



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
ANKARA ETLİK ŞEHİR HASTANESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ

**POZİTİF SİNYAL VEREN KAN KÜLTÜR  
ŞİŞELERİNDEN MALDI TOF MS İLE DİREKT  
TANIMLAMA VE BD PHOENIX OTOMATİZE  
SİSTEMİ İLE DİREKT ANTİBİYOTİK  
DUYARLILIK TESTİ ÇALIŞILMASI**

**Dr. Gülşah MİROĞLU**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA/2023**





T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
ANKARA ETLİK ŞEHİR HASTANESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ

**POZİTİF SİNYAL VEREN KAN KÜLTÜR  
ŞİŞELERİNDEN MALDI TOF MS İLE DİREKT  
TANIMLAMA VE BD PHOENIX OTOMATİZE  
SİSTEMİ İLE DİREKT ANTİBİYOTİK  
DUYARLILIK TESTİ ÇALIŞILMASI**

**Dr. Gülşah MİROĞLU**

**Tez Danışmanı:**

**Mik. Uzm. Mustafa ÇAĞATAY**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA/2023**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim ve tez sürecim boyunca bilgi ve tecrübelerini her daim bizimle paylaşan, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Ümmü Gül ERDEM'e;

Hem eğitim sürecimde hem de tez yapım aşamasında destekleri daim olan çok değerli hocam ve tez danışmanım Uzm. Dr. Mustafa ÇAĞATAY'a;

Eğitim sürecimde kısa süreliğine de olsa birlikte çalışma fırsatı bulduğum, tez yazım sürecinde desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Ayfer BAKIR'a;

Asistanlık sürecim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım, tecrübelerini benimle her daim paylaşan tüm uzmanlarımıza ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum, beraber huzurlu ve keyifli vakit geçirdiğim tüm asistan arkadaşlarıma;

Tez çalışmamın her aşamasında bilgisi ve yardımseverliğiyle yanımda olan değerli arkadaşım Dr. Elif ÇALIŞKAN'a;

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, sevinçli ve üzüntülü her halimde yanımda olan sevgili arkadaşlarım Dr. Elif Tuğçe GÜNER ve Dr. Didem ÖZKAN'a;

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, hayatımın her döneminde sevgi ve ilgileriyle en büyük destekçim olan annem Meryem ORAK, babam Halit ORAK ve tüm aileme,

Desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim, hayat arkadaşım, sevgili eşim Ömer MİROĞLU'na ve biricik oğlum Adil Kerem MİROĞLU'na çok teşekkür ederim.

*Dr. Gülşah MİROĞLU*

*Ankara, 2023*

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. BAKTERİYEMİ VE SEPSİS.....	3
2.2. KAN KÜLTÜRÜ.....	4
2.2.1. Kan Kültürü Örneklerinin Alınması.....	4
2.2.2. Otomatize Kan Kültür Sistemleri.....	5
2.2.3. Pozitif Sinyal Veren Kan Kültürü Şişelerinin Değerlendirilmesi....	6
2.3. TANIMLAMA VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	7
2.3.1. Otomatize Tanımlama ve Duyarlılık Sistemleri.....	7
2.3.1.1. Phoenix (Becton Dickinson, ABD).....	8
2.3.1.2. Vitek 2 (bioMérieux, Fransa).....	8
2.3.1.3. MicroScan (Beckman Coulter, ABD).....	9
2.3.2. Kütle Spektrometrisine Dayalı Tanımlama Sistemleri.....	9
2.3.3. Moleküler Tanımlama Yöntemleri.....	11
2.3.4. Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI TOF MS.....	12
2.3.5. Direkt Kan Kültür Şişesinden Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	13

