmaya alınmıştır. Pozitif sinyal alınan 32 BOS, 35 plevral sıvı ve 30 eklem sıvısı olmak üzere toplam 97 BACTEC Peds Plus/F kültür şişesi çalışmaya dâhil edilmiştir.

Rutin olarak, pozitif sinyal alınan kan kültürü şişelerinden kanlı agar, EMB agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine pasaj çekilerek 37°C'de 24-48 saat etüvde inkübe edilmiştir. Kanlı agarda gelişen bakteri kolonilerinden MALDI-TOF MS ile bakteriyel tanımlama yapılmıştır⁽⁶⁾. Çalışmamızda bu uygulamaya ek olarak pozitif kan kültürü şişelerine Tween 80 ile ön ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan ön ekstraksiyon işleminin geliştirilmesinde Bishop ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ çalışmasında kullanılan yöntem esas alınmıştır. Bu tür yöntemler geliştirilirken ekstraksiyon verimliliğini artırmak için çeşitli kimyasallar protokole dahil edilebilmektedir⁽¹²⁾. Tween 80 ile ekstraksiyon basamağını içeren çalışmalarda kan kültürü şişeleri için başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir^(13,14). Çalışmamızda

literatürden yararlanılarak, kan dışı steril vücut sıvısı kültür işlemlerinde kullanılmak üzere bir yöntem modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Özetle;

1. Pozitif kan kültürü şişesinden bir ml örnek alınarak eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 100 µl %10'luk Tween 80 çözeltisi eklenmiştir.
2. Karışım 2.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildikten sonra, supernatant başka bir eppendorf tüpüne alınarak 13.000 rpm'de beş dk santrifüj edilmiştir.
3. Supernatant atılarak, pelet bir ml steril serum Fizyolojik ile üç kez yıkanarak süspansiyon hale getirilmiş ve vortekslenmiştir.
4. Süspansiyon 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş, supernatant atılarak pelet oda sıcaklığında kurutulmuştur.
5. Peletin üzerine eşit miktarda (peletin miktarına göre 20-50 µl) %70 formik asit ve asetoneitril eklenerek, vortekslenildikten sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
6. Bir µl supernatant, metal plaka üzerine sürülmüş ve kuruduktan sonra üzerine bir µl matris solüsyonu eklenerek kurumaya bırakılmıştır.
7. Plaka MALDI-TOF MS cihazına verilerek, lazer atışları yardımıyla tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tanımlama işlemleri MALDI Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda, tür düzeyinde güvenilir tanımlama (A grubu) için ≥ 2.000 skor değerleri, cins düzeyinde tanımlama (B grubu) için ise 1.700-1.999 aralığındaki skor değerleri kullanılmıştır. 1.700'ün altındaki skorlar güvenilir (C grubu) olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS sürüm 22.0 programı (IBM Corp., ABD) kullanılmıştır. Sayısal değişkenler frekans (yüzdeler) olarak verilmiştir. Verilerin değerlendirmesinde Ki-kare ve Fisher kesin Ki-kare testleri kullanılmış ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bir yıllık dönemde kültür işlemleri için 304 BOS, 482 pleural sıvı ve 474 eklem sıvısı olmak üzere toplam 1260 steril vücut sıvısı örneği gönderilmiştir. İnkübasyon işlemleri sonrası 33 BOS, 35 pleural sıvı ve 31 eklem sıvısı olmak üzere toplam 99 kültür şişesinden pozitif sinyal alınmıştır.

Bu sürede steril vücut sıvısı kültürlerinde pozitiflik oranı %7.9 (99/1260) olarak tespit edilmiştir. Bu oran BOS kültürlerinde %10.9 (33/304), pleural sıvı kültürlerinde %7.3 (35/482) ve eklem sıvısı kültürlerinde ise %6.5 (31/474) saptanmıştır. Tekrar eden üreme olduğu tespit edilen birer BOS ve eklem sıvısı ekilmiş kan kültürü şişesi çalışma dışında bırakılmıştır. Sonuç olarak 32 BOS, 35 pleural sıvı ve 30 eklem sıvısı olmak üzere steril vücut sıvısı ekilmiş toplam 97 pozitif kan kültür şişesi çalışmaya dahil edilmiştir.

BOS, pleural sıvı ve eklem sıvısı kültürlerinde izole edilen bakterilerin dağılımları ve ön ekstraksiyon işlemi ve rutin MALDI-TOF MS prosedürü ile elde edilen tanımlama sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur.

