T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

KAN KÜLTÜRÜNDEN MATRİKS DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON İYONİZASYON UÇUŞ SÜRESİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (MALDI-TOF MS) İLE DİREKT HIZLI TANIMLAMA

Dr. Hazan Zengin Canalp

İSTANBUL/2021

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

KAN KÜLTÜRÜNDEN MATRİKS DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON İYONİZASYON UÇUŞ SÜRESİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (MALDI-TOF MS) İLE DİREKT HIZLI TANIMLAMA

Dr. Hazan Zengin Canalp

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu Bayraktar

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince kıymetli bilgi birikimi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren, yardımlarıyla destek olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Banu Bayraktar'a,

Bilgi ve tecrübelerini paylaşarak uzmanlık eğitimimde emeği geçen değerli hocam Doç. Dr. Elif Aktaş'a,

Tez çalışmamın yürütülme aşamasında emeğini ve yardımlarını esirgemeyen Biyolog Ebru Akağaç'a,

Tez çalışmalarım süresince istatistiksel analizlere rehberlik yaparak katkı sağlayan biricik kardeşim Gizem Zengin'e,

Uzmanlık eğitimim süresince sağladıkları katkılardan dolayı Dr. Emin Bulut, Dr. Murat Öcal, Dr. Ayşe Barış ve Dr. Süleyman Pelit'e,

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım değerli asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışma ekibine,

Hayatım boyunca sonsuz desteklerini hissettiğim kıymetli aileme ve daima yanımda olan sevgili eşim Derviş Canalp'e çok teşekkür ederim.

Dr. Hazan Zengin Canalp

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER 1
SİMGELER VE KISALTMALAR ii
TABLOLAR iii
ŞEKİLLER iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
GİRİŞ ve AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER 3
KAN DOLAŞIMI ENFEKSİYONLARI 3
KAN KÜLTÜRÜ 3
Set Kavramı 3
Kan Kültürü Örneklerinin Alınması 3
Otomatize Kan Kültürü Sistemleri ile İnkübasyon 4
KAN KÜLTÜRÜNDE LABORATUVAR TANI 6
Direkt Mikroskopik İnceleme 6
Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Agar Besiyerine Pasaj 6
Biyokimyasal Testler ve Manuel Tanımlama Sistemleri 6
Otomatize Tanımlama Sistemleri 7
Kütle Spektrometrisine Dayalı Tanımlama Sistemleri 8
Moleküler Tanımlama Sistemleri 10

Kan Kültürü Şişesinden Doğrudan Tanımlama 10
Kan Kültüründe Sonuç Verme Süreleri 11
GEREÇ ve YÖNTEMLER 12
ÇALIŞMAYA ALINAN NUMUNELER 12
KAN KÜLTÜRÜ SİSTEMİ 12
BACTEC FX Sistemi 12
Kan Kültürü Şişeleri 13
Kan Kültürü Setleri 14
MATRİKS DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON İYONİZASYON UÇUŞ SÜRESİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ SİSTEMİ 15
KAN KÜLTÜRÜNDE RUTİN UYGULAMALAR VE TANIMLAMA . 16
Kan Kültüründe Rutin İşleyiş Prosedürü 16
Kısa İnkübasyon Süreli Rutin Tanımlama 16
KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞESİNDEN HIZLI TANIMLAMA 17
VERİLERİN İŞLENMESİ 20
SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 20
İSTATİSTİKSEL ANALİZ 21
BULGULAR 22
NUMUNE ÖZELLİKLERİ 22
RUTİN TANIMLAMA SONUÇLARI 22
Gram Negatif Bakterilerde Rutin Tanımlama Sonuçları 23
Gram Pozitif Bakterilerde Rutin Tanımlama Sonuçları 25
HIZLI TANIMLAMA SONUÇLARI 26
Gram Negatif Bakterilerde Hızlı Tanımlama Sonuçları 28
Gram Pozitif Bakterilerde Hızlı Tanımlama Sonuçları 29
POLİMİKROBİYAL KAN KÜLTÜRLERİ 32

SONUÇ VERME SÜRELERİ..... 33
TARTIŞMA 35
SONUÇLAR 49
KAYNAKLAR..... 50

SİMGELER VE KISALTMALAR

° C: Santigrat Derece

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

BD: Becton Dickinson and Company

CTX-M: Cefotaximase—Munich

DNA: Deoksiribonükleik asit

FISH: Fluorescence In Situ Hybridisation

IMP: Imipenem hydrolyzing beta-lactamase

KKA: Koyun Kanlı Agar

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

MBT: MALDI Biotyper

NDM: New Delhi Metallo-beta-lactamase

OXA: Oxacillin-hydrolyzing beta-lactamases

PNA FISH: Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridisation

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RUO: Research use only

SST: Serum Seperator Tube

VIM: Verona Integron-Mediated Metallo-beta-lactamase

TABLOLAR

Tablo 1. Gram negatif bakterilerde rutin tanımlama sonuçları..... 24

Tablo 2. Gram pozitif bakterilerde rutin tanımlama sonuçları 25

Tablo 3. Hızlı tanımlamada skor eşik değerlerine göre cins ve tür düzeyinde doğru tanımlama oranları 27

Tablo 4. Gram negatif bakterilerde hızlı tanımlama sonuçları 29

Tablo 5. Gram pozitif bakterilerde hızlı tanımlama sonuçları..... 30

Tablo 6. Hızlı yöntemle cins düzeyinde doğru tanımlanan izolatların rutin tanımlama sonuçlarıyla karşılaştırması 31

Tablo 7. Polimikrobiyal kan kültürlerinin hızlı tanımlama sonuçları 32

Tablo 8. Hızlı ve rutin tanımlama yöntemlerinde sinyal grubuna göre saat cinsinden ortalama sonuç verme süreleri 33

ŞEKİLLER

Şekil 1. BACTEC FX kan kültürü sistemi 13
Şekil 2. Erişkin kan kültürü seti: BD BACTEC Plus Aerobic/F ve Anaerobic/F kan kültürü şişeleri 15
Şekil 3. Rutin ve hızlı tanımlama yöntemlerinin akış diyagramı 19
Şekil 4. Kan kültüründe üreyen mikroorganizmaların dağılımı 23
Şekil 5. Rutin tanımlama yöntemiyle MALDI Biotyper'da 2.422 skorla tanımlanan *Escherichia coli* kütle spektrumu grafiği 24
Şekil 6. Pozitif sinyal alınan örneklerin hızlı tanımlama sonuçları 26
Şekil 7. Hızlı yöntem ile MALDI Biotyper'da 2.328 skorla tanımlanan *Escherichia coli* kütle spektrumu grafiği 28
Şekil 8. Gece ve gündüz sinyal gruplarında Gram boyanma özelliklerine göre hızlı ve rutin tanımlama yöntemleriyle ortalama sonuç verme sürelerinin dağılımı . 34

KAN KÜLTÜRÜNDEN MATRİKS DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON İYONİZASYON UÇUŞ SÜRESİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (MALDI-TOF MS) İLE DİREKT HIZLI TANIMLAMA

ÖZET

Amaç: Kan dolaşımı enfeksiyonlarında etkenin hızlı tanımlanması, hasta tedavi yönetiminde kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlamanın uygulanabilirliği, doğruluğu ve kısa inkübasyon süreli rutin tanımlamaya göre sonuç verme süresine olan katkısının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya BACTEC FX (Becton Dickinson) sistemiyle pozitif sinyal alınan 328 kan kültürü dahil edildi. Her hasta için eş zamanlı alınan kan örneklerinden yalnızca ilk üreme olan şişe çalışmaya alındı. Tüm örneklerden Gram boyama, koyun kanlı agar (KKA) ve çikolata agara ekim yapıldı. Kısa inkübasyon süreli rutin yöntemde agar plaklarda görülen üremeler; hızlı yöntemde ise kan kültürü şişelerinden serum seperatör tüp (BD Vacutainer SSTII Advance) kullanılarak hazırlanan pelletler MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) ile tanımlandı. Hızlı tanımlama sonuçlarının rutin ile uyumu değerlendirildi. Hızlı ve rutin yöntemle elde edilen sonuç verme süreleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Kısa inkübasyon süreli rutin yöntemle tüm izolatlar tür düzeyinde doğru olarak tanımlandı. Hızlı tanımlama yöntemiyle 310 monomikrobiyal örneğin 295'inde (%95.2) sonuç elde edilirken; 15'inde (%4.8) sonuç elde edilemedi. 295 örnekten; 289'u (%97.9) tür düzeyinde doğru, 4'ü (%1.4) cins düzeyinde doğru, 2'si (%0.7) yanlış tanımlandı. Hızlı tanımlamada 1.2, 1.3, 1.4 ve 1.5 skor eşik değerlerinde tür düzeyinde doğru tanımlama oranları sırasıyla; %97.9, %98.9, %99.3 ve %100 olarak bulundu. Gündüz sinyal grubunda ortalama sonuç verme süresi, hızlı tanımlamada (Ort:2.86; %95 GA:2.65-3.07) rutin tanımlamaya (Ort:19.49; %95 GA: 18.08-20.89) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi (p<0.001).

Sonuç: Çalışmamızda ek donanım gerektirmeyen ve kolay uygulanan hızlı tanımlama yöntemiyle, %93.2 oranında tür düzeyinde doğru sonuçlar alınmıştır. Hızlı tanımlama ile gündüz sinyal grubunda ortalama sonuç verme süresi, kısa inkübasyon süreli rutin tanımlamaya göre 16.6 saat kadar kısaltılmıştır. Bu yöntemle sonuç verme süresinin iyileştirilmesinin hasta yönetimine olumlu katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kan kültürü, MALDI-TOF, BACTEC, bakteri, hızlı tanımlama

DIRECT RAPID IDENTIFICATION OF BLOOD CULTURES BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY (MALDI-TOF MS)

ABSTRACT

Aim: Rapid pathogen identification in bloodstream infections is critical in the management of patients' treatment. This study investigates the accuracy and feasibility of direct identification from positive blood cultures by MALDI-TOF MS and its impact on the turnaround time compared to the short-term incubation routine identification method.

Materials and Methods: We included 328 positive blood cultures worked on BACTEC FX (Becton Dickinson) system in this study. Only the first positive signaling bottle of the blood samples taken simultaneously for each patient was taken to the study. Gram staining, subcultures on blood agar and chocolate agar were performed from all samples. Pellets prepared from the blood culture medium using a serum separator tube (BD Vacutainer SSTII Advance) in the rapid method; and growing colonies on agar plates in the short-term incubation routine method were identified with MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). Concordance of rapid identification results with routine was evaluated. The turnaround time for rapid and routine identification was compared.

Results: All isolates were correctly identified at the species level by the routine method. Of the 310 monomicrobial samples, 295 (95.2%) could give a result with the rapid identification method; 15 (4.8%) could not. Of 295 samples, 289 (97.9%) were identified correctly at the species level; 4(1.4%) were at the genus level and 2(0.7%) were misidentified. In rapid identification; at 1.2, 1.3, 1.4 and 1.5 score cut-off values, rates of correct identifications at species level were 97.9%, 98.9%, 99.3% and 100% respectively. The mean turnaround time in the daytime signal group was significantly lower (p<0.001) in rapid identification (Mean: 2.86; 95% CI: 2.65-3.07) comparing to routine identification (Mean: 19.49; 95% CI: 18.08-20.89).

Conclusion: In our study, with the rapid identification method that does not require any additional equipment and is easy to apply, 93.2% of correct identification

results were obtained at the species level. In the daytime signal group, the mean turnaround time was shortened by 16.6 hours with a rapid method comparing to the routine method. We concluded turnaround time was remarkably improved by a rapid identification method that might contribute positively to patient management.

Keywords: blood culture, MALDI-TOF, BACTEC, bacteria, rapid identification

GİRİŞ ve AMAÇ

Kan dolaşımı enfeksiyonları tüm dünyada ciddi mortalite ve morbidite ile seyreden enfeksiyonlar olup, kan kültüründeki bakteriyel tanımlamanın hızlandırılmasıyla, hastanede kalış süresi ve mortalite riski azalmaktadır [1].

Kan kültürü, kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında altın standarttır. Kan kültürü şişesinde üreme sinyali alındıktan sonra etkenin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması, katı besiyerine yapılan pasajda 18-24 saatlik inkübasyonu takiben kolonilerin üremesine dayanır. Otomatize sistemlerle tanımlama bakteri türüne göre değişmekle birlikte genellikle 24-48 saat sürmektedir [2]–[4]. Agar plaklarda üreyen koloniden tanımlama yapabilen Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile kesin tanımlama dakikalar içerisinde sonuçlansa da; şişeden pozitif sinyal alınmasından, kesin tanımlamaya kadar geçen süre 24 saati aşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda katı besiyerindeki inkübasyon süresi kısaltılarak, MALDI-TOF MS ile bakteriler daha erken zamanda güvenilir şekilde tanımlanmıştır [5]–[7].

Hasta tedavisinde kritik olan erken aşamada kan kültüründeki bakteriyel patojenin hızlı bir şekilde tanımlanması, etkili antimikrobiyal yönetim programının desteklenmesinde ve hasta yönetiminde çok değerlidir [1]. Kan kültüründe rutin tanımlamada inkübasyon süresi kısaltılarak konvansiyonel tanımlamaya göre süreç hızlandırılabilse de aynı gün içerisinde sonuç verilebilmesi hedefini tam olarak karşılayamamaktadır.

Kan kültüründe üreyen patojenin aynı gün içerisinde hızlı tanımlanması için geliştirilen çeşitli moleküler yöntemler mevcuttur [8]–[11]. Yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren bu yöntemler ile tanımlanabilen patojenler kit içeriğindeki türlerle sınırlı olup, cihaz ve kit maliyetlerinin yüksek olması rutinde kullanımlarını kısıtlamaktadır [12], [13].

Bu kısıtlılıkları aşabilen MALDI-TOF MS sistemiyle pozitif kan kültürü şişesinden direkt mikroorganizma tanımlama işlemi, "in-house" yöntemlerle sistem yazılımında değişiklik yapılmaksızın veya bu amaçla geliştirilen ticari kitler ve yazılım modülüyle uygulanabilmektedir [12]–[14]. Pozitif kan kültürü şişesinden

çeşitli serum seperatör tüpler kullanarak elde edilen çökeltiden MALDI-TOF MS sistemiyle bakterilerin %90'ın üzerinde doğru tanımlanabildiği gösterilmiştir [15], [16].

Kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama üzerine daha önce yapılan çalışmalarda sonuç verme süreleri, 18-24 saatlik inkübasyon yöntemiyle karşılaştırılmış olup kısa inkübasyon süreli rutin yöntemle karşılaştırılmasına dair veri bulunmamaktadır [2], [17].

Bu çalışmada pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama yönteminin pratikte uygulanabilirliği, doğruluğu ve kısa inkübasyon süreli rutin yönteme göre sonuç verme süresine katkısının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

KAN DOLAŞIMI ENFEKSİYONLARI

Kan dolaşımı enfeksiyonları, kan dolaşımında canlı mikroorganizmaların var olması ile tanımlanan enfeksiyon hastalıklarıdır. Kan dolaşımı enfeksiyonuna sebep olan patojenin belirlenmesi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının önde gelen acil görevlerinden olup, hastanın tanı ve prognozunda son derece değerlidir.

Kan dolaşımı sisteminde canlı bakteri bulunması durumu bakteriyemi; mantar bulunması durumu ise fungemi olarak tanımlanır. Bakteriyemi tanısı kan kültüründe üreme ile koyulur ancak kan kültüründe üreme saptanması her zaman bir enfeksiyonun varlığını göstermez.

Kan kültüründe bir veya birden fazla bakteri türünün izole edilmesi durumu sırasıyla monomikrobiyal ve polimikrobiyal bakteriyemi olarak isimlendirilir.

KAN KÜLTÜRÜ

Enfeksiyon etkeninin kandan izole edilmesine olanak sağlayan kan kültürü, kan dolaşımı enfeksiyonları tanısında altın standarttır.

Set Kavramı

"Bir kan kültürü seti" kavramı tek bir damar girişimi ile alınan kanın kan kültürü şişelerine dağıtılmasını ifade eder [18]. Erişkin hastalarda ideal bir kan kültürü seti aerobik ve anaerobik olmak üzere iki kan kültürü şişesi içermelidir.

Kan Kültürü Örneklerinin Alınması

Kan kültürü, mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen en değerli örneklerden biri olup enfeksiyon etkeninin izole edilebilmesi için, kan kültürü doğru şekilde

alındıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilerek en geç iki saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Preanalitik aşamadaki hataları en aza indirebilmek için ilgili sağlık çalışanına, ideal kan kültürü alınma zamanı, set sayısı, alınacak kan miktarı ve doğru kan kültürü alma tekniği konusunda eğitim verilmelidir.

Hastadan alınacak kan kültürü set sayısı ve kanın alınma zamanı hastanın klinik durumuna göre değişebilmekle birlikte ideal koşullarda yetişkinlerde klinik gereklilik görüldüğü durumlarda, en kısa sürede, eş zamanlı, en az iki set kan kültürü alınması önerilmektedir. Her kan kültürü seti için alınması gereken ideal kan hacmi erişkin hastalar için 20 mililitredir. Pediyatrik hastalarda alınacak set sayısı ve kan hacmi hastanın vücut ağırlığına göre belirlenir [18].

Kan dolaşımında mikroorganizma olmamasına rağmen kan kültüründe üreme olması durumu kontaminasyon olarak tanımlanır [18]. Kontaminant bakteriler sıklıkla cilt florası elemanlarından (Koagülaz Negatif Stafilokoklar, Viridans Grup Streptokoklar, *B.anthracis* dışındaki *Bacillus spp., Corynebacterium spp., Propionibacterium spp., Aerococcus spp., Micrococcus spp.*) oluşmaktadır, bu durum genellikle kan kültürü alınmasıdan önce yapılan cilt antisepsisindeki yetersizlikten kaynaklanmaktadır [19] .