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>14</b>
3.1. ÇALIŞMAYA ALINAN NUMUNELER.....	14
3.2. KAN KÜLTÜRÜ LABORATUVAR İŞLEYİŞİ.....	15
3.2.1. Kan Kültürü Cihazında İnkübasyon.....	15
3.2.2. Pozitif Sinyal Sonrası Rutin Prosedür.....	16
3.3. RUTİN TANIMLAMA VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ.....	16
3.3.1. MALDI TOF MS ile Tanımlama.....	16
3.3.2. Otomatize Sistemde Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	17
3.4. DİREKT TANIMLAMA VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ....	18
3.4.1. Bakteri Süspansiyonunun Elde Edilmesi.....	18
3.4.2. Direkt MALDI TOF MS ile Tanımlama.....	19
3.4.3. Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	20
3.5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	20
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	21
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>22</b>
4.1. TANIMLAMA SONUÇLARI.....	22
4.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI.....	26
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>32</b>
<b>6. SONUÇLAR.....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>40</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>48</b>
Ek-1. Etik Kurul Kararı.....	48
Ek-2. Tez Konusu Onay Kararı.....	49
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>51</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AMC</b>	: Amoksisilin klavulanik asit
<b>BD</b>	: Becton and Dickinson Company
<b>CDC</b>	: Center for Disease Control and Prevention
<b>EMB</b>	: Eosin Metilen Blue
<b>HACEK</b>	: <i>Haemophilus, Actinobacillus, Cardiobacterium, Eikenella, Kingella</i>
<b>HCCA</b>	: $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinnamik asit
<b>KKA</b>	: Koyun Kanlı Agar
<b>KNS</b>	: Koagülaz Negatif stafilokok
<b>MALDI-TOF MS</b>	: Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
<b>PCR</b>	: Polymerase chain reaction
<b>PNA FISH</b>	: Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridisation
<b>RT-PCR</b>	: Reverse Transkriptaz PCR
<b>SF</b>	: Serum Fizyolojik
<b>SST</b>	: Serum Seperator Tube

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Gram Negatif Bakterilerin Direkt Tanımlama Sonuçları ve Skorları.....	23
<b>Tablo 2:</b> Gram Pozitif Bakterilerin Direkt Tanımlama Sonuçları ve Skorları.....	24
<b>Tablo 3:</b> Bütün İzolatların Direkt Tanımlama Sonuçları.....	25
<b>Tablo 4:</b> Cins Düzeyinde Doğru Tanımlanan İzolatların Rutin Tanımlama ve Direkt Tanımlama Sonuçları.....	25
<b>Tablo 5:</b> Anaerop Bakterilerin MALDI TOF MS Skorları ve Skor Kategorileri...	26
<b>Tablo 6:</b> Bakterilere Göre Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları.....	27
<b>Tablo 7:</b> <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesine Ait İzolatların (n=49) Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları.....	28
<b>Tablo 8:</b> Nonfermenter Gram Negatif Bakterilerin (n=21) Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları.....	29
<b>Tablo 9:</b> <i>Staphylococcus</i> Türlerinin (n=25) Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları.....	30
<b>Tablo 10:</b> <i>Enterococcus</i> (n=20) ve <i>Streptococcus</i> (n=5) Türlerinin Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları.....	31

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b> MALDI TOF MS'in çalışma prensibi.....	10
<b>Şekil 2:</b> BD BACTEC FX otomatize kan kültürü sistemi.....	15
<b>Şekil 3:</b> MALDI Biotyper.....	17
<b>Şekil 4:</b> BD Phoenix M50 otomatize sistemi.....	18
<b>Şekil 5:</b> Kan kültür şişesinden serum ayırıcı tüpe alınan örneğin santrifüj öncesi ve sonrası görünümü.....	19



## ÖZET

### **Pozitif Sinyal Veren Kan Kültür Şişelerinden MALDI TOF MS İle Direkt Tanımlama ve BD Phoenix Otomatize Sistemi İle Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Çalışması**