Çalışmamızda toplam 97 izolat için tanımlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Rutin MALDI-TOF MS prosedürü ile bu izolatların 91'i (%93.8) tür düzeyinde (A) ve tamamı ise (A+B) cins düzeyinde tanımlanmıştır. Pozitif kan kültürü şişelerine yönelik yapılan ön ekstraksiyon işlemi sonrası ise bu izolatların 52'si (%53.6) tür düzeyinde (A) ve 79'u (%81.4) ise cins düzeyinde (A+B) tanımlanmıştır.

Bu çalışmada ön ekstraksiyon işlemi sonrası 41 *Staphylococcus* izolatının 36'sı (%87.8) için doğru şekilde tanımlama sağlanmıştır. Bu ön işlem, *Staphylococcus aureus* izolatlarında %76.5 (13/17) ve koagülaz negatif *Staphylococcus* izolatlarında %95.8 (23/24) oranında bir tanımlama başarısı göstermiştir.

Ön ekstraksiyon işlemi sonrası *Enterococcus* izolatlarında %83.3 (5/6) başarı elde edilmiştir.

Tablo 1. BOS, plevral sıvı ve eklem sıvısı kültürlerinde izole edilen bakterilerin dağılımları ve tanımlama sonuçları

Bakteriler	Ön Ekstraksiyon İşlemi Sonrası																Rutin MALDI-TOF MS protokolü		
	BOS				Plevral sıvı				Eklem sıvısı				Toplam				n	A	B
	n	A	B	C	n	A	B	C	n	A	B	C	n	A	B	C			
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	4	6	4	2	2	4	1	3	18	7	11	18	17	1				
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1		2	1	1	14	6	4	4	17	8	5	4	17	17			
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	1								1	1			1	1				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	1								1	1			1	1				
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	1		1	1	1	1	1		4	2	1	1	4	3	1			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	2	1	1						4	2	1	1	4	4				
<i>Streptococcus anginosus</i>					2		2			2			2	2	2				
<i>Streptococcus constellatus</i>					1		1			1			1	1	1				
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>								1		1		1		1	1				
<i>Streptococcus oralis</i>								1	1	1		1		1			1		
<i>Streptococcus salivarius</i>	1		1							1		1		1	1				
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1	1								1	1			1	1				
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1		1		1	1	1	1	3	1	2		2	2				
<i>Enterococcus faecium</i>				3	1	1	1			3	1	1	1	4	3	1			
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1		1	1					2	2			2	2				
<i>Corynebacterium afermentans</i>	2			2						2			2	2			2		
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	1	1		1	1					2	2			2	2				
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	1								1	1			1	1				
<i>Brucella species</i>								3	2	1			3	2	3		3		
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	1								1	1			1	1				
<i>Escherichia coli</i>	1	1		3	2	1	2	2		6	5		1	6	6				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2		3	2	1				5	4		1	5	5				
<i>Citrobacter freundii</i>				2	2					2	2			2	2				
<i>Enterobacter cloacae</i>				1		1				1			1	1	1				
<i>Morganella morganii</i>							1	1		1		1		1	1				
<i>Proteus mirabilis</i>				2	2					2	2			2	2				
<i>Serratia marcescens</i>							1	1		1	1			1	1				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1		4	2	1	1	1	1	6	4	1	1	6	6				
<i>Acinetobacter baumannii</i>				2	1		1			2	1		1	2	2				
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				2	1	1				2	1	1		2	2				
Toplam	32	20	8	4	35	18	8	9	30	14	11	5	97	52	27	18	97	91	6
%		62.5	25	12.5	51.4	22.9	25.7		46.7	36.6	16.7		53.6	27.8	18.6		93.8	6.2	

Bakteriyel izolatlara için elde edilen MALDI-TOF MS skor değerleri (A: ≥ 2.000 , B: 1.700-1.999 arası, C: <1.700)

Bu ön işlem ile 11 adet *Streptococcus* izolatının altısının (%54.5) doğru şekilde tanımlanması mümkün olmuştur. Diğer yandan, bu ön işlem

sonrası *Streptococcus pneumoniae* izolatlarında %75 (3/4) oranında tanımlama başarısı elde edilmiştir. Ön ekstraksiyon işlemi Enterobacterales takımı