Cilt antisepsisi için erişkinlerde standart olarak %70'lik alkol ile temizliğin ardından 30 saniye %2 klorheksidin glukonat veya 1-2 dakika %1-2'lik iyod tentürü (ya da %10 povidon iyodin) kullanılması önerilir. İyotlu antiseptik kullanıldıysa kan alma işlemi tamamlandıktan sonra ciltten uzaklaştırılmalıdır. İki aydan küçük çocuklarda klorheksidin kullanılması önerilmemektedir [19].

Otomatize Kan Kültürü Sistemleri ile İnkübasyon

Günümüzde kan kültürü şişelerinin inkübasyonu ve mikroorganizma üremesinin takibinde yaygın olarak sürekli monitörize otomatize kan kültürü sistemleri kullanılmaktadır. Piyasada klinik olarak kullanımı onaylanmış BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, ABD), BacT/Alert (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve VersaTREK (Thermo Scientific, Kansas, ABD) olmak üzere üç ticari sistem mevcuttur [20]. Bu sistemlerin her biri, değişen modül kapasitelerine sahip inkübatör

bir cihaz ve bu cihaza uyumlu üretilmiş olan kan kültürü şişeleri ile çalışmaktadır. Alınan kan kültürü örnekleri inkübatör cihaza yüklendikten sonra farklı üreme saptama mekanizmalarıyla belirli aralıklarla otomatize ölçümler yapılarak takip edilir.

BACTEC sisteminde, BD BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, ABD) aerobik ve anaerobik kan kültürü şişelerinin alt kısmında, ortamda CO_2 varlığında asidifikasyona bağlı olarak floresan ışığı veren florometrik sensörler bulunur. Şişelerin üst boşlukları ise aerobik şişeler için CO_2, anaerobik şişeler için CO_2 ve N_2 ile desteklenen ortam havasından oluşur. BACTEC sisteminde kan kültürü şişesinden kaynaklanan floresans artışı, cihaz tarafından her on dakikada bir izlenerek CO_2 artış hızı ve miktarı analiz edilir. Bu analizler önceden programlanmış pozitiflik parametrelerine göre sistem tarafından yorumlanarak, üreme bulgusu olduğunda pozitif sinyal verir [21].

BacT/Alert (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sisteminde, BacT/Alert aerobik ve anaerobik kan kültürü şişelerinin alt kısmında kolorimetrik karbondioksit sensörleri bulunur. Cihaz tarafından on dakikada bir ölçüm yapılarak, kan kültürü şişesindeki artan CO_2 seviyesine bağlı olarak düşen pH'nın meydana getirdiği kolorimetrik değişiklik izlenir. BacT/Alert sisteminde her şişedeki zamana karşı değişen CO_2 oranı analiz edilerek mikroorganizma üremesi saptanır [22].

VersaTREK (Thermo Scientific, Kansas, ABD) sisteminde, VersaTREK REDOX 1 (aerobik) ve REDOX 2 (anaerobik) kan kültürü şişelerindeki gaz basınçlarında (karbondioksit, nitrojen, oksijen ve hidrojen) oluşan değişiklikler (gaz üretim veya tüketimi) manometrik olarak ölçülerek takip edilir [20]. Cihaz algoritmalarına göre şişelerdeki basıncın zamana karşı değişimi yorumlanarak mikroorganizma üremesi saptanır.

Kan dolaşımı enfeksiyonları tanısında kan kültüründen otomatize sistemlerle etken mikroorganizmaların saptanması için belirlenen standart inkübasyon süresi beş gündür [18], [19].

KAN KÜLTÜRÜNDE LABORATUVAR TANI

Kan kültürü şişesinde inkübasyon sürecinde pozitif sinyal alındıktan sonra şişe cihazdan en kısa süre içerisinde çıkarılarak direkt mikroskobik inceleme için preparat hazırlanmalı ve katı besiyerlerine ekim yapılarak uygun şartlarda inkübe edilmelidir.

Direkt Mikroskopik İnceleme

Kan kültüründe direkt mikroskobik inceleme, pozitif sinyal alınan kan kültürü şişesinden 1-2 damla numunenin lama damlatılması ile hazırlanan ince yaymanın Gram boyanarak incelenmesidir. Gram boyama pozitif sinyal alınan kan kültüründen yapılacak ilk ve en etkili işlemdir [20]. Yapılan çalışmalarda Gram boyama sonucunun hızlandırılmasıyla mortalitenin azalması ilişkilendirilmiştir [23], [24]. Bu yüzden mümkün olan en kısa sürede Gram boyama yapılarak değerlendirme sonucu kliniğe bildirilmelidir.

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Agar Besiyerine Pasaj

Pozitif sinyal alınan tüm şişelerden genel amaçlı besiyeri olarak %5 KKA ve zengin besiyeri olarak çikolata agara ekim yapılarak 35-37ºC'de %5 CO_2'li ortamda inkübasyona alınır [25]. Gram boyama değerlendirme sonucuna göre Gram negatifler için seçici besiyeri olarak MacConkey agar veya Eozin-metilen mavisi agar; mantarlar için Sabouraud dekstroz agar eklenerek normal atmosfer koşullarında 35-37ºC'de inkübe edilir. Anaerobik kan kültürü şişesinden üreme sinyali alındığında ek olarak Schaedler agara ekim yapılarak anaerobik ortamda inkübasyon sağlanır. Plaklar günlük olarak değerlendirilir.

Biyokimyasal Testler ve Manuel Tanımlama Sistemleri

Konvansiyonel olarak Gram pozitiflerde katalaz, koagülaz, pirolidonil-β-naftilamidi (PYR), safrada erime, eskülin hidrolizi; gram negatiflerde oksidaz, indol,

üreaz, glikoz fermentasyonu, aminoasit dekarboksilasyonu gibi biyokimyasal testler kullanılarak koloniden tanımlama yapılabilir.

Belirli mikroorganizma grupları için (Gram pozitif, Gram negatif, nonfermenter, maya, anaerop gibi) bir araya getirilmiş ortak biyokimyasal testleri içeren ticari manuel tanımlama sistemleri geliştirilmiştir. Ticari kitlerden, API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), BBL Crystal (Becton Dickinson, Sparks, ABD) BBL Enterotube II (Becton Dickinson, Heidelberg, Almanya) ve Microbact (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) bu manuel tanımlama sistemlerine örnek olarak verilebilir. Bu testler 35ºC'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirilir.

Otomatize Tanımlama Sistemleri

Günümüzde otomatize sistemler biyokimyasal testleri kullanarak bu tanımlamaları antimikrobiyal duyarlılık testleriyle birlikte eş zamanlı olarak yürütebilmektedir. Bu amaçla piyasada en sık kullanılan üç sistem; Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, ABD), Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve Microscan (Beckman Coulter, Kaliforniya, ABD) otomatize tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık sistemleridir.

i. Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, ABD)

Phoenix sisteminde tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testlerini tek yerde birleştiren veya ayrı olarak yapabilen paneller kullanılır. Gram negatif çomaklar için tanımlama panelleri; 16 florojenik, 14 fermantasyon, sekiz karbon kaynağı, beş kromojenik ve iki çeşit farklı substrat (üre ve ornitin) olmak üzere toplamda 45 biyokimyasal substrat kullanarak analiz yapar [26]. Gram pozitif koklar için tanımlama paneli olan PMIC-ID (Becton Dickinson, Sparks, ABD), 20 enzimatik substrat, 16 karbonhidrat, yedi karbon kaynağı kullanım testi ile polimiksin B ve kolistine duyarlılık testi içeren 45 kuyucuktan oluşur [26]. Cihaz inkübasyon sırasında 20 dakikalık aralıklarla otomatik olarak redoks ve turbidimetrik okuma yaparak değişiklikleri izler, bulgular sistem tarafından yorumlanarak 2-12 saat içerisinde tanımlama sonucu elde edilir [26].

ii. VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa)

VITEK 2 sistemi, floresan ve kolorimetrik tabanlı bir teknoloji kullanarak, plastik tanımlama kartlarının mikro çukurlarında bakteri üremesini ve metabolik değişiklikleri tespit eder. Gram negatif tanımlama yapan VITEK 2 ID-GNB (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kartları, 18 enzimatik test, 18 fermantasyon testi, iki dekarboksilaz testi ve üç farklı çeşit test dahil olmak üzere toplam 41 floresan biyokimyasal test sonucunu 3 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra veri tabanı tarafından yorumlayarak tanımlama verir [27].

Gram pozitiflerde tanımlama yapan VITEK 2 GP ID (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kartları 43 kolorimetrik substrat içerir. Kartlar 8 saatlik inkübasyon süresince cihaz tarafından her 15 dakikada bir optik olarak taranarak okunur ve sistem veri tabanında yorumlanarak tanımlama sonucu verilir [26].

iii. Microscan Walkaway (Beckman Coulter, Kaliforniya, ABD)

Microscan Walkaway sistemi mikrotitre kuyucukları içeren paneller ile çalışır. İnokule edilen panellerde tanımlama prensibi florojenik ve florometrik reaksiyonlara dayanır [26]. Florojenik reaksiyonlarda bakteriye ait spesifik enzim varlığında floresan bileşiği parçalanarak florорfor serbest kalır ve floresans açığa çıkar. Florometrik reaksiyonlar pH değişikliklerini tespit eder. Ortamda asit artışı pH'nın düşmesine ve floresansta azalmaya neden olur. Fenotipik olarak benzer türler florofor salınım oranlarının ölçümüyle ayrılır. Kolorimetrik optik sistem her okuma döngüsünde altı farklı dalga boyunda okuma yaparak her kuyucukta meydana gelen reaksiyonu en iyi ayırt eden dalga boyunu seçer [26]. Paneller 35°C'de 15-18 saat inkübasyonun ardından görsel olarak veya otomatik okuyucu tarafından okunarak yorumlanabilir. Sistem aynı panelde eş zamanlı mikrodilüsyon ile antimikrobiyal duyarlılık testine de olanak sağlar.

Kütle Spektrometrisine Dayalı Tanımlama Sistemleri

Mikroorganizmaların tanımlanmasında son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarında gittikçe artan şekilde kullanıma giren bir diğer sistem olan MALDI-

TOF MS, bakteri ve mantarların tanımlanmasında basit, hızlı, güvenilir ve yüksek verimli bir yöntem olarak uygulanmaktadır [28]–[31]. MALDI-TOF MS sistemi, mikroorganizmalar arasında farklılaşan cins ve türlere özgü proteomik parmak izi pik kalıplarını saptayarak tanımlama yapmaktadır [31]. MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlama yapılmak istenen koloni bir hedef plağa yayılarak, önce hücre duvarının parçalanması için formik asit, ardından analitin iyonize hale gelmesi için matriks solüsyonu ile muamele edildikten sonra cihaza yerleştirilir ve lazer atışlarına maruz bırakılarak analiz edilir.

Matriks, analiz edilen örneğe ait moleküllerin iyonizasyonu için gerekli enerjiyi lazer ışığından örnek moleküllerine aktaran bir aracı olarak işlev görür. Lazer atışları mikroorganizma-matriks kompleksinde mikro patlamalar meydana getirerek protein, şeker, peptid gibi biyomoleküller ve polimer, dendrimer, makromolekül gibi büyük organik moleküllerin iyonizasyonunu sağlar. Cihaz içindeki elektrot sayesinde elektrostatik bir alana (yaklaşık 20 kV'luk bir potansiyel tarafından yaratılan) maruz kalan iyonize moleküller dedektöre ulaşana kadar yüksek vakumlu uçuş tüpüne doğru hızlandırılır. İyonların dedektöre ulaşması için gereken uçuş süreleri (TOF), kütleleriyle ters orantılıdır. Biyoanalitin kütlesine ve yüküne bağlı olarak dedektöre farklı zamanda çarpmaları ile kaydedilen sinyaller, belirli bir tür mikroorganizmaya ait proteinler için benzersiz olan ve genellikle 2 ila 20 kDa arasında değişen tepelerden oluşan kütle spektrum profillerini meydana getirir. MALDI-TOF MS sisteminde analiz edilen spektrumlar daha önceden standart olarak belirlenmiş bilinen mikroorganizmaların protein profillerinden oluşan veri tabanıyla karşılaştırılarak cins ve tür düzeyinde tanımlama sonucu elde edilir. Bu nedenle MALDI TOF-MS sistemlerinin veri tabanında mevcut tanımlanabilen mikroorganizma sayısı cins ve tür düzeyinde tanımlamada belirleyicidir [32].

Ülkemizde ticari olarak temin edilebilen iki MALDI-TOF MS sistemi vardır: MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ve VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa). Tanımlama sonucunun cins ve tür düzeyinde güvenilirliği MALDI Biotyper sisteminde bir skor değeriyle ifade edilirken; VITEK MS sisteminde yüzde değeri ile belirlenir [32].

Günümüzde MALDI-TOF MS sistemi ile koloniden tanımlamanın dışında çeşitli yöntemlerle direkt örnekten (kan kültürü ve idrar) tanımlama yapılabildiği de

gösterilmiştir [31]. Aynı zamanda bakterilerde antibiyotik direnç mekanizmalarının doğrudan saptanması ve sekans tiplerinin belirlenmesinde de kullanılan MALDI-TOF MS, mikrobiyoloji laboratuvarlarında gelecek vaat eden bir yöntemdir [30], [31], [33].

Moleküler Tanımlama Sistemleri

Moleküler yöntemler direkt klinik materyalden veya kültürden mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılabilen güvenilir testler olup, aynı zamanda antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması ve epidemiyolojik açıdan suş tiplendirmek amacıyla da kullanılabilir [26]. Moleküler yöntemlerin duyarlılığı diğer yöntemlere göre daha yüksektir fakat deneyimli çalışan, yüksek maliyetli cihaz ve kit gereksinimlerinden dolayı rutinde kullanımları kısıtlıdır. Çoğunlukla gerekli alt yapıya sahip laboratuvarlarda araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Kan kültüründen mikroorganizmaların direkt olarak tanımlanmasında kullanılan, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), multipleks PZR, DNA mikro dizileme ve peptit nükleik asit floresan in situ hibridizasyonu (PNA FISH) gibi farklı moleküler yöntemler mevcuttur [9], [34], [35]. Bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü çok iyi olsa da tanıda kullanımı kit içerisine dahil edilen problar (oligonükleotid ve PNA) ile sınırlıdır [35].

Kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında kültür dışında tam kandan mikroorganizma tespiti için geliştirilen moleküler yöntemler de mevcuttur. (SeptiFast, Roche Diagnostics, Almanya; SepsiTest, Molzym, Almanya) [36], [37]. Sepsis şüpheli hastalarda kültür sonucu beklenmeden, tam kandan çalışma imkanı sunarak tanı süresinin kısaltılmasını amaçlayan bu testlerin özgüllüğü ve yanlış pozitiflikleri kabul edilebilir oranlarda bulunmuş olsa da, duyarlılığının kan kültürüne göre düşük kalması, test maliyetlerinin çok yüksek olması sebebiyle rutin tanıda kullanılmamaktadır [36], [38].

Kan Kültürü Şişesinden Doğrudan Tanımlama

Günümüzde pozitif kan kültüründen tanımlama için onay almış çeşitli multipleks PZR panelleri mevcuttur. Bunlardan FilmArray (BioFire, ABD), ePlex (GenMark Diagnostics, ABD) ve Verigene (Nanosphere, Inc, ABD) sistemleri pozitif

kan kültüründen etkenin tanımlanması ile çeşitli antimikrobiyal direnç genlerinin (CTX-M, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM, *mec*A, *van*A, *van*B gibi) belirlenmesini sağlayabilirken; Accelerate Pheno (Accelerate Diagnostics, ABD) sistemi tanımlamanın yanı sıra fenotipik olarak antimikrobiyal duyarlılık sonuçları da verebilmektedir [39].

Bir diğer yöntem olarak, pozitif kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS sistemiyle etkeni tanımlamak için Sepsityper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ve Rapid BACpro II (Nittobo Medical Co., Tokyo, Japonya) ticari kitleri ve Sepsityper yazılım modülü geliştirilmiştir [12], [14].

Ticari kitlerin dışında "in-house" yöntemlerle otomatize tanımlama sistemleri (Phoenix ve VITEK 2) ve MALDI-TOF MS ile kan kültürü şişesinden doğrudan tanımlama üzerine çalışmalar mevcuttur [15], [16], [40]–[50]. Bu çalışmalarda sonuç verme süreleri yönteme göre değişmekle birlikte konvansiyonel tanımlama yöntemlerinden daha kısa bulunmuştur [2], [17], [51].

Kan Kültüründe Sonuç Verme Süreleri

Kan kültürlerinde etkenin hızlı tanımlanması, hastanede yatış süresinde ve mortalitede azalmayla ilişkili bulunmuştur [1]. Bu nedenle kan kültürü örneklerinde tanımlama sonuçlarının mümkün olan en kısa süre içerisinde verilmesi önemlidir. Kan kültüründe üreme varlığında, Gram boyama ve etken mikroorganizmanın tanımlama sonucu kritik değer olarak kliniğe acilen bildirilmeli ve kayıt altına alınarak raporlanmalıdır [18].

Pozitif sinyal alınan kan kültüründe ilk uygulanacak işlem olan Gram boyama değerlendirme sonucunun bir saat içerisinde raporlanması ve kliniğe kritik değer bildiriminin yapılması gereklidir. Pozitif sinyal alınan kan kültürü şişesinden uygulanan hızlı tanımlama sonuçlarının ise sekiz saat içerisinde verilmesi gerekmektedir [18].

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamız, Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO) kılavuzuna uygun, tek merkezli prospektif ve tanımlayıcı bir çalışma olarak tasarlanmıştır [52].