**Amaç:** Bu çalışmada pozitif sinyal veren kan kültür şişelerinden serum ayırıcı tüp yöntemi kullanılarak, MALDI TOF MS ile direkt tanımlama ve Phoenix otomatize sistemi ile direkt antibiyotik duyarlılık testi çalışması; sonuçların katı besiyerinde üreme sonrası yapılan tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarıyla karşılaştırılarak uyumun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** 01.09.2022–30.11.2022 tarihleri arasında hastanemizin çeşitli kliniklerinden kan dolaşımı enfeksiyonu ön tanısıyla alınıp Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve BACTEC FX kan kültür cihazına yerleştirilen kan kültürü şişelerinden pozitif sinyal veren 203 adet kan kültürü şişesi çalışmaya dahil edilmiştir. Kan kültür şişelerinden serum ayırıcı tüp yöntemiyle elde edilen bakteri süspansiyonu kullanılarak MALDI TOF MS ile tanımlama yapıldı. Direkt tanımlama sonucuna göre etken olarak değerlendirilen örneklerden Phoenix otomatize sisteminde direkt antibiyotik duyarlılık testi çalışıldı. Sonuçlar rutin yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Direkt MALDI TOF MS yöntemiyle 70 Gram negatif bakterinin %98,6'sı tür düzeyinde, %1,4'ü sadece cins düzeyinde doğru tanımlandı. Yanlış tanımlanan veya tanımlanamayan Gram negatif bakteri olmadı. Gram pozitif 130 bakterinin ise %85,4'ü tür düzeyinde, %6,1'i sadece cins düzeyinde doğru tanımlandı. Yanlış tanımlanan olmazken, %8,5'i direkt yöntemle tanımlanamadı. Çalışmaya dahil edilen kan kültür şişelerinden 3'ünde anaerop bakteri üremesi oldu. Anaerop kültür yapılamadığı için bu bakteriler rutin yöntemle tanımlanamadı. Direkt MALDI TOF MS yöntemiyle 3 bakteri de tür düzeyinde güvenilir skor değerleriyle tanımlandı. Etken olarak değerlendirilen 120 bakteri için direkt yöntemle Phoenix cihazında antibiyotik duyarlılığı çalışıldı. Gram negatif 70 bakteri için toplam 1115 bakteri-antibiyotik kombinasyonu test edildi. Kategorik uyum %96,1, küçük hata

%1,7, büyük hata %1,25 ve çok büyük hata %1,25 olarak tespit edildi. Gram pozitif 50 bakteride çalışılan 643 testte kategorik uyum %98,1, küçük hata %0,15, büyük hata %0,5 ve çok büyük hata %1,25 olarak saptandı. Çalışmamızda direkt yöntemle çalışılan antibiyotik duyarlılık testleri değerlendirildiğinde, kategorik uyum >%90, büyük hata oranı <%3 ve çok büyük hata oranı <%1,5 olduğundan rutin yöntemle kabul edilebilir düzeyde uyumlu olduğu saptandı.

**Sonuç:** Hızlı, kolay ve düşük maliyetli olan serum ayırıcı tüp yönteminin, direkt kan kültür şişelerinden tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testi çalışılmasında etkili bir yöntem olduğu ve rutin yöntemle kabul edilebilir düzeyde uyumlu sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Bu yöntemle pozitif sinyal sonrası 1 saatten kısa sürede patojen bakteri tanımlanabilmekte ve antibiyotik duyarlılık testleri rutin yöntemle göre yaklaşık 24 saat daha erken sonuçlanmaktadır. Bunun da sepsis tanılı hastalarda hedefe yönelik tedavinin daha erken başlanmasını ve mortalitenin azaltılmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kan kültürü, direkt tanımlama, MALDI-TOF MS, Phoenix

## ABSTRACT

### **Direct identification with MALDI TOF MS and direct antibiotic susceptibility testing with the BD Phoenix automated system from positive blood culture bottles**

**Aim:** The aim of this study is to compare the results of direct identification by MALDI TOF MS and direct antibiotic susceptibility testing by the Phoenix automated system from positive blood cultures using serum separator tube method, with the results of conventional identification and antibiotic susceptibility testing from the solid agar and to evaluate the compliance between two methods.

**Material and Method:** A total of 203 positive blood culture bottles that had been sent to the Microbiology Laboratory from various clinics of our hospital with prediagnosis of bloodstream infection between September 1, 2022 and November 31, 2022 and placed in the BACTEC FX blood culture system were included in this study. Identification was performed with MALDI TOF MS using the bacterial suspension obtained from blood culture bottles by serum separator tube method. Direct antibiotic susceptibility test was performed with Phoenix automated system from the samples that were evaluated as causative according to the direct identification result. The results were compared with the results obtained by the routine method.