Tablo 2. Bakteri morfolojilerine göre ön ekstraksiyon işleminin performansı

Gram özelliği	N	Tanımlanan izolat sayısı, n (%)		p
		Tür düzeyi	Cins düzeyi	
Gram pozitif	65	29 (44.6)	52 (80)	Tür düzeyi için 0.021 Cins düzeyi için 0.808
Gram negatif	32	23 (71.9)	27 (84.4)	
Toplam	97	52 (53.6)	79 (81.4)	

Tablo 3. Örnek türüne göre ön ekstraksiyon işleminin performansı

Örnek türü	N	Tanımlanan izolat sayısı, n (%)		p
		Tür düzeyi	Cins düzeyi	
BOS	32	20 (62.5)	28 (87.5)	
Plevral sıvı	35	18 (51.4)	26 (74.3)	Tür düzeyi için 0.435 Cins düzeyi için 0.362
Eklem sıvısı	30	14 (46.7)	25 (83.3)	
Toplam	97	52 (53.6)	79 (81.4)	

için %83.3 (15/18) ve nonfermentatif gram negatif bakteriler için ise %80 (8/10) tanımlama başarısı göstermiştir.

Bu çalışmada ön ekstraksiyon işlemleri sonrası gram pozitif ve gram negatif bakteriler için tür düzeyinde %44.6 ve %71.9; cins düzeyinde ise %80 ve %84.4 başarı elde edilmiştir (Tablo 2). Ön ekstraksiyon işlemi gram pozitif ve gram negatif bakteriler için cins düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0.808$). Öte yandan bu ön işlem sonrası yapılan tanımlama çalışmalarında tür düzeyinde, özellikle gram negatif bakteriler için daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir ($p=0.021$) (Tablo 2).

Ön ekstraksiyon işlemi sonrası yapılan tanımlama çalışmalarında, her üç steril vücut sıvısı ekilen ve pozitif sinyal alınan kan kültürü şişeleri için tür ($p=0.435$) ve cins ($p=0.362$) düzeyinde tanımlama sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 3).

TARTIŞMA

Çalışmamızda ön ekstraksiyon işlemi için %10'luk Tween 80 solüsyonu kullanılmıştır. Literatürde bu kimyasalın farklı konsantrasyonlarda kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır^(13,14). Süzük Yıldız ve ark.⁽¹³⁾

%10 Tween 80 kullanarak yaptıkları çalışmada tek bakteri üremesi olan kan kültürü şişelerinde %82.9 tanımlama başarısı bildirmiştir. Leli ve ark.⁽¹⁴⁾ ise ekstraksiyon için %0.1 Tween 80 konsantrasyonu kullandıkları çalışmada %91.7 başarı elde edildiğini bildirmiştir. Diğer yandan, pozitif kan kültürü şişelerine yönelik ekstraksiyon işlemleri için birçok farklı kimyasalın çeşitli konsantrasyonlarda kullanılabilirdiği bilinmektedir⁽¹²⁾. Faron ve ark.⁽¹²⁾ yaptığı derlemede ekstraksiyon işlemleri için %60-99 tanımlama başarısı rapor etmiştir.

Çalışmamızda kan dışı steril vücut sıvıları ekilen ve pozitif sinyal alınan kan kültürü şişeleri için ön ekstraksiyon işlemi sonrası tür düzeyinde %53.6 ve cins düzeyinde ise %81.4 başarı elde edilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarının pozitif kan kültürü şişeleri için Tween 80 veya diğer kimyasallar ile yapılan ekstraksiyon işlemleri sonrası elde edilen tanımlama sonuçları ile uyumlu olduğu düşünülmüştür⁽¹²⁻¹⁴⁾. Bununla birlikte, çalışmamızda farklı Tween 80 konsantrasyonlarının işlemin bakteri tanımlama başarısı üzerine etkisinin araştırılmamış olması sınırlayıcı bir durum olarak değerlendirilebilir.

Ekstraksiyon işlemleri sonrası MALDI-TOF MS ile doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden hızlı bakteri tanımlamayı amaçlayan çalışmalar, sepsis hızlı tanısı için umut verici olmuştur⁽¹⁶⁾. Otomatize

sistem kullanımının yaygınlaşması ile kan dışı steril vücut sıvısı örneklerinin kültür işlemleri için kan kültürü şişelerinden yararlanılabilmektedir. Bu durum, kan dışı steril vücut sıvısı ekilen ve pozitif sinyal alınan kan kültürü şişeleri için de benzer çalışmaların yapılmasını gündeme getirmiştir^(7,11,17). Ancak literatürde bu konuda yapılmış oldukça kısıtlı sayıda çalışma olduğu göze çarpmaktadır. Bizim çalışmamızın üç farklı steril vücut sıvısı örneği ile yapılmış olmasının önemli olduğunu ve literatüre katkı sunucu özellik gösterdiğini düşünmekteyiz.