Bu çalışma, Helsinki Bildirgesi'nde belirtilen uluslararası etik ilkelerine uygun olarak gerçekleştirilmiş olup, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 14.01.2020 tarihli 2631 sayılı karar ile etik kurul onayı (Ek.1) alınmıştır. Çalışma süresince kan kültürlerinin işlenmesi rutin prosedürlere uygun şekilde yapılmaya devam edilmiş olup, bu çalışma ön tedavi kararlarını etkilememiştir.

ÇALIŞMAYA ALINAN NUMUNELER

Bu çalışmaya, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Ekim 2019-Temmuz 2020 tarihleri arasında pozitif üreme sinyali alınan 328 kan kültürü örneği dahil edildi.

Erişkin hastalarda cinsiyet farkı gözetilmeden, pozitif sinyal alınan tüm kan kültürü örnekleri incelendi. Aynı hastadan eşzamanlı alınan kan kültürü şişelerinden sadece ilk pozitif sinyal alınan şişe çalışmaya dahil edildi, eş zamanlı alınan kan kültürü setlerindeki tekrarlayan üremeler çalışmadan dışlandı.

KAN KÜLTÜRÜ SİSTEMİ

BACTEC FX Sistemi

Kan kültürü şişesinden mikroorganizma üremesini saptayan sürekli monitörize otomatize BACTEC FX (Becton Dickinson, Sparks, ABD) sistemi ile kan kültürü

örnekleri çalışıldı. BACTEC FX (Şekil 1) cihazının kanda üreyen mikroorganizmayı saptama mekanizması, kan kültürü şişesinde artan CO_2 seviyesine bağlı olarak düşen pH'nın neden olduğu floresans değişikliğinin tespitine dayanmaktadır. Cihaz tarafından her on dakikada bir floresanstaki artış izlenir, CO_2 artış hızı ve miktarı analiz edilir, önceden programlanmış pozitiflik parametrelerine göre sistem tarafından yorumlanır ve üreme bulgusunda pozitif sinyal verir.



Şekil 1. BACTEC FX kan kültürü sistemi

Kan Kültürü Şişeleri

Mikroorganizmaların üremesi için uygun besiyeri içeren BD BACTEC (Becton Dickinson, Sparks, ABD) kan kültürü şişelerinin alt kısmında, ortamda CO_2 varlığında asidifikasyona bağlı olarak floresan ışığı veren florometrik sensörler bulunur. Şişelerin üst boşlukları ise anaerobik şişeler için CO_2 ve N_2'den, aerobik şişeler için CO_2 ile desteklenen ortam havasından oluşur. Çalışmamızda kullanılan BD BACTEC Plus Aerobic/F ve BD BACTEC Plus Anaerobic/F şişelerinde (Şekil 2) antibiyotik nötralizasyonunu sağlamak için iki farklı reçine bulunur. Katyon değişimli reçineler pozitif yüklü ilaçlara bağlanırken, polimer emici reçineler antimikrobiyal ajanların hidrofobik bölgelerine bağlanarak nötralizasyonu sağlar.

iv. **BD BACTEC Plus Aerobic/F (Becton Dickinson, Sparks, ABD) kan kültürü şişesi besiyeri içeriği:**

- 30 ml İşlenmiş Su
- Soya-Kazein Dijeste Broth %3
- Maya Ekstraktı %0.25
- Amino Asitler %0.05
- Sodyum Polianetolesülfonat (SPS) %0.05
- Vitaminler %0.025
- Antioksidanlar / Redüktanlar %0.005
- İyonik Olmayan Tutucu Reçine %13.4
- Katyonik Değişimli Reçine %0.9

v. **BD BACTEC Plus Anaerobic/F (Becton Dickinson, Sparks, ABD) kan kültürü şişesi besiyeri içeriği:**

- 25 ml İşlenmiş Su
- Soya-Kazein Dijeste Broth %3
- Maya Ekstraktı %0.4
- Hayvan Dokusu Dijeste %0.05
- Amino Asitler %0.25
- Şeker %0.25
- Sodyum Sitrat %0.02
- Sodyum Polianetolesülfonat (SPS) %0.05
- Vitaminler %0.0006
- Antioksidanlar / Redüktanlar %0.16
- İyonik Olmayan Tutucu Reçine %16
- Katyonik Değişimli Reçine %1

Kan Kültürü Setleri

"Bir kan kültürü seti" kavramı tek bir damar girişimi ile alınan kanın kan kültürü şişelerine dağıtılmasını ifade eder [18]. Erişkin hastalarda ideal bir kan kültürü seti aerobik ve anaerobik olmak üzere iki kan kültürü şişesi içerir.

Çalışmamızda hastanemizin rutin kan kültürü uygulamasında yer alan BD BACTEC Plus Aerobic/F ve BD BACTEC Plus Anaerobic/F kan kültürü şişelerinden oluşan kan kültürü setleri kullanıldı (Şekil 2).

Her kan kültürü seti için alınması gereken optimum kan hacmi erişkin hastalar için 20 mililitredir. Hastanemizde uygulanan kan kültürü uygulama rehberi doğrultusunda erişkin hastalarda akut bakteriyemi ve sepsis şüphesinde en az iki set kan kültürü; kateter varlığında kateterden alınan ek bir set kan kültürü ile birlikte laboratuvarımıza gönderilir.



Şekil 2. Erişkin kan kültürü seti: BD BACTEC Plus Aerobic/F ve Anaerobic/F kan kültürü şişeleri

MATRİKS DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON İYONİZASYON UÇUŞ SÜRESİ KÜTLE SPEKTROMETRİSİ SİSTEMİ

Çalışmamızda tüm tanımlama işlemleri MALDI-TOF MS prensibiyle çalışan MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) cihazı ile paslanmaz çelik hedef plak kullanılarak yapıldı. FlexAnalysis 3.4 yazılımı ile elde edilen, 2.000 - 20.000 Da arasında değişen kütle spektrumları, Bruker Biotyper 3.1 yazılımı ile bakteri ve mayalar için toplamda 471 cins düzeyinde, 2748 tür düzeyinde tanımlama yapılabilen BDAL(RUO) Versiyon 8.0 (DB-7854 MSP) kütüphanesinde analiz edildi.

Üretici önerileri doğrultusunda; 2.0 ve üzerinde elde edilen skor değerleri tür düzeyinde güvenilir; 1.7-1.99 arasındaki skor değerleri cins düzeyinde güvenilir; 1.7'nin altındaki skor değerleri ise güvenilir olmayan tanımlama olarak kabul edildi.

KAN KÜLTÜRÜNDE RUTİN UYGULAMALAR VE TANIMLAMA

Kan Kültüründe Rutin İşleyiş Prosedürü

S.B.Ü. Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kan kültürü numunelerinin kabul edilmesi; inkübasyon cihazına yerleştirilmesi; 5 günlük inkübasyon sürecinde pozitif üreme sinyali alınan şişelerden Gram boya sonucunun panik değer olarak bildirimi ve katı besiyerlerine pasajları 7 gün 24 saat çalışma prensibi ile rutin olarak sürdürüldü. Kan kültürü işlemlerinde dış kalite kontrolü College of American Pathologists (CAP) ile sağlandı.

Üreme olan kan kültürü şişesindeki sıvı besiyerinden %5 KKA'a ekim yapılarak atmosferik hava koşullarında; çikolatalı besiyerine ekim yapılarak %5 CO_2 ortamda 35-37ºC'de inkübasyona alındı. Anaerobik kan kültürü şişesinden üreme sinyali alındığında ek olarak Schaedler besiyerine ekim yapılarak anaerobik ortamda inkübasyonu sağlandı.

Kısa İnkübasyon Süreli Rutin Tanımlama

Rutin laboratuvar uygulamamızda katı besiyerlerine ekilerek aerobik ortamda inkübe edilen petriler saat 09:00 ve 14:00'da olmak üzere günde iki kez kontrol edildi. Gözle görülür yeterli üreme gösteren kültürlerden MALDI -TOF MS ile bakteri tanımlaması yapıldı.

Tanımlama işlemleri MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) cihazı ile paslanmaz çelik hedef plak kullanılarak yapıldı. Katı besiyerinde oluşan üremeler ahşap çubuk yardımıyla alınarak paslanmaz çelik hedef

plakta her örnekten 3 kez yayıldı. Üzerine hücre duvarını parçalayarak protein ektraksiyonunu sağlamak amacıyla 1µl %70 formik asit (Cat no:27001,Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra üzerine analiti iyonize etmek için 1 µl matriks çözeltisi (α-Siyano-4-hidroksisinnamik asit (HCCA), Bruker Daltonics, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Hedef plak kuruduktan sonra MALDI Biotyper (Bruker Biotyper, Bruker Daltonics, Almanya) cihazına yerleştirildi ve analiz edildi. Rutin tanımlama yöntemindeki işleyiş aşamaları Şekil 3'te özetlenmiştir.

KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞESİNDEN HIZLI TANIMLAMA

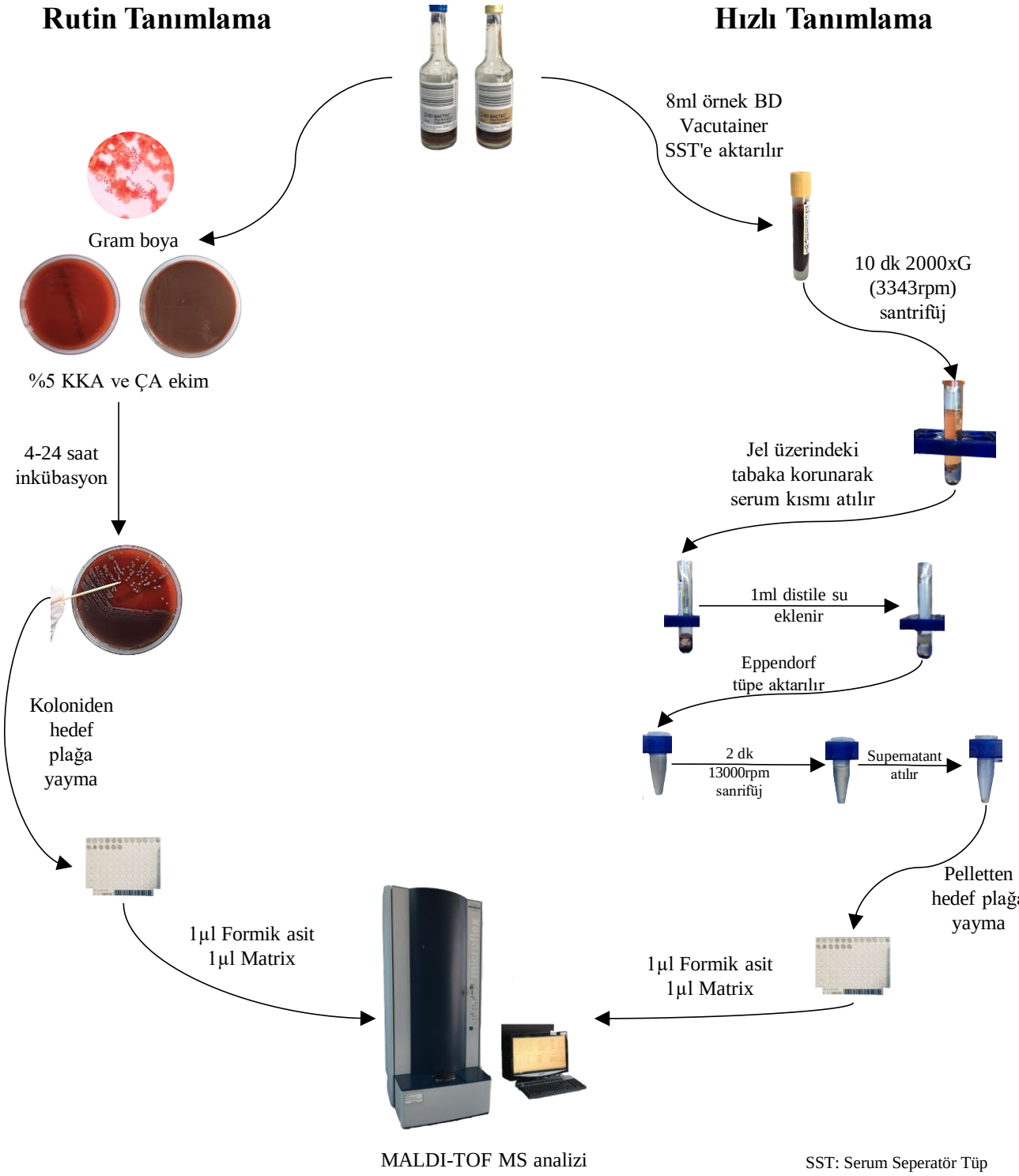
Hastanın ilk üreme sinyali alınan kan kültürü şişesi rutin kültür ekim işlemleri yapıldıktan sonra hızlı tanımlama için işleme alındı. Hızlı tanımlama işlemleri mesai saatleri içerisinde günde iki kez olmak üzere (sabah 11:00, öğleden sonra 16:00, 16:00'dan sonraki örnekler ertesi sabah 11:00'da işleme alınacak şekilde) gerçekleştirildi. Hızlı tanımlama işlemine alınıncaya kadar geçen sürede şişeler oda ısısında bekletildi.

Hızlı tanımlama için Barnini ve ark. daha önce kullanmış olduğu yöntem [16] modifiye edilerek uygulandı. Toplam işlem süresi 20 dakikada tamamlanabilen bu protokolün aşamaları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır:

1. Pozitif sinyal alınan kan kültürü şişesinden 8ml örnek enjektör yardımıyla serum seperatör tüpe (BD Vacutainer SST II Advance, BD Becton Dickinson Belliver Industrial Estate, İngiltere) aktarıldı
2. Tüp 10 dk 2000xG (3343rpm) de santrifüj edildi.
3. Jelin üzerindeki tabaka korunarak serum kısmı atıldı
4. Jel üzerindeki tabakaya 1ml distile su eklenerek çözülmesi sağlandı ve oluşan süspansiyon eppendorf tüpe aktarılarak 2 dk 13000 devirde santrifüj edildi.
5. Supernatant atılarak elde edilen pellet MALDI Biotyper paslanmaz çelik hedef plağa her biri yaklaşık 1µl olacak şekilde 3 kez yayıldı.

6. Kuruduktan sonra hedef plağa protein ektraksiyonunu sağlamak amacıyla 1 µl %70 formik asit (Cat no:27001,Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
7. Son olarak hedef plağa analiti iyonize etmek için 1 µl matriks çözeltisi (α-Siyano-4-hidroksisinnamik asit (HCCA), Bruker Daltonics, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Hedef plak kuruduktan sonra MALDI Biotyper (Bruker Biotyper, Bruker Daltonics, Almanya) cihazına yerleştirilerek analiz gerçekleştirildi. Hızlı tanımlama yönteminde yürütülen aşamalar Şekil 3'te özetlenmiştir.



Şekil 3. Rutin ve hızlı tanımlama yöntemlerinin akış diyagramı

VERİLERİN İŞLENMESİ

Kan kültürü örneklerine ait bilgiler excel dosyasına kaydedildi. Hızlı ve rutin yöntem ile yapılan tanımlama sonuçları, elde edilen MALDI-TOF MS skor değerleri ile birlikte kaydedildi. Otomatize kan kültürü inkübasyon cihazına kan kültürü şişesinin yüklendiği; şişeden üreme sinyalinin alındığı; hızlı yöntem ile tanımlama sonucunun elde edildiği; koloniden yapılan tanımlamanın sonuçlandığı tarih ve saat bilgileri Excel dosyasına kaydedildi.

Kan kültürü cihazına yüklenerek inkübasyon sürecinde hafta içi günlerde 06:00 ile 16:00 saatleri arasında pozitif sinyal alınan örnekler "Gündüz sinyal grubu"; 16:00 ile ertesi gün 06:00 arası pozitif sinyal alınan örnekler ise "Gece sinyal grubu" olarak tanımlandı.

Kan kültürü şişesinde üreme sinyalinin alınmasından hızlı tanımlama sonucunun elde edilmesine kadar geçen süre hesaplanarak hızlı tanımlama yöntemi için sonuç verme süresi elde edildi. Kan kültürü şişesinde üreme sinyalinin alınmasından rutin tanımlama sonucunun elde edilmesine kadar geçen süre hesaplanarak rutin tanımlama yöntemi için sonuç verme süresi elde edildi. Her iki yöntem için sonuç verme süreleri saat cinsinden hesaplandı.

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Her örnek için rutin ve hızlı tanımlamada elde edilen tüm skorlar değerlendirildi. Aynı cins ve tür düzeyinde alınan skorlar içerisinde en yüksek olan skor seçildi. Üretici önerileri doğrultusunda 2.0 ve üzerinde elde edilen skor değerleri tür düzeyinde güvenilir; 1.7-1.99 arasındaki skor değerleri cins düzeyinde güvenilir; 1.7'nin altındaki skor değerleri ise güvenilir olmayan tanımlama olarak kabul edildi.

Rutin tanımlama yöntemiyle 2.0 ve üzerinde skor elde edilen sonuçlar, referans tanımlama sonucu olarak kabul edildi. Hızlı tanımlama yöntemi ile skor elde edildiğinde, sonucun referans tanımlama ile uyumu değerlendirildi. Hızlı tanımlama sonucu; referans sonuçla tür düzeyinde uyumluysa, "tür düzeyinde doğru" tanımlama; yalnızca cins düzeyinde uyumluysa "cins düzeyinde doğru"; cins ve tür düzeyinde

uyumsuzsa “yanlış” tanımlama olarak kabul edildi. Sonuçların analizinde polimikrobiyal örnekler dışlanarak sadece monobakteriyel örnekler dahil edildi, polimikrobiyal örneklerin sonuçları ayrıca değerlendirildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışma verileri Microsoft Excel programına kaydedildi. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 26.0 for Windows programı kullanıldı. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde; sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum olarak verildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında Paired Sample t-test, veriler normal dağılmadığı durumlarda Wilcoxon testi kullanıldı. Tüm analizler %95 güven aralığında gerçekleştirildi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi $p<0.05$ olarak kabul edildi. Etki büyüklüğü hesaplanmasında Cohen’s *d* formülü kullanıldı; *d* değerinin 0.2’den küçük olması durumunda, küçük; 0.5 olması durumunda orta; 0.8’den büyük olması durumunda ise büyük etki olarak değerlendirildi [53].