**Results:** With the direct MALDI TOF MS method, 98.6% of 70 Gram negative bacteria were correctly identified at the species level, and 1.4% at the genus level only. There were no misidentified or unidentified Gram negative bacteria. Of the 130 Gram positive bacteria, 85.4% were correctly identified at the species level, and 6.1% only at the genus level. While there was no misidentification, 8.5% could not be identified by the direct method. Anaerobic bacteria growth was observed in 3 of the blood culture bottles included in the study. Since anaerobic culture could not be done, these bacteria could not be identified by the routine method. With the direct MALDI TOF MS method, all 3 bacteria were identified with reliable score values at the species level. Antibiotic susceptibility was studied on the Phoenix device with the

direct method for 120 bacteria that were considered as causative agents. A total of 1115 bacteria-antibiotic combinations were tested for 70 Gram-negative bacteria. Categorical agreement was 96.1%, with a minor error, major error and very major error rate of 1.7, 1.25, and 1.25%, respectively. In 643 tests studied on 50 Gram positive bacteria, categorical agreement was found as 98.1%, with a minor error, major error, and very major error rate of 0.15, 0.5 and 1.25%, respectively. When the antibiotic susceptibility tests performed with the direct method were evaluated in our study, it was found to be compatible with the routine method at an acceptable level, since the categorical agreement was >90%, the major error rate was <3% and the very major error rate was <1.5%.

**Conclusion:** It has been shown that the serum separator tube method, which is fast, easy and low-cost, is an effective method for identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood culture bottles, and results consistent with the routine method were obtained.. With this method, pathogenic bacteria can be identified in less than 1 hour after a positive signal, and antibiotic susceptibility tests are concluded approximately 24 hours earlier than the routine method. It is thought that this will enable earlier initiation of targeted therapy in patients with a diagnosis of sepsis and a reduction in mortality.

**Keywords:** Blood culture, direct identification, MALDI-TOF MS, Phoenix

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan dolaşımı enfeksiyonları bütün dünyada en önemli ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (1). İnvaziv prosedürlerin uygulanması ve immünsüpresif hasta sayısının önemli oranda artmasıyla birlikte sepsis görülme sıklığı ve mortalitesi de giderek artmaktadır (2). Dünya çapında tahmini sepsis prevalansı yılda 19 milyon vakayı aşmaktadır (3).

Kan kültürü; patojen mikroorganizmanın tanımlanmasını ve in vitro antimikrobiyal duyarlılık profilinin belirlenmesini sağladığı için sepsisin mikrobiyolojik tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (2,4). Günümüzde mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan konvansiyonel yöntemde; pozitif sinyal veren kan kültür şişesinden katı agarlara ekim yapıp, 18-24 saat inkübasyon sonrasında elde edilen kolonilerden tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışılmaktadır (5). Gelişmiş otomatize sistemlere rağmen bu yöntemde, kan kültür şişesi pozitifliğinden sonra koloni büyümesi ve izolasyonu için en az bir gece inkübasyon gerekmektedir. Patojen mikroorganizmanın erken tanımlanması ve hedefe yönelik tedavinin erken başlanması; tedavi yanıtı ve antimikrobiyal direnç gelişiminin önlenmesi açısından çok önemlidir (1,5). Uygun antimikrobiyal tedavinin başlanmasındaki her bir saatlik gecikme; mortaliteyi %7,6 oranında artırmaktadır (6). Bunun yanında hastaların yatış süresinin ve maliyetinin de artmasına neden olmaktadır (7).