Kuo ve ark.⁽¹¹⁾ tarafından yapılan bir çalışmada MALDI-TOF MS'nin periprostetik eklem enfeksiyonlarının hızlı tanısında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Araştırmacılar kan kültürü şişelerine ekilen ve pozitif sinyal alınan 80 eklem sıvısı örneğini dahil ettikleri çalışmada ön ekstraksiyon işlemi sonrası gram pozitif bakteriler için %85.4 ve gram negatif bakteriler için ise %92.3 başarı elde edildiğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda eklem sıvısı kültürlerinde ön ekstraksiyon işlemi sonrası gram pozitif bakteriler için %77.3 (17/22) ve gram negatif bakteriler için ise %100 (8/8) tanımlama başarı elde edilmiştir.

Lallemand ve ark.⁽¹⁸⁾, kan kültürü şişelerine inoküle edilen 47 eklem sıvısı ve 66 ezilmiş kemik dokusu örneği ile yaptıkları çalışmada, bir ticari ekstraksiyon kitinin etkinliğini ve MALDI-TOF MS'nin performansını araştırmıştır. Araştırmacılar, bu çalışmada gram negatif basillerin tamamının tür düzeyinde doğru şekilde tanımlandığı; ancak *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinsi bakteriler için ekstraksiyon işleminin sınırlı başarı sağladığını bildirmiştir⁽¹⁸⁾.

Bizim çalışmamızda da ön ekstraksiyon işlemi sonrası tanımlama çalışmalarında *Streptococcus* cinsi bakteriler için sınırlı başarı (tür düzeyinde %27.3; cins düzeyinde %54.5) elde etmiştir. Diğer yandan, çalışmamızda altı *Enterococcus* izolatının beşi (%83.3) ön ekstraksiyon işlemi sonrası doğru şekilde tanımlanmıştır. Ayrıca, bu işlem sonrası önemli bir bakteriyel menenjit etkeni olan *Streptococcus pneumoniae* izolatlarında %75 (3/4) tanımlama başarı elde edilmiş olması bu tür çalışmalar için umut verici bir durum olmuştur.

Morgenthaler ve ark.⁽¹⁹⁾ pozitif kan kültürü şişeleri için bir ticari ekstraksiyon kitinin etkinliğinin incelendiği 21 farklı çalışmanın verilerini irdeledikleri çalışmalarında gram negatif bakterilerde (%89.6) gram pozitif bakterilere (%76.1) göre daha başarılı sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar hücre duvarındaki yapısal farklılıkların ekstraksiyon verimliliğini değiştirmesi ve bazı gram pozitif bakterilerin daha yavaş çoğalması sonucu ekstraksiyonla küçük pelet oluşması gibi nedenlerin bu duruma yol açabileceğini belirtmiştir⁽¹⁹⁾. Bizim çalışmamızda da ön ekstraksiyon işlemi sonrası gram pozitif bakteriler açısından daha sınırlı bir başarı elde edilmiştir. Bu durumun Morgenthaler ve ark.⁽¹⁹⁾'nın çalışmasında bildirilenlere benzer nedenlerden kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda ön ekstraksiyon işlemi etkinliğinin üreme tespit edilen örnek tipi ile ilişkili olup olmadığı irdelenmiştir. Ön ekstraksiyon işlemi sonrası yapılan tanımlama çalışmalarında, her üç steril vücut sıvısı ekilen ve pozitif sinyal alınan kan kültürü şişeleri için tür ($p=0.435$) ve cins ($p=0.362$) düzeyinde tanımlama sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 3). Diğer yandan, steril vücut sıvılarının biyokimyasal içerikleri farklılıklar gösterebilmektedir. Çalışmamızda BOS, plevral sıvı ve eklem sıvısı örneklerinin biyokimyasal değişkenlerinin izolasyon oranı ve ön ekstraksiyon işlemi sonrası tanımlama başarısı üzerine etkisi detaylı olarak incelenmemiştir. Bu durum yaptığımız çalışmanın bir diğer sınırlılığıdır. Bu konuda yapılacak kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada BOS, plevral sıvı ve eklem sıvısı ekilen ve pozitif sinyal alınan kan kültürü şişelerine uygulanan %10 Tween 80 solüsyonu ile ön ekstraksiyon işlemi sonrası MALDI-TOF MS ile hızlı bakteri tanımlamasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu yöntem gram negatif bakteriler için başarılı sonuçlar sağlarken; gram pozitif bakteriler için özellikle tür düzeyinde sınırlı aktivite göstermiştir. Farklı Tween 80 konsantrasyonlarını veya diğer kimyasalları kullanarak yeni yöntemler geliştirmek, Gram-pozitif bakteri tanımlama verimliliğini arttırmanın yararlı bir yolu olabilir. Farklı steril vücut sıvısı örnekleri ile yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma; Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (01.06.2021 tarih ve 2021-06/03 sayı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Cumhuriyet University, Clinical Research Ethics Committee (06.01.2021; 2021-06/03).