BULGULAR

NUMUNE ÖZELLİKLERİ

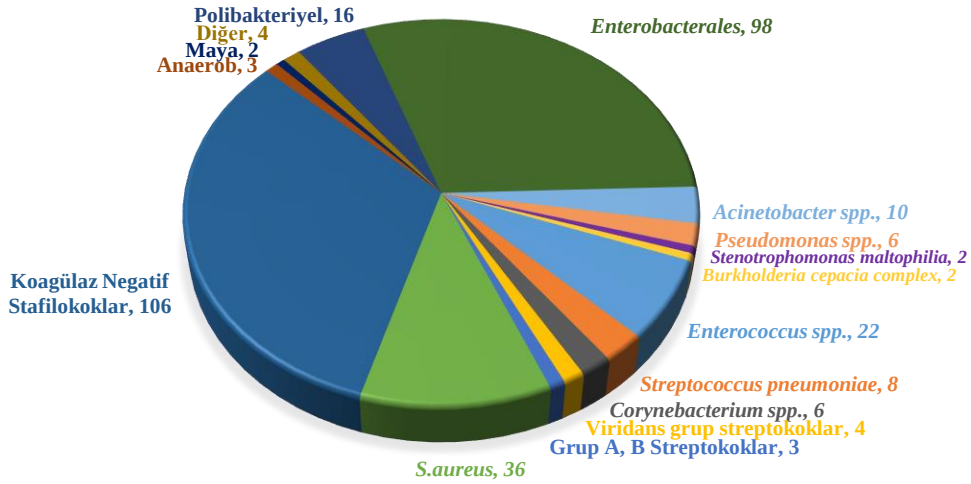
Çalışmamıza, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ekim 2019-Temmuz 2020 tarihleri arasında gönderilen kan kültürü örneklerinden, inkübasyon sürecinde pozitif üreme sinyali alınan toplamda 328 kan kültürü şişesi dahil edildi.

309 tekil hastadan farklı enfeksiyon epizotlarında alınmış olan kan kültürü örneklerini içeren, 231 aerobik kan kültürü şişesi ve 97 anaerobik kan kültürü şişesi prospektif olarak incelendi. Pozitif üreme sinyali alınma zamanına göre; 152 kan kültürü şişesi gündüz sinyal grubunda, 176'sı ise gece sinyal grubunda yer aldı.

Kan kültürü örnekleri incelenen hasta popülasyonunun 130'u (%42.1) kadın, 179'u (%57.9) erkekti. Hastaların yaşları 18 ile 97 arasında olup, yaş ortalaması 67.8 ± 16 olarak belirlendi.

RUTİN TANIMLAMA SONUÇLARI

Çalışmaya dahil edilen 328 kan kültürü örneği; 190 (%57.9) Gram pozitif, 120 (%36.6) Gram negatif, 2 (%0.6) maya olmak üzere 312 monomikrobiyal üreme içerirken; 16 (%4.9) polimikrobiyal üreme oldu. Çalışmaya alınan örneklerden en sık 106 izolatla koagülaz negatif stafilokoklar; ikinci sırada ise 98 izolatla *Enterobacterales* ailesine ait türler izole edildi. İzolatların dağılımı Şekil 4'te gösterilmiştir. Tüm izolatlar rutin tanımlama yönteminde MALDI Biotyper ile 2.0'ın üzerinde skorlarla tanımlandı.



Diğer: *Aeromonas hydrophilia* (n=1), *Brevibacterium ravenspurgense* (n=1), *Granulicatella adiacens* (n=1), *Pseudoglutamicibacter cumminsii* (n=1).

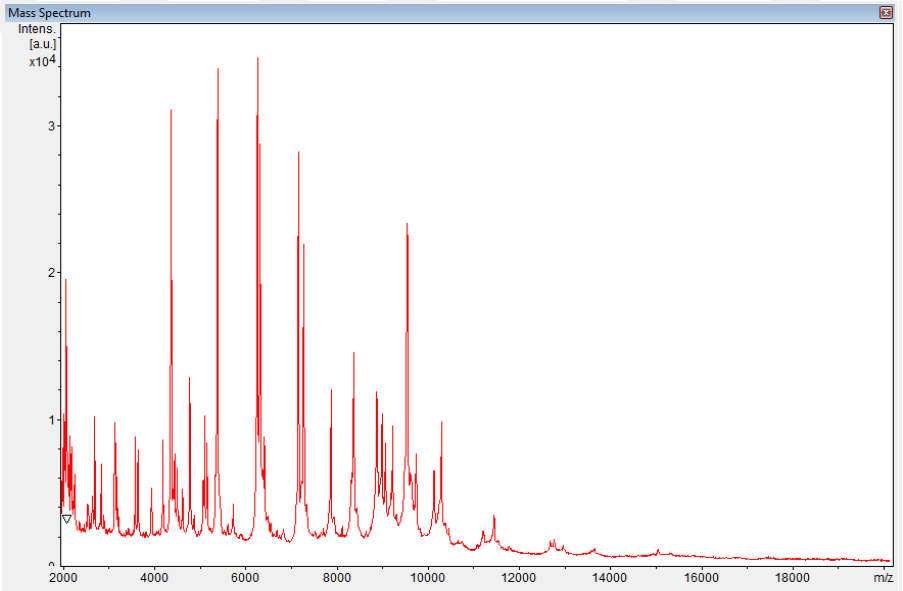
Şekil 4. Kan kültüründe üreyen mikroorganizmaların dağılımı

Gram Negatif Bakterilerde Rutin Tanımlama Sonuçları

Rutin tanımlama ile toplam 120 Gram negatif monomikrobiyal kan kültürü izolatı tür düzeyinde tanımlandı. En sık görülen etkenler sırasıyla *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* idi. MALDI Biotyper ile Gram negatif izolatlardan elde edilen tanımlama skorlarının minimum, maksimum ve ortalama değerlerinin türlere göre dağılımı Tablo 1'de gösterildi. MALDI Biotyper ile rutin tanımlamada elde edilen kütle spektrumuna örnek Şekil 5'te gösterildi.

Tablo 1. Gram negatif bakterilerde rutin tanımlama sonuçları

Bakteri türü		MALDI-TOF MS Skor		
	n (%)	Ortalama	Min	Maks
E.coli	61 (50.8)	2.300	2.000	2.500
K.pneumoniae	28 (23.3)	2.318	2.100	2.530
A.baumannii	10 (8.3)	2.207	2.010	2.400
P.aeruginosa	5 (4.2)	2.216	2.102	2.401
Burkholderia cepacia	2 (1.7)	2.37	2.340	2.400
E.cloacae	2 (1.7)	2.25	2.198	2.302
K.variicola	2 (1.7)	2.350	2.280	2.420
Salmonella spp.	2 (1.7)	2.254	2.206	2.302
Aeromonas hydrophilia	1 (0.8)	2.243		
Bacterodies fragilis	1 (0.8)	2.239		
K.aerogenes	2 (1.7)	2.210	2.020	2.400
P.mirabilis	1 (0.8)	2.408		
S.maltophilia	2 (1.7)	2.285	2.270	2.300
Pseudomonas sp.	1 (0.8)	2.147		
	120	2.290	2.000	2.530



Şekil 5. Rutin tanımlama yöntemiyle MALDI Biotyper'da 2.422 skorla tanımlanan *Escherichia coli* kütle spektrumu grafiği

Gram Pozitif Bakterilerde Rutin Tanımlama Sonuçları

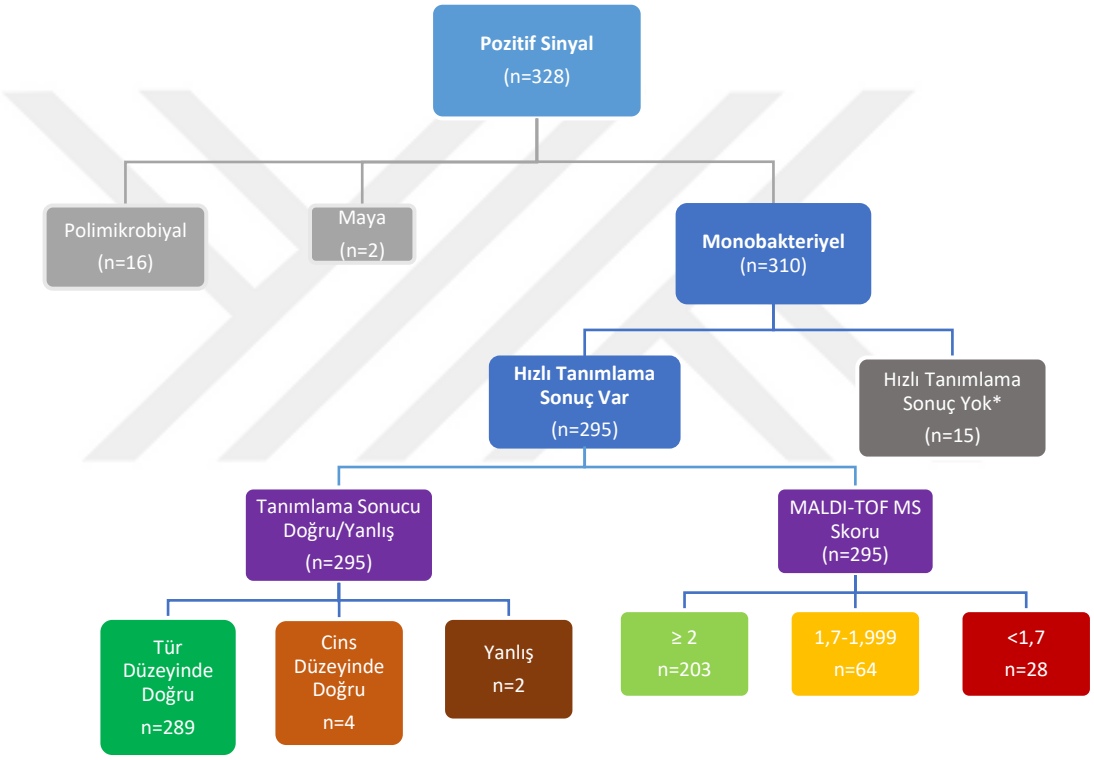
Rutin tanımlama ile toplam 190 Gram pozitif monomikrobiyal kan kültürü izolatı tür düzeyinde tanımlandı. En sık görülen izolatlar sırasıyla *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* ve *Staphylococcus aureus* idi. MALDI Biotyper ile Gram pozitif izolatlardan elde edilen tanımlama skorlarının minimum, maksimum ve ortalama değerlerinin türlere göre dağılımı Tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. Gram pozitif bakterilerde rutin tanımlama sonuçları

Bakteri türü		**MALDI-TOF MS Skor**		
	n (%)	**Ortalama**	**Min**	**Maks**
S.epidermidis	43 (22.6)	2.061	2.002	2.203
S.hominis	38 (20)	2.072	2.011	2.307
S.aureus	36 (18.9)	2.146	2.002	2.403
E.faecalis	17 (8.9)	2.162	2.006	2.404
E.faecium	5 (2.6)	2.180	2.096	2.283
S.haemolyticus	13 (6.8)	2.085	2.046	2.401
S.pneumoniae	8 (4.2)	2.190	2.079	2.312
S.capitis	7 (3.7)	2.081	2.000	2.301
Corynebacterium striatum	4 (2.1)	2.208	2.100	2.300
Corynebacterium afermentans	1 (0.5)	2.082		
Corynebacterium jeikeum	1 (0.5)	2.100		
S.gallolyticus	2 (1.1)	2.250	2.104	2.396
S.pyogenes	2 (1.1)	2.158	2.008	2.302
Brevibacterium ravenspurgense	1 (0.5)	2.024		
Clostridium ramosum	1 (0.5)	2.324		
Clostridium tertium	1 (0.5)	2.301		
Granulicatella adiacens	1 (0.5)	2.121		
Pseudoglutamicibacter cumminsii	1 (0.5)	2.034		
S.agalactiae	1 (0.5)	2.063		
S.anginosus	1 (0.5)	2.072		
S.auricularis	1 (0.5)	2.014		
S.cohnii	1 (0.5)	2.027		
S.mitis	1 (0.5)	2.003		
S.pettenkoferi	1 (0.5)	2.012		
S.simulans	1 (0.5)	2.137		
S.warneri	1 (0.5)	2.019		
	190	2.108	2.000	2.404

HIZLI TANIMLAMA SONUÇLARI

Hızlı tanımlama yöntemiyle 310 monomikrobiyal kan kültürünün 295'inde (%95.2) tanımlama sonucu elde edilirken; 15 şişede (%4.8) sonuç elde edilemedi. Pozitif sinyal alınan örneklerin hızlı tanımlamasında değerlendirme sonuçları Şekil 6'daki şemada özet olarak gösterilmiştir.



*Hızlı tanımlama yöntemiyle yapılan MALDI-TOF MS analizinde herhangi bir pik elde edilemedi

Şekil 6. Pozitif sinyal alınan örneklerin hızlı tanımlama sonuçları

Monomikrobiyal örnekler içerisinde %93.2 (289/310) oranında tür düzeyinde doğru sonuçlar elde edildi. Tür düzeyinde doğru tanımlama sonucu alınan izolatların içerisinde (n=289) tanımlama skorları 2.0'dan büyük, 1.7 ile 1.999 arasında ve 1.7'den küçüklerin oranları sırasıyla; %70.2, %22.2 ve %7.6 idi.

Hızlı tanımlama sonucu alınan 295 örnekten; 289'unun (%97.9) tanımlaması tür düzeyinde doğru, 4'ü (%1.4) cins düzeyinde doğru, 2 (%0.7) tanımlama sonucu yanlıştı.

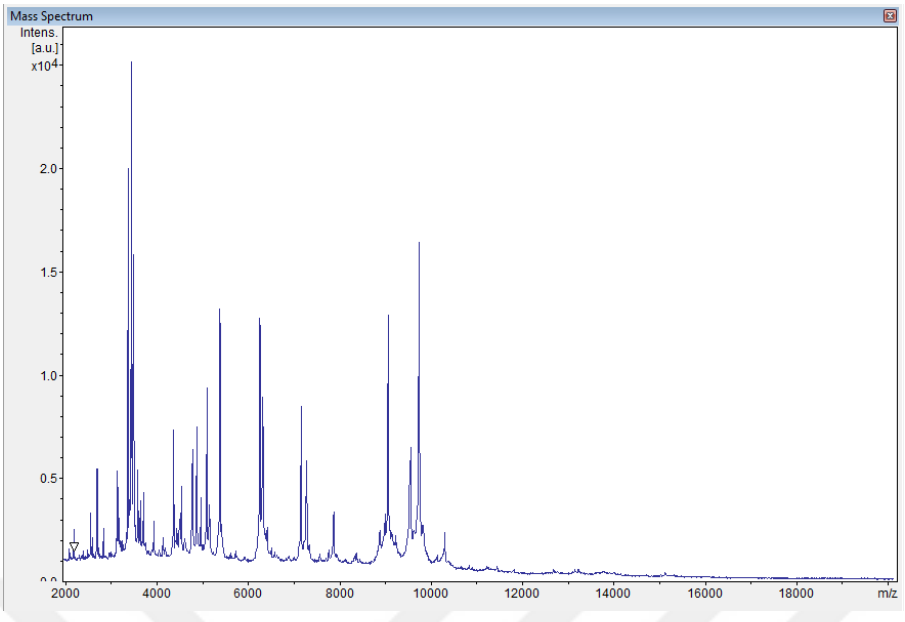
Hızlı tanımlama yöntemiyle sonuç elde edilen izolatların %90.5'inde (267/295) tanımlama skoru 1.7'den büyük olup; 1.7'nin üzerindeki tüm sonuçlar tür düzeyinde doğruydu. Hızlı tanımlama skoru 1.7'den küçük olan 28 örnekten, 22'si tür düzeyinde doğru tanımlandı; 4'ü cins düzeyinde doğru tanımlandı; 2 örnek ise yanlış tanımlandı. Cins düzeyinde doğru tanımlanan 4 izolat ve yanlış tanımlanan 2 izolatın hızlı tanımlama skorları 1.5'ten küçüktü.

Hızlı tanımlamada farklı skorlar eşik değeri olarak alındığında cins ve tür düzeyinde doğru tanımlama oranları Tablo 3'te gösterildi. Hızlı yöntemle skor 1.5 ve üzerinde saptanan izolatlarda tür düzeyinde tanımlamada doğruluk oranı %100'dü.

Tablo 3. Hızlı tanımlamada skor eşik değerlerine göre cins ve tür düzeyinde doğru tanımlama oranları

	MALDI-TOF MS Skor Eşik Değeri								
	≥ 1.2	**≥ 1.3**	**≥ 1.4**	**≥ 1.5**	**≥ 1.6**	**≥ 1.7**	**≥ 1.8**	**≥ 1.9**	**≥ 2.0**
Tür düzeyinde doğruluk	97.97%	98.96%	99.3%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Cins düzeyinde doğruluk	99.32%	99.65%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Hızlı tanımlama yöntemiyle MALDI Biotyper'da elde edilen kütle spektrumuna örnek Şekil 7'de gösterilmektedir.