Son yıllarda Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) mikroorganizmaların tanımlanmasında yeni bir standart olarak ortaya çıkmıştır (1). Hızlı, ucuz ve doğru sonuç veren bir teknoloji olmasıyla dünya çapındaki klinik laboratuvarlarda yerini almaktadır (8–10). Bakteri ve mayaları dakikalar içinde tanımlayabilmesine rağmen, konvansiyonel yöntemde MS analizi için izole koloniler kullanıldığından kan kültürünün katı agara ekimi sonrası 18-24 saat inkübasyonunu gerektirir. Direkt kan kültür şişelerinden MS analizi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (11,12). Bu yöntemlerin çoğu; eritrositlerin hemolizi ve kan hücreleri ile mikroorganizmaların ayrılması için birkaç santrifüj basamağından oluşmaktadır. Bunun için çeşitli solüsyonlar ve ek

malzemelere ihtiyaç duyulmaktadır (13–15). Laboratuvarda geliştirilen prosedürlerin yanı sıra, solüsyon hazırlama ve ek ekipman satın alma konularında zaman tasarrufu sağlayan birkaç ticari kit geliştirilmiştir. Bu kitlerin en önemli dezavantajı yüksek maliyetleridir (16–18). Kan kültür şişesinden bakteri süspansiyonu elde etmede serum ayırıcı tüpler de denenmektedir. Bu tüpler kullanılarak geliştirilen yöntemler diğerlerine göre daha az basamaklı ve düşük maliyetlidir. Özellikle gram negatif bakterilerin tanımlanmasında başarılı sonuçlar elde edilmektedir (2,5,19,20).

Kan kültürü şişesinden direkt tanımlama ile birlikte direkt antibiyotik duyarlılık testi yapılması ile ilgili de çalışmalar vardır. Bu yöntemler kullanıldığında antibiyotik duyarlılık sonuçları konvansiyonel yöntemlere göre 24 saat daha erken verilebilir. Bu da hedefe yönelik antibiyotik tedavisinin erken başlanması ve mortalitenin azaltılması açısından çok önemlidir. Direkt kan kültür şişesinden otomatize sistemlerle antibiyotik duyarlılık testi yapılan kısıtlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların bir kısmında ek malzeme gerektiren, maliyetli yöntemler kullanılmış, bir kısmında ise sadece gram negatif bakteriler ile çalışılmıştır (4,21,22). Günlük laboratuvar rutininde uygulanabilecek basit, hızlı, ucuz yöntemlerin kullanıldığı ve daha fazla bakteri türü ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada pozitif sinyal veren kan kültür şişelerinden serum ayırıcı tüp yöntemi ile elde edilen bakteri süspansiyonu kullanılarak MALDI-TOF MS ile bakteri tanımlanması ve BD Phoenix otomatize sisteminde antibiyotik duyarlılık testleri çalışılmasının laboratuvarımızda uygulanabilirliği ve sonuçların doğruluğunun test edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. BAKTERİYEMİ VE SEPSİS

Bakteriyemi; kan dolaşımında canlı bakteri bulunması olarak tanımlanmaktadır. Katater ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu veya enfektif endokardit gibi endovasküler nedene bağlı olan bakteriyemiler primer bakteriyemi, apse veya pnömoni gibi endovasküler nedene bağlı olmayan bakteriyemiler sekonder bakteriyemi olarak isimlendirilir (23).

Bakteriyemi; geçici, aralıklı veya sürekli olarak da sınıflandırılabilir. Geçici bakteriyemi genellikle bir müdahale (diş çekimi, ürolojik işlemler vb.) sonrası flora bakterilerinin kana geçmesi sonucunda gelişir. Sağlıklı kişilerde kana geçen bakteriler konak immün sistemi tarafından kısa sürede ortadan kaldırılırlar (24). Aralıklı bakteriyemi apse, pnömoni, artrit gibi bazı klinik durumlarda etken bakterilerin enfeksiyon odağından aralıklarla kana geçmesi durumudur. Sürekli bakteriyemi ise enfektif endokardit, katater ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu, septik trombüs gibi intravasküler kaynaklı enfeksiyonlarda görülür. Ayrıca bruselloz ve tifo gibi sistemik enfeksiyonların erken dönemlerinde de görülür (25).