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

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

- Davis LE. Acute bacterial meningitis. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2018;24(5, Neuroinfectious Disease):1264-83. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000660>
- Elsissy JG, Liu JN, Wilton PJ, Nwachuku I, Gowd AK, Amin NH. Bacterial septic arthritis of the adult native knee joint: a review. *JBJS Rev*. 2020;8(1):e0059. <https://doi.org/10.2106/JBJS.RVW.19.00059>
- Addala DN, Bedawi EO, Rahman NM. Parapneumonic effusion and empyema. *Clin Chest Med* 2021;42(4):637-47. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.08.001>
- Peri AM, Harris PNA, Paterson DL. Culture-independent detection systems for bloodstream infection. *Clin Microbiol Infect*. 2022;28(2):195-201. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.039>
- Gonzalez MD, Chao T, Pettengill MA. Modern blood culture: Management decisions and method options. *Clin Lab Med*. 2020;40(4):379-92. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2020.07.001>
- Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules*. 2020;25(20):4775. <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>
- Tian Y, Zheng B, Wang B, Lin Y, Li M. Rapid identification and multiple susceptibility testing of pathogens from positive-culture sterile body fluids by a combined MALDI-TOF Mass Spectrometry and Vitek susceptibility system. *Front Microbiol*. 2016;7:523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00523>
- Zengin Canalp H, Bayraktar B. Direct rapid identification from positive blood cultures by MALDI-TOF MS: specific focus on turnaround times. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e0110321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01103-21>
- Fang C, Zhou Z, Li J, Chen X, Zhou M. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures in pediatric patients by MALDI-TOF MS: Sepsityper kit versus short-term subculture. *J Microbiol Methods*. 2020;172:105894. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105894>
- Lin JF, Ge MC, Liu TP, Chang SC, Lu JJ. A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018;51(5):659-65. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.03.005>
- Kuo FC, Chien CC, Lee MS, Wang JW, Lin PC, Lee CH. Rapid diagnosis of periprosthetic joint infection from synovial fluid in blood culture bottles by direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2020;15(9):e0239290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239290>
- Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: Methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol*. 2017;55(12):3328-38. <https://doi.org/10.1128/JCM.00868-17>
- Süzük Yıldız S, Evren E, Hekimoğlu CH, et al. "In-House" Tween® 80 yöntemi ile pozitif kan kültürlerinden mikroorganizmaların MALDI-TOF MS yöntemi ile doğrudan tanımlanması: Deneysel ve klinik çalışma. *Mikrobiyol Bul*. 2020;54(4):523-34. <https://doi.org/10.5578/mb.69849>
- Leli C, Cenci E, Cardaccia A, et al. Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(4):205-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.03.002>
- Bishop B, Geffen Y, Plaut A, et al. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid bacterial identification in patients with smear-positive bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(2):171-4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.014>
- Luethy PM, Johnson JK. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification of pathogens causing sepsis. *J Appl Lab Med*. 2019;3(4):675-85. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027318>

17. Tadros M, Petrich A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper Kit™ for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian pediatric hospital. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2013;24(4):191-4.
<https://doi.org/10.1155/2013/701093>
18. Lallemand E, Arvieux C, Coiffier G, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry after liquid enrichment (BD Bactec™) for rapid diagnosis of bone and joint infections. *Res Microbiol.* 2017;168(2):122-9.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.09.005>
19. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: Review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *Int J Microbiol* 2015;2015:827416.
<https://doi.org/10.1155/2015/827416>