Şekil 7. Hızlı yöntem ile MALDI Biotyper'da 2.328 skorla tanımlanan *Escherichia coli* kütle spektrumu grafiği

Gram Negatif Bakterilerde Hızlı Tanımlama Sonuçları

Gram negatif 120 örnekte hızlı tanımlama yöntemi ile %100 oranında tür düzeyinde doğru tanımlama sonuçları elde edildi. Yanlış tanımlanan veya tanımlanamayan izolat olmadı. Hızlı tanımlama yöntemiyle elde edilen sonuçların türlere göre dağılımı Tablo 4'te gösterildi.

Hızlı tanımlamada elde edilen MALDI Biotyper skor değerlerinin ortalaması 2.202 (%95 GA: 2.174-2.230) olarak bulundu. En düşük skor 1.702 ile *Stenotrophomonas maltophilia;* en yüksek skor 2.480 ile *K.pneumoniae* izolatlarından elde edildi.

Tablo 4. Gram negatif bakterilerde hızlı tanımlama sonuçları

	İzolat sayısı						
	Tür düzeyinde doğru tanımlama			Cins düzeyinde doğru tanımlama	Yanlış Tanımlama	Tanımsız	Toplam (%)
Bakteri türü	MALDI-TOF MS Skoru						
	< 1.7	1.7-1.99	≥ 2				
E.coli		1	60				61 (50.8)
K.pneumoniae		1	27				28 (23.3)
A.baumannii		4	6				10 (8.3)
P.aeruginosa			5				5 (4.2)
Burkholderia cepacia			2				2 (1.7)
E.cloacae			2				2 (1.7)
K.variicola			2				2 (1.7)
Salmonella spp.			2				2 (1.7)
Aeromonas hydrophilia			1				1 (0.8)
Bacterodies fragilis			1				1 (0.8)
K.aerogenes		1	1				2 (1.7)
P.mirabilis			1				1 (0.8)
S.maltophilia		1	1				2 (1.7)
Pseudomonas sp.		1					1 (0.8)
Toplam (%)		9 (7.5)	111 (92.5)				120

Gram Pozitif Bakterilerde Hızlı Tanımlama Sonuçları

Gram pozitif monomikrobiyal etken içeren 190 örnekte hızlı tanımlama yöntemiyle; %88.9 tür düzeyinde doğru sonuç; %2.1 cins düzeyinde doğru sonuç; %1.1 yanlış sonuç elde edildi; %7.9'unda hızlı yöntemle sonuç alınamadı.

Hızlı tanımlama yöntemiyle sonuç elde edilenlerde, tür düzeyinde doğru tanımlanma oranı % 96.6 (169/175); cins düzeyinde doğru tanımlanma oranı %98.9 (173/175); yanlış tanımlanma oranı %1.1 (2/175) bulundu. Gram pozitif bakterilerde hızlı tanımlama yöntemi sonuçlarının türlere göre dağılımı Tablo 5'te gösterildi.

Hızlı tanımlamada elde edilen MALDI Biotyper skor değerlerinin ortalaması 1.940 (%95 GA: 1.899-1.981) olarak bulundu. En yüksek skor 2.478 ile *Enterococcus faecalis;* en düşük skor 1.258 ile *S.epidermidis* izolatından elde edildi.

Tablo 5. Gram pozitif bakterilerde hızlı tanımlama sonuçları

Bakteri türü	İzolat sayısı										
	Tür düzeyinde doğru tanımlama			Cins düzeyinde doğru tanımlama			Yanlış Tanımlama			Tanımsız	Toplam (%)
	MALDI-TOF MS Skoru			MALDI-TOF MS Skoru			MALDI-TOF MS Skoru				
	< 1.7	1.7-1.99	≥ 2	< 1.7	1.7-1.99	≥ 2	< 1.7	1.7-1.99	≥ 2		
S.epidermidis	9	20	8	1						5	43 (22.6)
S.hominis	1	12	20	2						3	38 (20)
S.aureus	2	11	19				1			3	36 (18.9)
E.faecalis	1		16								17 (8.9)
E.faecium			5								5 (2.6)
S.haemolyticus	2	4	4	1						2	13 (6.8)
S.pneumoniae			8								8 (4.2)
S.capitis	3	1	2							1	7 (3.7)
Corynebacterium striatum		2	2								4 (2.1)
Corynebacterium afermentans			1								1 (0.5)
Corynebacterium jeikeum										1	1 (0.5)
S.gallolyticus	1	1									2 (1.1)
S.pyogenes		1	1								2 (1.1)
Brevibacterium ravenspurgense		1									1 (0.5)
Clostridium ramosum			1								1 (0.5)
Clostridium tertium			1								1 (0.5)
Granulicatella adiacens			1								1 (0.5)
Pseudoglutamicibacter cumminsii		1									1 (0.5)
S.agalactiae			1								1 (0.5)
S.anginosus	1										1 (0.5)
S.auricularis		1									1 (0.5)
S.cohnii	1										1 (0.5)
S.mitis			1								1 (0.5)
S.pettenkoferi							1				1 (0.5)
S.simulans			1								1 (0.5)
S.warneri	1										1 (0.5)
Toplam	22	55	92	4			2			15	190
(%)	(11.6)	(28.9)	(48.4)	(2.1)			(1.1)			(7.9)	
		% 88.9									

Cins düzeyinde doğru tanımlanabilen 4 izolatın tümü koagülaz negatif stafilokoklar olup, tür düzeyinde tanımlama sonuçları referans yöntemle karşılaştırmalı olarak Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. Hızlı yöntemle cins düzeyinde doğru tanımlanan izolatların rutin tanımlama sonuçlarıyla karşılaştırması

Rutin Tanımlama	**MALDI Skor**	**Hızlı Tanımlama**	**MALDI Skor**
Staphylococcus epidermidis	2.024	*Staphylococcus hominis*	1.459
Staphylococcus haemolyticus	2.035	*Staphylococcus capitis*	1.456
Staphylococcus hominis	2.132	*Staphylococcus sciuri*	1.207
Staphylococcus hominis	2.128	*Staphylococcus condimenti*	1.200

Hızlı yöntem ile yanlış tanımlanan iki izolatın doğru tanımlamaları *S.aureus* ve *S.pettenkoferi* idi. Bu izolatların ikisi de hızlı yöntemle sırasıyla 1.251 ve 1.389 skorlarla *Mannheimia haemolytica* olarak yanlış tanımlandı.

POLİMİKROBİYAL KAN KÜLTÜRLERİ

Katı besiyerinde yapılan kültür sonucunda polimikrobiyal üreme görülen 16 kan kültürü örneğinin tümünde izolatlar rutin yöntem ile 2.0'ın üzerinde skorlarla tanımlandı. Hızlı yöntemle, 14 örnekte polimikrobiyal izolatların içerisindeki bir izolat doğru olarak tanımlandı, ek izolat tanımlanamadı; 1 örnek 1.42 skorla yanlış tanımlandı; 1 örnekte ise hiçbir etken tanımlanamadı. Polimikrobiyal örneklerin hızlı tanımlama sonuçları Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7. Polimikrobiyal kan kültürlerinin hızlı tanımlama sonuçları

Hızlı Tanımlama Sonucu	**Doğru Tanımlamanın MALDI-TOF MS Skoru**			**Yanlış Tanımlama**	**Tanımlanamayan Ek İzolatlar**
	<1.7	**1.7-1.99**	**≥2**		
S.epidermidis		1			*S.hominis*
S.hominis		1			*S.epidermidis*
S.epidermidis		1			*Corynebacterium amycolatum*
S.hominis			1		*Corynebacterium minutissimum*
S.aureus	1				*S.hominis*
S.haemolyticus			1		*S.epidermidis*
S.epidermidis	1				*S.haemolyticus*
E.faecalis			1		*S.epidermidis, S.haemolyticus*
S.haemolyticus			1		*S.capitis*
S.warneri		1			*S.capitis*
S.haemolyticus			1		*P.aeruginosa*
Rhizobium radiobacter				1*	*S.sanguinis, S.haemolyticus*
E.coli			1		*S.epidermidis, Bacillus megaterium*
P.aeruginosa			1		*A.baumannii*
A.baumannii		1			*K.pneumoniae*
Tanımlanamadı					*S.aureus, S.haemolyticus*

*****MALDI Biotyper tanımlama skoru 1.42

SONUÇ VERME SÜRELERİ

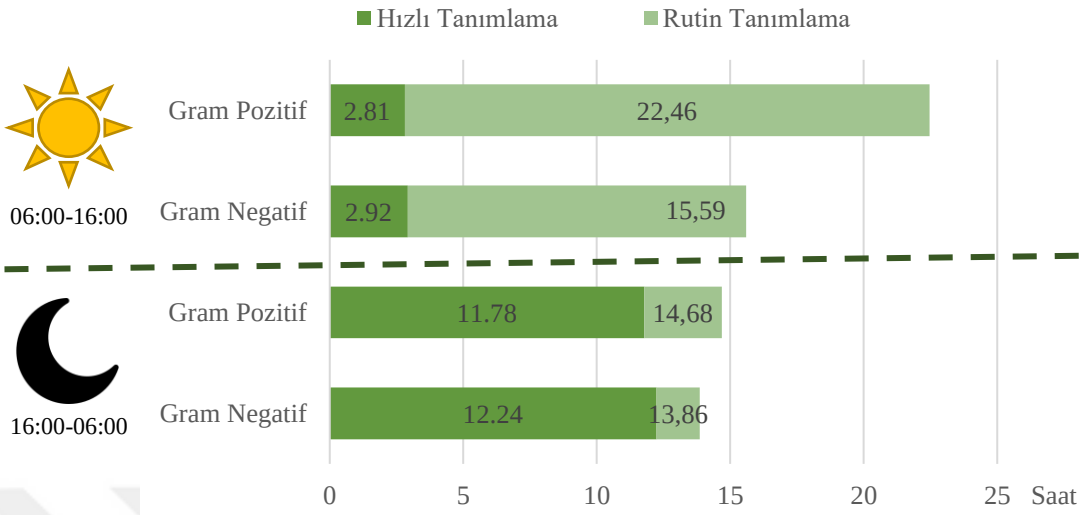
Hızlı ve rutin tanımlama yöntemleriyle elde edilen ortalama sonuç verme süreleri saat cinsinden karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0.001). Hızlı tanımlama yönteminin ortalama sonuç verme süresinin kısalması üzerinde büyük etkiye sahip olduğu gösterildi (Cohen's d=0.821).

İki yöntemle elde edilen ortalama sonuç verme sürelerinin gece ve gündüz sinyal gruplarında saat cinsinden karşılaştırması Tablo 8'de gösterildi. Gündüz sinyal grubunda hızlı tanımlama yönteminin ortalama sonuç verme süresi, rutin tanımlama yönteminden 16.63 saat daha kısa bulundu; gündüz sinyal grubunda ortalama sonuç verme süresi istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi (p<0.001). Gece sinyal grubunda hızlı ve rutin tanımlama yöntemlerinin ortalama sonuç verme süreleri arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.146).

Tablo 8. Hızlı ve rutin tanımlama yöntemlerinde sinyal grubuna göre saat cinsinden ortalama sonuç verme süreleri

Sinyal Grubu	**Hızlı Yöntem Sonuç Verme Süresi** *Mean±SD* (%95 GA)	**Rutin Yöntem Sonuç Verme Süresi** *Mean±SD* (%95 GA)
Gündüz (n=132)	**2.86** ± 1.22 (2.65-3.07)	**19.49** ± 8.18 (18.08-20.89)
Gece (n=163)	**11.96** ± 4.14 (11.32-12.6)	**14.36** ± 7.06 (13.27-15.45)
Tüm örnekler (n=295)	**7.88** ± 5.54 (7.25-8.52)	**16.66** ± 7.99 (15.74-17.57)

Hızlı ve rutin tanımlama yöntemlerinde ortalama sonuç verme sürelerinin gece ve gündüz sinyal gruplarında Gram boyanma özelliklerine göre karşılaştırmaları Şekil 8'de gösterildi.



Şekil 8. Gece ve gündüz sinyal gruplarında Gram boyanma özelliklerine göre hızlı ve rutin tanımlama yöntemleriyle ortalama sonuç verme sürelerinin dağılımı

Gündüz sinyal grubunda hızlı tanımlama ortalama sonuç verme süresi rutin tanımlamaya göre, Gram pozitif izolatlarda 19.65 saat; Gram negatiflerde 12.67 saat daha kısa bulundu. Gece sinyal grubunda hızlı tanımlama ortalama sonuç verme süresi rutin tanımlamaya göre, Gram pozitif izolatlarda 2.9 saat; Gram negatiflerde 1.62 saat daha kısa bulundu.

TARTIŞMA

Çalışmamızda 328 pozitif kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS kullanılarak yapılan hızlı tanımlama yöntemi; monomikrobiyal örneklerde skordan bağımsız olarak %93.2 oranında tür düzeyinde doğru tanımlama başarısı göstererek, ortalama sonuç verme süresini rutin tanımlamaya göre 16.63 saat kısaltmıştır.

Kan dolaşımı enfeksiyonları tüm dünyada ciddi mortalite ve morbidite ile seyreden enfeksiyonlar olup, sepsis ilişkili hipotansiyonu takiben, etkili tedavinin geciktiği her saat mortalite riski yaklaşık %8 artmaktadır [54]. Kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında kültür altın standart olup konvansiyonel yöntemler ile tanımlama, pozitif kan kültürlerinin katı besiyerine ekimi sonrasında 18-24 saatlik inkübasyonu takiben koloni üremesine dayanır. Otomatize sistemlerle tanımlama bakteri türüne göre değişmekle birlikte genellikle 24-48 saat sürmektedir [2]–[4]. Katı besiyerinde üreyen koloniden MALDI-TOF MS sistemi ile kesin tanımlama dakikalar içerisinde sonuçlansa da; şişeden pozitif sinyal alınmasından, kesin tanımlamaya kadar geçen süre 24 saati aşabilmektedir. Hastanın tedavisi için kritik olan erken dönemde kan kültürlerinde bakteriyel patojenin hızlı tanımlanması, hastanede yatış süresinde ve mortalite riskinde azalmayla ilişkili bulunmuştur [1].

Pozitif kan kültürlerinde yapılan çalışmalarda katı besiyerindeki inkübasyon süresinin kısaltılmasıyla, MALDI-TOF MS ile güvenilir bakteri tanımlama sonuçları daha hızlı şekilde elde edilmiştir [5]–[7], [55]–[57]. Ortalama 4 saatlik inkübasyon süresiyle Gram negatif bakterilerin %95'inden fazlasında tür düzeyinde güvenilir tanımlama skorları elde edilebileceği gösterilmiştir [6], [58]. Bizim rutinde uyguladığımız tanımlama yönteminde katı besiyerinde 4-24 saat arası inkübasyonu takiben günde iki kez üreme kontrolü yapılarak gözle görülür yeterli üreme varlığında MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılmaktadır. Bu uygulamayla kan kültüründe rutin tanımlama yöntemimizin ortalama sonuç verme süresi 16.66 saat olarak bulunmuştur. Bu süre konvansiyonel yönteme göre iyileştirilmiş olsa da hasta tedavi yönetimine katkı sağlamak için aynı gün içerisinde sonuç verilebilmesi hedeflenmektedir.

Kan kültüründe üreyen patojenin aynı gün içerisinde hızlı tanımlanması için geliştirilen çeşitli moleküler yöntemler mevcuttur [8]–[11]. Bu yöntemler etkenin

tanımlanmasının yanı sıra antimikrobiyal direnç genlerinin de tespitine olanak sağlarken, yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermelerine rağmen cihaz ve kit maliyetlerinin yüksek olması yaygın kullanımını kısıtlamaktadır [12], [13]. Ayrıca moleküler yöntemlerle tanımlanabilen patojenler kit içerisindeki türler ile sınırlıdır. MALDI-TOF MS sisteminin kullanımıyla bu sınırlamalar aşılabilmektedir. MALDI-TOF MS sistemi ilk başta agar kültürlerde elde edilen saf kolonilerden tanımlama yapmak üzere tasarlanmış olup, günümüzde direkt numunelerden (kan kültürü ve idrar) mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla da kullanılabilmektedir [13], [16], [59]–[61]. Pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS sistemiyle etkenin tanımlanması için geliştirilen ticari kitler ve yazılım modülü mevcuttur [12], [62]. Bunun yanı sıra pozitif sinyal alınan kan kültürü şişesinden direkt tanımlama işlemi "in-house" yöntemlerle hazırlanan numunelerden, sistem veri tabanı veya yazılımında değişiklik yapılmaksızın uygulanabilmektedir [51], [63], [64].

Pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile numune analizinde problematik olan kısım genellikle kan hücre bileşenlerinin ayrıştırılması olup, yapılan çalışmalarda saponin, EDTA, $NaHCO_3$, NH_4Cl, $KHCO_3$, Triton X-100 ve Tween-80 gibi çeşitli kimyasal tamponlar veya serum seperatör tüpleri kullanılarak farklı numune hazırlama ve ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır [15], [16], [40]–[42], [45]–[50]. Bu çalışmalarda tür düzeyinde doğru tanımlama oranları %60-99 arasında; çalışma süreleri genellikle 15-40 dk arasında değişmektedir [13]. Kimyasal tamponlarla tekrarlı yıkama ve santrifüjleme aşamaları çalışma sürelerini uzatırken, serum seperatör tüplerle bu dezavantaj aşılabilmektedir. Tanımlama skorlarının iyileştirilmesi amacıyla uygulanan asetonitril, formik asit gibi ekstraksiyon aşamaları da zaman alıcı işlemlerdir [57]. Çalışmamızda pratik uygulanabilirlik açısından hızlı tanımlama yönteminde çalışma süresini olabildiğince kısa tutabilmek amacıyla, numune hazırlamada serum seperatör tüpler ve hedef plakta direkt formik asitle ekstraksiyon yöntemi tercih edilmiştir.