Sepsis ise enfeksiyona karşı düzensiz konak yanıtının neden olduğu ciddi ve hayatı tehdit eden organ işlev bozukluğu olarak tanımlanmaktadır (26). Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde çok sayıda ölüme ve yüksek sağlık bakımı harcamalarına neden olan küresel bir halk sağlığı sorunudur (27). Sepsis insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda 100.000 kişide 535 vakaya kadar ulaşmış ve artmaya devam etmektedir (28). Sepsis tüm dünyada hastanede yatan hastalarda en önemli ölüm nedenlerinden biri olmakla birlikte, mortalite oranları %30 ile %70 arasında değişmektedir (29). Tanı ve hedefe yönelik tedavinin başlanması için geçen süre mortalite insidansının kritik belirleyicisidir. Uygun antibiyotiklerin başlanmasında 6 saatten sonraki her bir saatlik gecikme sağkalımda %7,6'lık bir azalmaya neden olurken, uygun olmayan antibiyotiklerin kullanılması sağkalımda yaklaşık 5 kat azalma ile ilişkilendirilmiştir (30). Hedefe yönelik tedavideki gecikme mortaliteyi arttırmasının yanında geniş spektrumlu

antimikrobiyal ilaçların kullanılması sonucunda dirençli mikroorganizmaların seçilmesine ve yayılmasına da neden olmaktadır (31).

## **2.2. KAN KÜLTÜRÜ**

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının en önemli görevlerinden biri kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların tespitidir (32). Kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında altın standart kan kültürüdür (31). Kan kültürleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışılan en değerli örneklerden biridir. Kan dolaşımı enfeksiyonlarının sadece %35'inde kan kültürleri pozitif sonuç verse de etken mikroorganizmanın izole edilmesinin yanında antimikrobiyal duyarlılık testlerinin de yapılmasını sağladığı için halen tanıda en değerli yöntemdir (23). Gerçek etkenlerin tespit edilmesi ve tüm pozitif bulguların en hızlı şekilde klinisyene bildirilmesi, ampirik tedaviden etkene yönelik en uygun tedaviye geçilmesinde klinisyene yol göstermesi açısından çok önemlidir.

### **2.2.1. Kan Kültürü Örneklerinin Alınması**

Kaliteli kan kültürü sonuçlarının elde edilmesi için en fazla hata kaynağı olan preanalitik süreçte görev alan sağlık çalışanlarına, ideal kan kültürü seti sayısı, alınması gereken kan miktarı, kan kültürü alınma zamanı ve kontaminasyonu azaltacak önlemler hakkında eğitim verilmelidir (33).

Kan kültürü seti, tek bir damar girişimi ile alınan kanın paylaştırıldığı kan kültür şişelerinin tümü olarak tanımlanmaktadır. Erişkin hastalarda bir set, ideal olarak bir aerobik ve bir anaerobik kan kültür şişesini içermelidir. Alınması gereken kan kültürü set sayısı hastanın klinik durumuna göre değişmekle birlikte genel olarak bakteriyemi veya fungemi şüpheli hastalarda farklı venlerden iki set kan kültürü alınması önerilmektedir. Her bir kan kültürü seti için erişkin hastalarda 20-30ml kan alınmalıdır. Alınan kan miktarı kan kültürünün duyarlılığını etkileyen en önemli faktördür. Alınan kan miktarı arttıkça etkenin izole edilme ihtimali artar ve kan kültürünün pozitif sinyal verme süresi kısalmır (23).

Kan kültürü hiçbir hasta grubunda rutin bir tetkik olarak görülmemelidir, sadece klinik gereklilik durumunda kan kültürü alınmalıdır (34). İdeal kan kültürü alma zamanı kanda mikroorganizma konsantrasyonunun en yüksek olduğu, ateşin çıkmasından önceki 30-60 dakikalık dönemdir. Ancak hastalarda bu dönem öngörülemediği için belirtiler (ateş, üşüme, titreme) başlar başlamaz en kısa sürede örnek alınmalıdır (35). Ampirik antimikrobiyal tedavi başladıktan sonra kan kültürü duyarlılığı azalmaktadır, bu nedenle kan kültürleri antimikrobiyal tedavi başlanmadan önce alınmalıdır (36).