Ülkemizde kan kültürü şişesinden direkt tanımlama yöntemi üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Kılıç ve ark. Stafilokoklarla ilgili yaptığı çalışmada; 90 pozitif kan kültürü şişesinden Sepsityper kiti (Bruker Daltonics) ile MALDI-TOF MS analizi gerçekleştirmiş, sonuçları konvansiyonel kültürden yapılan Phoenix otomatize tanımlama sonuçlarıyla karşılaştırmış ve referans yöntem olarak real-time

Taqman PCR (qPCR) kullanmıştır [65]. Bu çalışmada MALDI Sepsityper kitiyle pozitif kan kültür şişelerinden *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokokların hızlı ve etkili bir biçimde tanımlanabildiği gösterilmiştir. Bahçe ve ark. Gram negatif çomaklarda yaptığı çalışmada; 120 pozitif kan kültürü şişesinden direkt Phoenix 100 (Becton Dickinson, Sparks, ABD) sistemiyle tanımlama ve antibiyotik duyarlılıklarının raporlama sürelerinin kısaltılabildiğini göstermiştir [44]. Süzük ve ark. 462 monomikrobiyal pozitif kan kültüründe Tween-80 kullanarak doğrudan MALDI-TOF MS yöntemiyle %82.9 oranında tanımlama yapılabildiğini göstermiştir [42]. Bu çalışmalarda hızlı tanımlama yöntemlerinin, pozitif sinyal alınmasından kesin tanımlamanın raporlanmasına kadar geçen sonuç verme süresi incelenmemiştir. Çalışmamız hızlı tanımlama yönteminin sonuç verme süresi üzerine odaklanmış olmasından dolayı bu çalışmalardan farklılaşmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen örnekler içerisinde Gram pozitif ve Gram negatif monomikrobiyal üreme oranlarımız sırasıyla, %61.3 ve %38.7 olarak bulunmuştur. Kan kültüründe Gram pozitif ve Gram negatif bakteri üreme oranları sırasıyla, Çetin ve ark.'nın çalışmasında %67 ve %29 [66]; Turhanoglu ve ark.'nın çalışmasında %67 ve %27 [67]; Süzük ve ark.'nın çalışmasında %56 ve %34 [42] oranında çalışmamızla uyumlu olarak tespit edilmiştir. Kan kültüründe Gram pozitif ve Gram negatif bakteri üreme oranları sırasıyla, Mataj ve ark.'nın çalışmasında %45 ve %50 [68]; Müderris ve ark.'nın çalışmasında %43 ve %57 [69]; Yılmaz ve ark.'nın çalışmasında %31 ve %61 [70]; Çopur Çiçek ve ark.'nın çalışmasında %80 ve %17 [71] oranında çalışmamızdan farklı olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen örnekler içerisinde en sık görülen bakteri grubu koagülaz negatif stafilokoklar olup, ikinci sırada *Enterobacterales* ailesine ait türler izole edilmiştir. İzole edilen koagülaz negatif stafilokokların %74'ü (78/106) kontaminasyon olarak değerlendirilmiş olup, %26'sı (28/106) etken olarak kabul edilmiştir. En sık görülen etkenler sırasıyla *E.coli, S.aureus* ve *K.pneumoniae* olarak saptanmıştır. Nadir saptanan Gram pozitif *Pseudoglutamicibacter cumminsii, Granulicatella adiacens* ve *Brevibacterium ravenspurgense* türleri kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir.

Ülkemizde kan kültürlerinde farklı coğrafi bölgelerde ve farklı merkezlerde yapılan çalışmalarda değişen bakteri dağılım oranları bildirilmiştir [66], [67], [71]. Yılmaz ve ark.'nın iki yıllık dönemde kan kültüründe izole edilen mikroorganizmaları değerlendirdikleri çalışmada en sık izole edilen etkenler sırasıyla; *E.coli, Klebsiella spp.*, ve koagülaz negatif stafilokoklar olarak bulunmuştur [70]. Müderris ve ark.'nın kan kültüründe izole edilen etkenlerin beş yıllık dağılımını incelediği çalışmada en sık türler sırasıyla *E.coli, S.aureus* ve *A.baumannii* olarak tespit edilmiştir [69]. Mataj ve ark.'nın üçüncü basamak bir sağlık kuruluşunda on yıllık dönemde kan dolaşımı enfeksiyon etkenlerini içeren çalışmasında; en sık Gram negatif bakteri *E.coli*; en sık Gram pozitif bakteri koagülaz negatif stafilokoklar olarak saptanmıştır [68]. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak kan kültüründe en sık saptanan Gram negatif bakteriyel etken *E.coli* olarak bulunmuş olup, Gram pozitif bakteriyel etkenlerde *S.aureus* ön plandadır.

Çalışmamızda kan kültürü şişesinden doğrudan MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama yöntemiyle monomikrobiyal 120 Gram negatif örnekte %100; 190 Gram pozitif örnekte %88.9 tür düzeyinde doğru tanımlama oranları elde edilmiştir. Serum seperatör tüpler kullanılarak daha önce yapılan çalışmalarda Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde doğru tanımlanma oranları sırasıyla; Barnini ve ark.'nın çalışmasında %100 ve %90 [16]; Azrad ve ark.'nın çalışmasında %95 ve %92 [48]; Wu ve ark.'nın çalışmasında %93 ve %83 [72] olarak çalışmamızla benzer bulunmuştur. Saponin lizis yöntemi kullanılan çalışmalarla kan kültürü şişesinden doğrudan MALDI-TOF MS ile tanımlama sonuçları Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde sırasıyla; Jakovljev ve ark.'nın çalışmasında %94 ve %85 [46]; Huang ve ark.'nın çalışmasında %93 ve %81 [73]; Barberino ve ark.'nın çalışmasında %93 ve %78 [74] olarak bulunmuştur. Kan kültürü şişesinden direkt tanımlama için numune hazrılamada NH_4Cl ve $KHCO_3$ içeren tampon solusyon kullanarak yapılan çalışmada Prod'hom ve ark. Gram negatif bakterilerde %90, Gram pozitif bakterilerde %73 oranında doğru tanımlama sonuçları elde etmişlerdir [75]. Sakarikou ve ark. NH_4Cl, $NaHCO_3$ ve EDTA içeren hemoliz tamponu kullanarak yaptıkları çalışmada 102 Gram negatif bakteri içeren kan kültürü şişesinden MADLI-TOF MS yöntemiyle %100 doğru tanımlama oranı elde etmiştir [47]. Lopez Pintor ve ark. kan kültürü şişesinden direkt tanımlamada ekstraksiyon ihtiyacını ortadan kaldırabilmek için sadece Gram

negatif bakterilerde çalışmış ve %5 sodyum dodesil sülfat kullanarak hazırladıkları numuneden MALDI-TOF MS ile tanımlamada %100 doğru sonuçlar elde etmiştir (%89'unun skoru 1.7'den büyük) [41]. Simon ve ark. [50] 632 kan kültürü şişesinden Triton x-100 (Sigma-Aldrich, Lyon, Fransa) kullanarak hazırlanan pelletten direk formik asit ekstraksiyon yöntemiyle MALDI-TOF MS analizinde, Gram negatif bakterilerde %90; Gram pozitif bakterilerde %75 tür düzeyinde doğru tanımlama sonucu elde etmiştir. Aynı çalışmada %12.2 oranında kan kültürü şişesinden direkt tanımlama yöntemiyle sonuç alınamamıştır, bu oran çalışmamıza göre yüksek bulunmuştur.

Barnini ve ark.'nın 118 Gram negatif ve 80 Gram pozitif bakteri içeren kan kültürü şişesinden serum seperatör tüpleri kullanarak hazırladığı çökeltiden MALDI-TOF MS ile direkt tanımlama çalışmasında, doğru tanımlama oranları toplamda %95; Gram negatif izolatlarda %100 (bunların %96'sının skorları 2.0'ın üzerinde); Gram pozitif izolatlarda %90 (%32'sinin skoru 2.0'ın üzerinde) olarak bulunmuştur [16]. Barnini ve ark. bu çalışmada sadece Gram pozitif bakterilerde ekstraksiyon yöntemi uygulamış ve bunu hedef plakta etanol, formik asit ve asetonitril ile gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada yanlış tanımlama ve tanımlanamama oranları sırasıyla %4 ve %6 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda zamandan kazanmak amacıyla Gram boya sonucu beklemeksizin tüm örneklerde plakta formik asit ekstraksiyonu uygulanmıştır. Çalışmamızda doğru tanımlama oranlarımız, toplamda %93.2; Gram negatif izolatlarda %100 (%92.5'inin skorları 2.0 ve üzerinde); Gram pozitif izolatlarda %88.9 (%48.4'ünün skorları 2.0'ın üzerinde) olarak bu çalışmayla benzer bulunmuştur. Çalışmamızda hızlı yöntemle yanlış tanımlama ve tanımlanamama oranlarımız ise sırasıyla %0.6 ve %4.8 olarak Barnini ve ark.'nın çalışmasından daha düşük bulunmuştur. Bu fark ekstraksiyon yöntemindeki değişiklikten veya yıllar içerisinde Bruker Biotyper kütüphanesinde yapılan iyileştirmelerden kaynaklanmış olabilir [76], [77].

Azrad ve ark. 79 Gram negatif, 88 Gram pozitif bakteri içeren kan kültürü şişesinden Vacuette Z Serum Sep Clot Activator tube (Greiner Bio-One, North Carolina, ABD) kullanarak hazırladıkları pelletten ekstraksiyon uygulamadan direkt MALDI-TOF MS analizi gerçekleştirmiştir [48]. Bu çalışmada skordan bağımsız olarak tür düzeyinde doğru tanımlanma oranları toplamda %90; Gram negatiflerde

%95 (%53'ünde skor 1.7'den büyük); Gram pozitiflerde %92 (%43'ünde skor 1.7'den büyük) olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada hızlı yöntemle tanımlanamama oranı %10 olarak bulunmuş, yanlış tanımlanan izolat bildirilmemiştir. Çalışmamızda, doğru tanımlama oranları bu çalışmayla benzer bulunmuş olup; tanımlanamayan izolat oranımızın daha düşük ve tanımlama skorlarımızın daha yüksek saptanması, formik asit ekstraksiyonu uygulamamızdan kaynaklanmış olabilir.

Wu ve ark. pozitif kan kültürü şişesinden BD Vacutainer (Becton Dickinson, ABD) serum seperatör tüp kullanarak hazırladığı pelletten ekstraksiyonsuz direkt MALDI-TOF MS tanımlamasıyla 93 Gram negatif bakteride %93; 51 Gram pozitif bakteride %83 oranında doğru tanımlama sonucu bildirmiştir [72]. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak plakta direk formik asit ekstraksiyon yöntemi uygulanmış ve doğru tanımlama oranları (sırasıyla %100 ve %88.9) bu çalışmaya göre daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda 295 örnekten MALDI Biotyper cihazı ile elde edilen skorlar üretici önerileri doğrultusunda değerlendirildiğinde 28 izolatın skorları 1.7'nin altında olup "güvenilir olmayan tanımlama" grubunda yer almasına karşın, rutin tanımlama sonuçları referans alındığında bu izolatlardan 22'sinin tanımlama sonucu tür düzeyinde doğru bulunmuştur.

Simon ve ark. 632 pozitif monomikrobiyal kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile yaptığı çalışmada farklı skor eşik değerlerine dayalı tanımlama sonuçlarını analiz ederek, 1.5 ve üzerindeki skorlarda tür düzeyinde doğru tanımlama oranının % 99'un üzerinde olduğunu göstererek şişeden direkt yapılan tanımlamada skor eşik değerinin 1.5'e kadar güvenilir olabileceğini belirtmiştir [50]. Lagacé-Wiens ve ark. çalışmasında MALDI-TOF MS'in doğrudan pozitif kan kültürlerinde uygulandığında, 1.5 skor eşik değer ile güvenli tanımlama yapabildiği görüşünü desteklemiştir [2]. Bizim çalışmamızda da 1.5 ve üzerinde skor elde edilen 281 izolat %100 oranında tür düzeyinde doğru tanımlanarak bu çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Barnini ve ark.nın yaptığı çalışmada, pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS aracılığıyla 80 Gram pozitif monomikrobiyal etkenin %25'i 1.7'den düşük skorlarla tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmış ve doğruluktan ödün

vermeden skor alt sınır değerlerinin 1.4'e kadar indirilebileceği bildirilmiştir [16]. Bizim çalışmamızda da 1.4 ve üzerindeki skorlarda cins ve tür düzeyinde doğru tanımlanma oranımız sırasıyla %100 ve %99.3 olarak bu görüşü desteklemektedir.

Schubert ve ark. kan kültürü şişesinden doğrudan MALDI-TOF MS yöntemiyle yaptığı tanımlama çalışmasında skor ≥1.5 ve klasifikasyon sonuçlarında analit için eşleme patterni listesinde ilk üç sırada aynı tür olması durumunda tür düzeyinde doğru tanımlama olarak kabul edilebileceğini belirtmiştir [51]. Martiny ve ark. kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile tanımlamada yeni bir güvenlik kuralı olarak; en yüksek tanımlama skoru ile uyumsuz olan ilk tanımlama arasında en az 0.3'lük bir skor farkının bulunması durumunda cins için 1.4; tür için 1.6 skor eşik değerlerinin kullanılabileceğini bildirmiştir [78].

Fuglsang-Damgaard ve ark. kan kültürü şişesinden doğrudan MALDI-TOF-MS ile tanımlamada elde edilen en yüksek skorlu tanımlamaların Gram boyama sonuçları ile birleştirildiğinde, duyarlılığın 1.5 ile 1.7 arasındaki skorlarda %91'den %93'e; 1.3 ile 1.5 arasındaki skorlarda ise %48'den %85'e yükseldiğini ortaya koymuştur [79]. Bu stratejiyle üretici tarafından önerilen 1.7 skor eşik değeri yerine 1.3 kullanılarak genel duyarlılığın %88.1'den %96.3'e yükseltilebileceği belirtilmiştir [79].

Christner ve ark. 2.0'dan düşük skorlarda elde edilen doğru tanımlamaların genellikle örneğin veritabanındaki izolatla ilişkisinin zayıflığından ziyade belirgin arka plan sinyali ve düşük analit konsantrasyonu gibi optimal olmayan örnek koşullarına bağlı olabileceğini savunmuştur [17]. Aynı çalışmada bakteri konsantrasyonunun ve kültür inkübasyon süresinin, kan kültürü şişesinden direkt tanımlama sonuçlarını önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur. Bu durum, inkübasyon süresindeki uzama sonucu numune içeriğinde bakteri dışı bileşenlerdeki artışın spesifik bakteri sinyallerini maskeleyerek spektrum kalitesini bozmasıyla açıklanmıştır.

Christner ve ark. *S.aureus* izolatlarında düşük tanımlanma oranlarını aerobik kan kültürü şişesi ile ilişkilendirerek, aynı örneklerin eşzamanlı inkübe edilen anaerobik şişelerinden direkt tanımlamada başarılı sonuçlandığını belirtmiştir. Çalışmamızda 36 *S.aureus* izolatının 22'sinde aerobik şişeden 14'ünde anaerobik şişeden direkt tanımlama yapılmıştır. Christner ve ark.'nın çalışmasıyla uyumlu

olarak bizim çalışmamızda 3 tanımlanamayan ve 1 yanlış tanımlanan *S.aureus* izolatının hızlı tanımlamaları aerobik şişelerden yapılmış; anaerobik şişelerde hızlı yöntemle tanımlanamayan izolat bulunmamıştır.

Yakın zamanda MALDI Biotyper için ek bir yazılım modülü olarak geliştirilen MBT-Sepsityper modülü (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya), kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile tanımlama performansını iyileştirmek için geliştirilen bir sistemdir [77], [80]. Bu sistemde kan ve besiyerinden kaynaklanan istenmeyen kütle spektrum pikleri hesaba katılarak veriler optimize edilerek işlenir ve modifiye edilmiş skor eşik değerleri ile raporlanır. MALDI Biotyper standart modülde koloniden tanımlama için kabul edilen skor eşik değerleri, Sepsityper modülünde aşağı çekilerek cins ve tür düzeyinde sırasıyla 1.6 ve 1.8 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda kan kültürü şişesinden direkt tanımlamada MBT-Sepsityper modülünün, standart modül ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek güvenilir tanımlama oranları sağladığı gösterilmiştir [12], [81].

Pozitif kan kültürlerinden direkt MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılan diğer çalışmalarla benzer şekilde çalışmamızda doğruluktan ödün vermeden skor eşik değerlerinin düşürülebileceği gözlemlenmiştir [2], [16], [50], [51], [78], [79].

Genel kural olarak, bakteri veya mantar identifikasyonu için yeni bir sistem veya metot laboratuvarda uygulanmaya başlanacağı zaman hâlihazırda kullanılmakta sistem ya da metot referans alınarak %95 seviyesinde bir uyum aranmalıdır [82]. Çalışmamızda hızlı yöntem tanımlama sonuçları 1.2 ve üzerindeki skorlarda, referans yöntemle cins düzeyinde %99.3, tür düzeyinde %97.9 uyum göstermektedir. %99 uyumu kriter olarak aldığımızda skor eşik değerleri tür düzeyinde 1.4 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda 310 monomikrobiyal örnekten 15'inde (%4.8) hızlı tanımlama yöntemiyle MALDI-TOF MS analizinde herhangi bir kütle spektrum piki elde edilememiştir. Bunların tümü Gram pozitif bakteriler olup; 11 koagülaz negatif stafilokok, 3 *S.aureus* ve 1 *Corynebacterium jeikeum* izolatından oluşmaktadır. Barnini ve ark.'nın [16] çalışmasında kan kültürü şişesinden direkt yöntemle tanımlanamama oranı %6 olarak bulunmuş olup, bu izolatların çoğunluğunu çalışmamızla benzer şekilde koagülaz negatif stafilokokların oluşturduğu görülmüştür.

Bu durumun Gram pozitiflerde yetersiz pellet elde edilmesine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Giordano ve ark. kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile tanımlamada olası kontaminant üremeleri dışlamak için Gram pozitif üremelerde şişeden pozitif sinyal alınma süresini dikkate alarak yalnızca 10 saatten kısa sürede sinyal veren şişeleri çalışmaya dahil etmiştir [45]. Çalışmamızda pozitif sinyal alınma sürelerine baktığımızda tanımlanamayan izolatların %87'sinde sinyal verme süresinin 10 saatin üzerinde olduğu saptanmıştır. Geç sinyal alınan Gram pozitif üremeler dahil olmak üzere, kan kültüründe tanımlamanın mümkün olduğu kadar hızlı yapılması, klinisyene etken kontaminasyon ayrımı konusunda katkı sağlayacağından, çalışmamızda Gram boyama sonucu beklenmeden tüm örnekler direkt tanımlama işlemine alınmıştır.

Çalışmamızda 310 monomikrobiyal örnek içerisinde %0.6 oranında yanlış tanımlama olup bu oran Barnini ve ark.'nın [16] çalışmasında %4 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda yanlış tanımlama yalnızca stafilokok cinsi bakterilerde tespit edilmiş olup, daha önce yapılan benzer çalışmalarda buna ek olarak enterokok ve streptokok cinsi bakterilerde de hızlı yöntemle yanlış tanımlamalar bildirilmiştir [16], [48].

Çalışmamız süresince 15 *Streptococcus* cinsi bakteri izole edilmiş olup, tümü hızlı yöntemle 1.6 ile 2.465 arasındaki skorlarla tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır. *Streptococcus pneumoniae* izolatları (n=8) hızlı yöntemle 2.0'ın üzerinde skorlarla en az rutin yöntem kadar başarılı şekilde tanımlanmış olup, rutin yöntemle birlikte tanımlamada safrada erime testi ve optokin disk doğrulaması yapılmıştır. Daha önceki çalışmalarda kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS yöntemiyle *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus oralis* izolatlarında *Streptococcus pneumoniae* olarak yanlış tanımlamalar bildirilmiş olup [64], [76], bizim çalışmamızda böyle bir sorunla karşılaşılmamıştır. Çalışma süresince üreyen tek *Streptococcus mitis* izolatı da doğru tanımlanmıştır. Bu durum seneler içerisinde MALDI-TOF MS kütüphanelerinin iyileştirilmesiyle ilişkili olabilir.

Çalışmamızda hızlı yöntemle MALDI-TOF MS analizinde düşük skorlarla *Mannheimia haemolytica* olarak yanlış tanımlanan 2 izolatın doğru tanımlamaları *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus pettenkoferi* olarak sonuçlanmıştır.

Mannheimia haemolytica 1999'da *Mannheimia* olarak yeniden adlandırılan *Pasteurella haemolytica* biyogrup 1'e karşılık gelen Gram negatif bakteri türü olup; sığır, koyun ve keçilerde bakteriyel pnömoni etkenidir [83]. Kanlı agarda beta hemoliz gösterir ve MacConkey agarda üreyebilir. Biyokimyasal olarak; katalaz, oksidaz pozitif; indol negatif özellik gösterir. İnsanda patojenitesi kesin olarak bilinen bir bakteri türü değildir [84]. Hızlı yöntemle düşük skorla saptanan bu tanımlama sonuçları; kan kültüründe etken olarak beklenmeyen ve Gram boyama sonuçlarıyla uyumsuz bakteri türü olarak değerlendirilmiştir. Tanımlama sonuçları değerlendirilirken bu kriterler göz önüne alındığı takdirde olası raporlama hataları önlenecektir.

Çalışmada 16 polimikrobiyal örnekten, 14'ünde polimikrobiyal izolatların içerisindeki bir izolat tür düzeyinde doğru olarak tanımlanabilmiştir. 12 örnekte tamamı Gram pozitif izolatlardan oluşan polimikrobiyal üremeler saptanmıştır. Polimikrobiyal üreme görülen örneklerden 10'u kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir. Polimikrobiyal üremelerde hızlı yöntemle tanımlanamayan izolatların çoğunluğu Gram pozitif bakteriler olup literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur [16], [48]. Çalışmamızda bu izolatların büyük kısmını Barnini ve ark.'nın çalışmasına benzer şekilde koagülaz negatif stafilokokların oluşturduğu saptanmıştır [16].

Çalışmamız süresince laboratuvarımıza gönderilen kan kültürü örneklerinden yapılan rutin tanımlamada *Candida parapsilosis* ve *Rhodotorula mucilagunosa* olmak üzere iki maya izole edilmiştir. Hızlı yöntemle bu izolatlarda sırasıyla 1.2 skorla *Candida parapsilosis* ve 1.3 skorla *Candida famata* tanımlama sonuçları elde edilmiş olup, izolat sayısının az olması nedeniyle hızlı tanımlama sonuçları değerlendirilirken mayalar dışlanmıştır.

Kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama üzerine daha önce yapılan çalışmalarda sonuç verme süreleri bir gece boyu inkübasyon yöntemiyle karşılaştırılmış olup, bizim kullandığımız kısa inkübasyon süreli rutin yöntem ile karşılaştırılmasına dair veri bulunmamaktadır.

Lagacé-Wiens ve ark. Sepsityper kitiyle kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS ile konvansiyonel tanımlama yöntemlerini (VITEK 2 ve API sistemiyle)

karşılaştırdığı çalışmada Sepsityper yöntemiyle tanımlama süresinde ortalama 34.3 saatlik azalma olduğunu göstermiştir (iki yöntemin ortalama tanımlama süreleri sırasıyla 6.6 ve 40.9 saat olarak bulunmuştur) [2].

Christner ve ark. direkt şişeden MALDI-TOF MS ile tanımlamanın, katı besiyerinden konvansiyonel tanımlama ile karşılaştırıldığında tanımlama süresini en az 1 iş günü kısalttığını ve kan kültürü pozitif sinyalinden sonra 2 saat içerisinde tür düzeyinde doğru tanımlama sağladığını belirtmiştir [17].

Schubert ve ark. pozitif kan kültürü şişelerinden direkt MALDI-TOF MS ile tanımlama yönteminin bakteri ve mayalar için biyokimyasal tanımlama yöntemiyle karşılaştırıldığında, *Enterobacterales* için 6-12 saat; anaerobik bakterilerde ise 48 saate kadar zaman kazandırdığını belirtmiştir [51]. Çalışmamızda kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile 3 anaerobik bakteri izole edilmiştir. Bunlar *Clostridium ramosum, Clostridium tertium* ve *Bacteroides fragilis* türleri olup hızlı tanımlama yöntemiyle rutin yönteme göre 22 ile 53 saat arasında daha erken sürede tür düzeyinde güvenilir skorlarla tanımlanmıştır.

Osthoff ve ark.'nın çalışmasında kan kültürü örneğinin alınmasından Sepsityper ve konvansiyonel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlamanın sonuçlanmasına kadar geçen süre hesaplanmış; Sepsityper kitiyle ortalama tanımlama süresi konvansiyonel tanımlamaya göre anlamlı derecede kısa bulunmuştur (iki yöntemin ortalama tanımlama süreleri sırasıyla 33.2 ve 59.1 saat olarak bulunmuştur) [85].

Meex ve ark. 47 kan kültürü şişesinde yaptıkları sonuç verme süresi analizinde, MALDI-TOF MS ile doğrudan tanımlamanın konvansiyonel yönteme göre, bakterilerin agar plaklardaki büyüme hızına ve kan kültürü şişesinden pozitif sinyalin alınma zamanına bağlı olmak üzere 1 ile 24 saat arasında zaman kazandırdığını bildirmiştir [86].

Vlek ve ark. yaptığı çalışmada farklı zamanlarda iki hasta grubunda 89 kan kültürü şişesinden direkt tanımlama ve standart tanımlama yöntemlerini uygulayarak ortalama sonuç verme süresini 45 saatten 16.4 saate indirdiğini ve bunun 24 saat içinde uygun antimikrobiyal tedavi alan hasta oranını %11.3 arttırdığını göstermiştir [87].

Bizim çalışmamızda rutinde uyguladığımız yöntem ile ortalama sonuç verme süremiz hali hazırda 16.7 saat iken hızlı tanımlama ile bu süre 7.9 saate (gündüz sinyal grubunda 2.9 saate) düşürülmüştür. Rutin uygulamamızda ortalama sonuç verme süremizin önceki çalışmalara kıyasla daha kısa olmasının sebebi kan kültürü işleyişimizde katı besiyerinde subkültür üremelerinin 4-5 saat aralıklarla gün içerisinde iki kez değerlendirerek yeterli üreme varlığında tanımlama işlemine almamızdan kaynaklanmaktadır. Uyguladığımız bu rutin yönteme kıyasla, çalışmamızda şişeden direkt tanımlamanın sonuç verme süresi açısından üstünlüğü olup olmadığı araştırılmıştır. Ortalama sonuç verme süresi hızlı yöntemde rutin tanımlama yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir (p<0.001). Çalışma dizaynında kan kültürü şişesinden pozitif sinyal alınma saatine göre örnekler gece ve gündüz sinyal grubu olmak üzere iki ayrı grup halinde incelenmiştir. Gündüz sinyal grubunda hızlı tanımlama ortalama sonuç verme süresi rutin tanımlama yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir (p<0.001). Gece sinyal grubunda ise ortalama sonuç verme süreleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır; bunun sebebi çalışma dizaynında hızlı tanımlama yönteminin sadece mesai saatleri içerisinde günde iki kez çalışılması; 16:00'dan sonra pozitif sinyal alınan şişelerin ertesi gün rutin yöntemle aynı zamanlarda değerlendirilmiş olmasıdır. Gündüz sinyal grubunda sonuç verme süresinin bu kadar kısaltılabilmesi, bu yöntemin sadece mesai saatlerinde günde iki kez çalışılmasıyla bile önemli derecede verimlilik sağlanabileceğini göstermektedir.

Ortalama sonuç verme sürelerinin Gram boyama özelliklerine göre dağılımına baktığımızda gündüz grubunda hızlı yöntemle tanımlama rutin yönteme göre Gram pozitif bakterilerde 19.65 saat; Gram negatif bakterilerde 12.67 saat daha kısa sürede sonuçlanmıştır. Gündüz sinyal grubunda Gram pozitiflerde rutin tanımlama süresi ortalama 22.46 saat iken Gram negatiflerde 15.59 saat olarak bulunmuştur. Bu farkın sebebi katı besiyeri kültürlerinde günde 2 kez üreme değerlendirmesi sonucunda yeterli üreme gösteren Gram negatif bakteri kolonilerinde rutin yöntemle aynı gün içerisinde tanımlama sonucu alınabilirken, Gram pozitif bakterilerde üreme süresinin daha uzun olmasından dolayı rutin tanımlama süresinin gecikmesidir.

Uyguladığımız hızlı yöntemle tüm örnekler aynı işleme tabi tutulduğundan, ortalama tanımlama süresi Gram boyanma özelliğine göre değişkenlik

göstermemektedir. Kan kültüründe etkenin erken tanımlanması ile Gram negatif bakterilerde ampirik antimikrobiyal tedavinin yönetimine katkı sağlanırken; Gram pozitif bakterilerde buna ek olarak kontaminant örneklerin kliniğe erken bildirilmesiyle gereksiz antimikrobiyal tedavinin önlenmesi de mümkündür.

Osthoff ve ark. kan kültürlerinde kontaminasyonun hızlı tespitinin, intravenöz antimikrobiyal tedavi süresinde kısalmayla sonuçlandığını göstermiştir [85]. Pozitif kan kültürü şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlamanın intravenöz antimikrobiyal tedavi süresine etki etmese de yerleşik bir antimikrobiyal yönetim programı uygulanan ortamda tedavi kalitesini artırabileceği belirtilmiştir [85]. Aynı çalışmada MALDI-TOF ile direkt tanımlama yapılan grupta daha düşük yoğun bakım ünitesi yatış oranı saptanmıştır.

French ve ark. kan kültüründe pozitif sinyal alındıktan sonra aynı gün içerisinde etkenin tanımlanmasının, antimikrobiyal duyarlılık sonuçları olmadan dahi tek başına potansiyel enfeksiyon odağının daraltılması ve uygun antimikrobiyal ajan seçimine yardımcı olarak kliniğe doğrudan etkisini göstermiştir [88].

Kim ve ark. kan kültürü şişesinden Sepsityper kitiyle doğrudan tanımlamaya eş zamanlı olarak kan kültürü şişesinden hızlı antibiyotik duyarlılık testini uygulamış, etkisiz ve suboptimal tedavi alan hastaların %56'sında, hızlı antibiyotik duyarlılık sonuçlarıyla 1 ile 2 gün önce optimal tedavinin başlanabileceğini; gereksiz geniş spektrumlu tedavi başlanan hastaların ise % 82'sinde 1 ile 2 gün erken deeskalasyona gidilebileceğini belirtmiştir [89].

Çalışmamızda kan kültüründe üreyen patojenin tanımlanması üzerine analizler yapılarak antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılmaması klinik sonuca katkıyı kısıtlamıştır. Eşzamanlı antimikrobiyal duyarlılık testleriyle sürdürülecek çalışmalar ile kliniğe yansımalar belirgin şekilde ortaya koyulabilir. Çalışmamızdaki bir diğer kısıtlılık, çalışma süresince kan kültüründe üreyen maya izolat sayımızın yetersiz olmasından dolayı hızlı yöntemin mayalardaki performansının değerlendirilememesidir. Çalışmamızın kısıtlılıklarından biri de hızlı tanımlamanın pozitif sinyal alınan şişelerde gün içerisinde periyodik olarak gruplar halinde gerçekleştirilmiş olmasıdır. İdeal şartlarda pozitif sinyal alınan şişe ivedilikle hızlı tanımlama işlemine alınırsa 20-30 dakika içerisinde sonuç verilebilirken, gruplar

halinde çalışma sonuç verme süresinde uzamaya neden olmuştur. Fakat bizim çalışmadaki esas amacımız kan kültüründe yoğun iş yükü gerektiren bu hızlı tanımlama uygulamasını rutin işleyişe entegre ederek sürdürülebilirliğini sağlamak olduğu için, bu anlamda kısıtlılık aslında gerçeği yansıtmaktadır.

SONUÇLAR

Çalışmamızda 328 pozitif kan kültürü şişesinden MALDI-TOF MS kullanılarak yapılan hızlı tanımlama yöntemi; monomikrobiyal örneklerde skordan bağımsız olarak %93.2 oranında (289/310) tür düzeyinde doğru tanımlama başarısı göstererek, ortalama sonuç verme süresini rutin tanımlamaya göre 16.63 saat kısaltmıştır.

Pozitif kan kültürü şişesinden doğrudan MALDI-TOF MS ile hızlı tanımlama yöntemiyle 120 Gram negatif bakteri %100; 190 Gram pozitif bakteri %88.9 oranında tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır. Gram negatif bakterilerin tümünde 1.7 ve üzerinde skorlar elde edilmiştir. Gram pozitif bakterilerde 1.7'den düşük skorlarda da doğru tanımlamalar saptanmıştır.

Hızlı tanımlama skor değerleri 1.2, 1.3, 1.4 ve üzerinde saptanan izolatlarda tür düzeyinde doğruluk oranları sırasıyla; %97.9, %98.9, %99.3 olarak saptanmıştır. Skor değerleri 1.5 ve üzerindeki izolatlarda tür düzeyinde %100 doğru tanımlama başarısı elde edilmiştir.

Pozitif sinyal alınan şişelerde günde iki kez periyodik hızlı tanımlama yönteminin uygulanmasıyla ortalama sonuç verme süresi kısa inkübasyon süreli rutin tanımlama yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede kısaltılmıştır.

Bu çalışmada pozitif sinyal alınan şişeden hızlı tanımlama işlemleri uygulanırken kendi laboratuvar koşullarımıza en uygun olan, rutinde yürütebileceğimiz günlük periyodik çalışma şekli tercih edilmiştir. İdeal koşullarda pozitif sinyal alındıktan itibaren her şişenin ivedilikle hızlı tanımlama işlemine alınması, sonuç verme süresinde daha da fazla iyileşme sağlayacaktır.

Sonuç olarak ek donanım veya kit gerektirmeyen, kolay uygulanan bu hızlı tanımlama yöntemiyle, günde iki kez periyodik çalışmayla bile ortalama tanımlama süresinin 16.63 saat kadar kısaltılabileceği gösterilmiştir. Rutin tanımlamada MALDI-TOF MS kullanan merkezlerde sonuç verme süresini iyileştirmek amacıyla bu yöntemin kullanılmasının hasta yönetimine olumlu katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] J. A. Delport, A. Strikwerda, A. Armstrong, D. Schaus, and M. John, "MALDI-ToF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 36, no. 7, pp. 1181–1186, 2017, doi: 10.1007/s10096-017-2906-y.

[2] P. R. S. Lagacé-Wiens *et al.*, "Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 10, pp. 3324–3328, 2012, doi: 10.1128/JCM.01479-12.

[3] B. W. Buchan, K. M. Riebe, and N. A. Ledeboer, "Comparison of the MALDI biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 2, pp. 346–352, Feb. 2012, doi: 10.1128/JCM.05021-11.

[4] W. Jamal, R. Saleem, and V. O. Rotimi, "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.*, vol. 76, no. 4, pp. 404–408, 2013, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.013.

[5] A. Verroken, L. Defourny, L. Lechgar, A. Magnette, M. Delmée, and Y. Glupczynski, "Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 34, no. 2, pp. 405–413, 2014, doi: 10.1007/s10096-014-2242-4.

[6] E. A. Idelevich, I. Schüle, B. Grünastel, J. Wüllenweber, G. Peters, and K. Becker, "Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 10, pp. 1001–1006, Oct. 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12640.