Kontaminasyon riskini azaltmak için erişkinlerde kültür alınacak bölgenin %70'lik alkol ile temizlenip, kuruduktan sonra %2 klorheksidin glukonat veya %1-2 iyot tentürü ile silinmesi ve etki etmesi için 1-2 dakika beklenmesi gerekmektedir. Beklerken kan kültür şişesinin steril olmayan lastik tıpasının da %70'lik alkol veya %2 klorheksidin glukonat ile silinmesi önerilmektedir (23).

Kan kültürü örnekleri doğru bir şekilde alındıktan sonra en geç iki saat içinde laboratuvara gönderilmelidir. Taşıma sırasında kan kültür şişeleri oda sıcaklığında tutulmalı, buzdolabına veya dondurucuya koyulmamalıdır. İki saatlik sürenin aşılması durumunda örneklerin kan kültür cihazlarına yerleştirilmesi gecikeceği için üremenin saptanması gecikebilir veya engellenebilir (34).

### **2.2.2. Otomatize Kan Kültür Sistemleri**

Günümüzde mikrobiyoloji laboratuvarlarında kan kültürü şişelerinin inkübasyonu ve üreme göstergelerinin takibi amacıyla sürekli monitörize kan kültür sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemlerin geliştirilmesi kan kültürlerinin standardizasyonunda çok önemli bir gelişme olmuştur. Bu cihazların kullanımı laboratuvardaki iş yükünün, kan kültürlerinin inkübasyon süresinin ve kontaminasyon oranlarının azalmasını sağlamaktadır (37).

BacT/Alert (bioMérieux, Fransa), BACTEC (Becton Dickinson, ABD) ve VersaTREK (Thermo Scientific, ABD) olmak üzere klinik olarak onaylanmış üç ticari otomatize kan kültür sistemi bulunmaktadır (32). Bu sistemler farklı kapasitelerde inkübatör bir cihaz ve bu cihaza uyumlu kan kültür şişeleri ile

çalışmaktadır. Aerobik ve anaerobik besiyeri formülasyonları, kan dolaşımı enfeksiyonlarının en yaygın nedenlerinin izolasyonuna olanak tanır. Kan kültür şişeleri tipik olarak sıvı besiyeri, bir antikoagulan (sodyum polianetol sülfonat), fagositlerin parçalanması için litik ajanlar ve antibiyotikleri nötralize etmek için kömür veya reçineler içerir (38).

Sürekli monitörize sistemlerde kan kültürleri rutin olarak 5 gün inkübe edilmektedir. Yapılan çalışmalar bu inkübasyon süresinin *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella* (HACEK) bakterileri ve *Brucella* spp. gibi zor üreyen bakteriler de dahil olmak üzere patojenlerin çoğunun tespiti için yeterli olduğunu ve 5 günden fazla inkübasyonun kontaminant bakteri üremelerini artırdığını göstermiştir (39–41).

Kan kültürü şişeleri cihaza yerleştirildikten sonra sürekli çalkalanır ve 10 dakikada bir her cihaz için farklı üreme göstergeleri açısından kontrol edilir (34). Kan kültür şişelerinde mikroorganizmaların üreme ve metabolizmaları sonucu karbondioksit miktarı artar. BACTEC sisteminde şişelerin dibinde florometrik sensörler bulunur. Karbondioksit miktarının yükselmesine bağlı olarak floresanstaki artış cihaz tarafından tespit edilmektedir (42). BacT/Alert sisteminde şişe tabanında bulunan kolorimetrik sensörler, karbondioksit artışını renk değişimiyle gösterir (43). VersaTREK sisteminde ise gaz basınçlarında tüketim veya üretimden kaynaklanan değişiklikler manometrik olarak ölçülür (32). Üreme tespit edildiğinde cihazlar sesli ve/veya görsel olarak pozitif sinyal verir.