[7] R. Kohlmann, A. Hoffmann, G. Geis, and S. Gatermann, "MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, no. 4–5, pp. 469–479, 2015, doi: 10.1016/j.ijmm.2015.04.004.

[8] M. M. Bhatti, S. Boonlayangoor, K. G. Beavis, and V. Tesic, "Evaluation of filmarray and verigene systems for rapid identification of positive blood cultures," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 9, pp. 3433–3436, 2014, doi: 10.1128/JCM.01417-14.

[9] O. Altun, M. Almuhayawi, M. Ullberg, and V. Ozenci, “Clinical evaluation of the Filmarray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 12, pp. 4130–4136, 2013, doi: 10.1128/JCM.01835-13.

[10] S. Bryant *et al.*, “Evaluation of Microbiological Performance and the Potential Clinical Impact of the ePlex® Blood Culture Identification Panels for the Rapid Diagnosis of Bacteremia and Fungemia,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 10, p. 594951, 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.594951.

[11] T. D. Huang, E. Melnik, P. Bogaerts, S. Evrard, and Y. Glupczynski, “Evaluation of the EpLex blood culture identification panels for detection of pathogens in bloodstream infections,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.1128/JCM.01597-18.

[12] M. Kayin, B. Mert, S. Aydemir, and V. Özenci, “Comparison of rapid BACpro® II, Sepsityper® kit and in-house preparation methods for direct identification of bacteria from blood cultures by MALDI-TOF MS with and without Sepsityper® module analysis,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 11, pp. 2133–2143, Nov. 2019, doi: 10.1007/s10096-019-03654-4.

[13] L. F. Matthew, “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, no. 12, 2017.

[14] M. A. Arroyo and G. A. Denys, “Parallel evaluation of the MALDI sepsityper and verigene BC-GN assays for rapid identification of Gram-negative bacilli from positive blood cultures,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, no. 9, pp. 2708–2718, 2017, doi: 10.1128/JCM.00692-17.

[15] W. Moussaoui *et al.*, “Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, no. 11, pp. 1631–1638, 2010, doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x.

[16] S. Barnini, E. Ghelardi, V. Brucculeri, P. Morici, and A. Lupetti, “Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI-TOF plate,” *BMC Microbiol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1186/s12866-015-0459-8.

[17] M. Christner, H. Rohde, M. Wolters, I. Sobottka, K. Wegscheider, and M. Aepfelbacher, “Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption – Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting □ †,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1584–1591, 2010, doi: 10.1128/JCM.01831-09.

[18] Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği, *Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberi- Kan Dolaşımı Örnekleri*. 2017.

[19] J. M. Miller *et al.*, "A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 67, no. 6, pp. e1–e94, 2018, doi: 10.1093/cid/ciy381.

[20] M. D. Gonzalez, T. Chao, and M. A. Pettengill, "Modern Blood Culture: Management Decisions and Method Options," *Clinics in Laboratory Medicine*. W.B. Saunders, 2020, doi: 10.1016/j.cll.2020.07.001.

[21] BD Diagnostics, "AUTOMATED BLOOD CULTURE INSTRUMENT PROCEDURE BD BACTEC™ FX," 2008.

[22] T. C. Thorpe *et al.*, "BacT/Alert: An automated colorimetric microbial detection system," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1608–1612, 1990, doi: 10.1128/jcm.28.7.1608-1612.1990.

[23] P. Fidelman, K. Rygalski, J. Riley, D. Hernandez, and D. Wolk, "Characterization of Clinical Improvements After Implementation of New Blood Culture Strategy for Patients With Severe Sepsis," *Open Forum Infect. Dis.*, 2016, doi: 10.1093/ofid/ofw172.1423.

[24] J. Barenfanger *et al.*, "Decreased mortality associated with prompt Gram staining of blood cultures," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 130, no. 6, pp. 870–876, Dec. 2008, doi: 10.1309/AJCPVMDQU2ZJDPBL.

[25] H. D. Garcia, Lynne S.; Isenberg, *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 3rd Ed. ASM, 2007.

[26] W. Gary W., Procop; Deirdre, Church; Geraldine, Hall; William M., Janda; Elmer W., Koneman; Paul C., Schreckenberger; Gail L., *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 7th Ed. 2017, pp.167;300-302;712.

[27] C. M. O'Hara, "Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 1, pp. 147–162, 2005, doi: 10.1128/CMR.18.1.147-162.2005.

[28] S. Q. Van Veen, E. C. J. Claas, and E. J. Kuijper, "High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 900–907, 2010, doi: 10.1128/JCM.02071-09.

[29] Y. Yuan *et al.*, "Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry," *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 34, no. 4, pp. 1–6, 2020, doi: 10.1002/jcla.23119.

[30] P. M. Luethy and J. K. Johnson, "The Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for the Identification of Pathogens

Causing Sepsis," *The journal of applied laboratory medicine*, vol. 3, no. 4. pp. 675–685, 2019, doi: 10.1373/jalm.2018.027318.

[31] E. De Carolis *et al.*, "Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology," *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 8, no. 9, pp. 1081–1088, 2014, doi: 10.3855/jidc.3623.

[32] S. Lévesque *et al.*, "A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, p. 144878, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0144878.

[33] Z. Çizmeci, B. Otlu, E. Aktaş, S. Ördekçi, Ö. Açikgöz, and N. Güleç, "İdrar ve İdrar Dişi Klinik Örneklerden İzole Edilen GSBL Üreten Escherichia coli İzolatlarinda Yüksek Riskli ST131 Klonunun MALDI-TOF MS ve Gerçek Zamanli PCR ile Araştirilmasi," *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 52, no. 1, pp. 13–22, 2018, doi: 10.5578/mb.66475.

[34] N. Wellinghausen, B. Wirths, A. R. Franz, L. Karolyi, R. Marre, and U. Reischl, "Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 48, no. 4, pp. 229–241, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2003.11.005.

[35] R. P. H. Peters, P. H. M. Savelkoul, A. M. Simoons-Smit, S. A. Danner, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, and M. A. Van Agtmael, "Faster identification of pathogens in positive blood cultures by fluorescence in situ hybridization in routine practice," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 119–123, Jan. 2006, doi: 10.1128/JCM.44.1.119-123.2006.

[36] N. Wellinghausen *et al.*, "Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 47, no. 9, pp. 2759–2765, 2009, doi: 10.1128/JCM.00567-09.

[37] P. Josefson *et al.*, "Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 30, no. 9, pp. 1127–1134, 2011, doi: 10.1007/s10096-011-1201-6.

[38] O. Liesenfeld, L. Lehman, K.-P. Hunfeld, and G. Kost, "MOLECULAR DIAGNOSIS OF SEPSIS: NEW ASPECTS AND RECENT DEVELOPMENTS," *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, vol. 4, pp. 1–25, 2014, doi: 10.1556/EuJMI.4.2014.1.1.

[39] J. Dien Bard and E. McElvania, "Panels and Syndromic Testing in Clinical Microbiology," *Clin. Lab. Med.*, vol. 40, no. 4, pp. 393–420, 2020, doi: 10.1016/j.cll.2020.08.001.

[40] A. Croxatto, G. Prod'hom, C. Durussel, and G. Greub, "Preparation of a blood culture pellet for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing," *J. Vis. Exp.*, no. 92, pp.

1–7, 2014, doi: 10.3791/51985.

[41] J. M. López-Pintor *et al.*, "Direct antimicrobial susceptibility testing from the blood culture pellet obtained for MALDI-TOF identification of Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 6, pp. 1095–1104, 2019, doi: 10.1007/s10096-019-03498-y.

[42] S. Süzük Yıldız *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.*, vol. 54, no. 4, pp. 523–534, 2020, doi: 10.5578/mb.69849.

[43] T. K. W. Ling, Z. K. Liu, and A. F. B. Cheng, "Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 10, pp. 4705–4707, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.10.4705-4707.2003.

[44] Y. G. Bahçe, A. Toyran, and A. Aksoy, "Direct identification and determination of antimicrobial susceptibility of gram negative bacilli using the Phoenix™ FX system in blood cultures flagging positive," *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 53, no. 2, pp. 119–133, 2019, doi: 10.5578/mb.67842.

[45] C. Giordano, E. Piccoli, V. Brucculeri, and S. Barnini, "A Prospective Evaluation of Two Rapid Phenotypical Antimicrobial Susceptibility Technologies for the Diagnostic Stewardship of Sepsis," *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, no. Id, 2018, doi: 10.1155/2018/6976923.

[46] A. Jakovljev and K. Bergh, "Development of a rapid and simplified protocol for direct bacterial identification from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of- flight mass spectrometry," *BMC Microbiol.*, vol. 15, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s12866-015-0594-2.

[47] C. Sakarikou *et al.*, "Rapid and cost-effective identification and antimicrobial susceptibility testing in patients with Gram-negative bacteremia directly from blood-culture fluid," *J. Microbiol. Methods*, vol. 146, no. January, pp. 7–12, 2018, doi: 10.1016/j.mimet.2018.01.012.

[48] M. Azrad *et al.*, "Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology," *BMC Infect. Dis.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1186/s12879-019-3709-9.

[49] H. W. Pan, W. Li, R. G. Li, Y. Li, Y. Zhang, and E. H. Sun, "Simple sample preparation method for direct microbial identification and susceptibility testing from positive blood cultures," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. MAR, pp. 1–9, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00481.

[50] L. Simon, E. Ughetto, A. Gaudart, N. Degand, R. Lotte, and R. Ruimy, "Direct identification of 80 percent of bacteria from blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption

ionization-time of flight mass spectrometry using a 10-minute extraction protocol," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 1–22, 2019, doi: 10.1128/JCM.01278-18.

[51] S. Schubert *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. Diagnostics*, vol. 13, no. 6, pp. 701–706, 2011, doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.07.004.

[52] P. Turner *et al.*, "Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO): A framework for the reporting and interpretation of clinical microbiology data," *BMC Med.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1186/s12916-019-1301-1.

[53] J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 1988, pp.25-27.

[54] A. Kumar *et al.*, "Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock," *Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 6, pp. 1589–1596, 2006, doi: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.

[55] E. A. Idelevich and K. Becker, "Identification and Susceptibility Testing from Shortly Incubated Cultures Accelerate Blood Culture Diagnostics at No Cost," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 62, no. 2. Oxford University Press, pp. 268–269, Jan. 15, 2016, doi: 10.1093/cid/civ824.

[56] S. L. Mitchell and K. Alby, "Performance of microbial identification by MALDI-TOF MS and susceptibility testing by VITEK 2 from positive blood cultures after minimal incubation on solid media," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 36, no. 11, pp. 2201–2206, 2017, doi: 10.1007/s10096-017-3046-0.

[57] J. B. Zabbe, L. Zanardo, F. Mégraud, and E. Bessède, "MALDI-TOF mass spectrometry for early identification of bacteria grown in blood culture bottles," *J. Microbiol. Methods*, vol. 115, pp. 45–46, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.mimet.2015.04.009.

[58] R. Kohlmann, A. Hoffmann, G. Geis, and S. Gatermann, "MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, no. 4–5, pp. 469–479, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.ijmm.2015.04.004.

[59] U. Su Topalca, N. Saygili, N. Anliacik, M. E. Bulut, and E. Aktas, "The evaluation of urine samples by Gram staining and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in rapid diagnosis of urinary tract infections," *Med. Bull. Sisli Hosp.*, vol. 4, pp. 298–302, 2017, doi: 10.5350/semb.20170721081035.

[60] H. L. Köhling *et al.*, "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.*, vol. 61, no. 3, pp. 339–344, 2012, doi: 10.1099/jmm.0.032284-0.

[61] L. Ferreira *et al.*, "Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry," *Clin Microbiol Infect*, vol. 17, pp. 546–551, 2011, doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x.

[62] M. A. Arroyo and G. A. Denys, "Parallel evaluation of the MALDI sepsityper and verigene BC-GN assays for rapid identification of Gram-negative bacilli from positive blood cultures," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, no. 9, pp. 2708–2718, Sep. 2017, doi: 10.1128/JCM.00692-17.

[63] B. La Scola and D. Raoult, "Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry," *PLoS One*, vol. 4, no. 11, p. e8041, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0008041.

[64] L. G. Stevenson, S. K. Drake, and P. R. Murray, "Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 2, pp. 444–447, 2010, doi: 10.1128/JCM.01541-09.

[65] A. Kiliç and M. Baysallar, "Stafilokoklarin Pozitif Kan Kültür Şişelerinden MALDI-TOF MS Sistemi ile Direkt Olarak Tanimlanmasi," *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 48, no. 3, pp. 377–384, 2014, doi: 10.5578/mb.7873.

[66] F. Çetin, "Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılıkları Microorganisms isolated from blood cultures and their antimicrobial susceptibilities," vol. 71, no. 2, pp. 67–74, 2014.

[67] M. Turhanoglu, "Evaluation of the Results Obtained from Microbiological Analysis of Blood Cultures over 5 Years," *J. Fam. Med. Heal. Care*, vol. 2, no. 4, p. 43, 2016, doi: 10.11648/j.jfmhc.20160204.14.

[68] V. Mataj *et al.*, "An investigation into bacterial bloodstream infections and antibiotic resistance profiles in a tertiary hospital for a ten-year period," *Clin. Lab.*, vol. 66, no. 8, pp. 1467–1477, 2020, doi: 10.7754/Clin.Lab.2020.191033.

[69] T. Müderris *et al.*, "Microorganisms isolated from blood cultures and the change of their antimicrobial susceptibility patterns in the last five years," *Turk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.*, vol. 76, no. 3, pp. 231–242, 2019, doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.65902.

[70] S. Yilmaz, R. Gümral, M. Güney, O. Bedir, A. üsküdar G. S. Duyan, and A. C. Başustaoğlu, "Evaluation of microorganisms isolated from blood cultures and their susceptibility to antibiotics in two year period," *Gulhane Med. J.*, vol. 55, no. 4, pp. 247–252, 2013, doi: 10.5455/gulhane.24245.

[71] A. Çopur-Çiçek, “Rize 82 . Yıl Devlet Hastanesi ’ nde bir yıllık sürede kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları * Microorganisms isolated from blood cultures during the period of one year at the 82 nd Year Rize State Hospital an,” vol. 68, no. 4, pp. 175–184, 2011.

[72] S. Wu, J. Xu, C. Qiu, L. Xu, Q. Chen, and X. Wang, “Direct antimicrobial susceptibility tests of bacteria and yeasts from positive blood cultures by using serum separator gel tubes and MALDI–TOF MS,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 157, no. July 2018, pp. 16–20, 2019, doi: 10.1016/j.mimet.2018.12.011.

[73] Y. L. Huang, Q. L. Sun, J. P. Li, Y. Y. Hu, H. W. Zhou, and R. Zhang, “Evaluation of an in-house maldi-tof ms rapid diagnostic method for direct identification of micro-organisms from blood cultures,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 68, no. 1, pp. 41–47, 2019, doi: 10.1099/jmm.0.000866.

[74] M. G. Barberino, M. de O. Silva, A. C. P. Arraes, L. C. Correia, and A. V. Mendes, “Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS),” *Brazilian J. Infect. Dis.*, vol. 21, no. 3, pp. 339–342, 2017, doi: 10.1016/j.bjid.2017.03.007.

[75] G. Prod’Hom, A. Bizzini, C. Durussel, J. Bille, and G. Greub, “Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification From positive blood culture pellets,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 1481–1483, 2010, doi: 10.1128/JCM.01780-09.

[76] W. Moussaoui *et al.*, “Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, no. 11, pp. 1631–1638, 2010, doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x.

[77] N. G. Morgenthaler and M. Kostrzewa, “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.*, vol. 2015, p. 827416, 2015, doi: 10.1155/2015/827416.

[78] D. Martiny, A. Dediste, O. Vandenberg, and O. Vandenberg, “Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 9, pp. 2269–2281, 2012, doi: 10.1007/s10096-012-1566-1.

[79] D. Fuglsang-Damgaard, C. H. Nielsen, E. Mandrup, and K. Fuursted, “The use of Gram stain and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on positive blood culture: Synergy between new and old technology,” *Apmis*, vol. 119, no. 10, pp. 681–688, 2011, doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02756.x.

[80] A. Scohy *et al.*, “Evaluation of the Bruker® MBT Sepsityper IVD module for the identification of polymicrobial blood cultures with MALDI-TOF MS,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 37, no. 11, pp. 2145–2152, Nov. 2018, doi: 10.1007/s10096-018-3351-2.

[81] L. Ponderand *et al.*, “Evaluation of Rapid Sepsityper® protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS,” *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 19, no. 1, 2020, doi: 10.1186/s12941-020-00403-w.

[82] JAMES H. JORGENSEN and MICHAEL A. PFALLER, *Manual of Clinical Microbiology*. 2015.

[83] CABI, “Mannheimia haemolytica. In: Invasive Species Compendium.,” *Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc.*, 2020. https://www.cabi.org/isc/datasheet/70912 (accessed Jan. 10, 2020).

[84] JAMES H. JORGENSEN and MICHAEL A. PFALLER, *Manual of Clinical Microbiology*. 2015, p.655.

[85] M. Osthoff *et al.*, “Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial,” 2016, doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.009.

[86] C. Meex *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.*, vol. 61, no. PART 11, pp. 1511–1516, 2012, doi: 10.1099/jmm.0.044750-0.

[87] A. L. M. Vlek, M. J. M. Bonten, and C. H. E. Boel, “Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0032589.

[88] K. French, J. Evans, H. Tanner, S. Gossain, and A. Hussain, “The clinical impact of rapid, direct MALDI-ToF identification of bacteria from positive blood cultures,” *PLoS One*, vol. 11, no. 12, pp. 1–9, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0169332.

[89] J. H. Kim *et al.*, “Direct rapid antibiotic susceptibility test (dRAST) for blood culture and its potential usefulness in clinical practice,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 67, no. 3, pp. 325–331, 2018, doi: 10.1099/jmm.0.000678.