### **2.2.3. Pozitif Sinyal Veren Kan Kültürü Şişelerinin Değerlendirilmesi**

Pozitif sinyal veren kan kültürü şişeleri en kısa süre içinde kan kültür cihazından çıkarılıp işleme alınmalıdır. Yapılması gereken ilk ve en önemli işlem Gram boyalı mikroskopik incelemedir. Bunun için kan kültür şişesinden alınan 1-2 damla örnek temiz bir lama damlatılıp yayılarak preparat hazırlanır ve Gram boyama yapılır. Gram boyalı mikroskopik inceleme yapılarak “Gram pozitif” veya “Gram negatif” boyanma özelliklerinin yanında bakterilerin morfolojileri (kok, basil, kokobasil, filamentöz basil vb.) ve dizilimleri (zincir, küme, diplokok vb.) de

değerlendirilir. Bu özelliklere göre bakteriler temel olarak sınıflandırılabilir. Bu da klinisyene hızlı bir ön tanı sağlayarak ampirik tedavinin seçilmesinde yol gösterici olur. Gram boyama sonuçları mümkün olan en kısa sürede (en geç 1 saat içinde) klinisyene detaylı bir şekilde bildirilmelidir (23). Kan dolaşımı enfeksiyonu olan hastalarda Gram boyama sonuçlarının 1 saatten daha kısa sürede bildirilmesi, gecikmiş bildirimle kıyasla mortalitede önemli ölçüde azalma ile ilişkilendirilmiştir (44).

Mikroskopik inceleme için preparat hazırlanırken eş zamanlı olarak şişeden alınan örnekten koyun kanlı agar (KKA), çikolata agar (ÇA) ve bir gram-negatif seçici besiyerine (Eozin-metilen mavisi agar (EMB), MacConkey agar (MCA) vb.) 1-2 damla damlatılarak ekim yapılır. KKA ve ÇA besiyerleri %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda, EMB/MCA besiyerleri normal atmosfer koşullarında, 35-37 °C sıcaklıkta 24-48 saat inkübe edilir. Gram boyama sonucuna göre gerekirse ek besiyerlerine de (Sabouraud dekstroz agar [SDA], anaerobik kanlı agar vb.) ekim yapılarak, uygun koşullarda inkübe edilir (23). Katı besiyerlerinde üreme sonrası etken olarak kabul edilen tüm mikroorganizmalar tür düzeyinde tanımlanır ve antimikrobiyal duyarlılık testi çalışılır.

## **2.3. TANIMLAMA VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ**

### **2.3.1. Otomatize Tanımlama ve Duyarlılık Sistemleri**

Günümüzde birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında tanımlama ve primer antibiyotik duyarlılık testleri için otomatize sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemlerde bakteriler biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanır ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları belirlenir. Bu amaçla bakteri çoğalmasını hızlandırmak için ek büyüme faktörleri ve seçilmiş antibiyotiklerin dilüsyonlarını içeren, ticari olarak temin edilebilen paneller kullanılır. Çoğu sistem, sonuçları yorumlamak ve organizma tanımlaması ile duyarlılık arasındaki tutarsızlıkları belirlemek için bir bilgisayar algoritması içerir (45). Test standardizasyonu, uzman kuralları içeren yazılımlarla veri yönetimi ve iş gücü tasarrufuna ek olarak, çoğu sistem raporlama süresini kısaltır.

Piyasada kullanımda birçok otomatize sistem bulunmakla birlikte en yaygın kullanılanlar; Phoenix (Becton Dickinson, ABD), Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) ve MicroScan (Beckman Coulter, ABD) otomatize tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sistemleridir. Genel tanımlama süreçleri benzer olsa da bu sistemler, tespit yöntemi (bulanıklık ölçümü, florometrik), tespit hızı, otomasyon kapsamı, veri yönetimi, sonuçların raporlanmasına ve antibiyogramların doğrulanmasına yardımcı olan yorumlama paketleri bakımından farklılık göstermektedir (46).

**2.3.1.1. Phoenix (Becton Dickinson, ABD):** Bu sistem, antibiyotik dilüsyonlarına ayrılmış 84 kuyucuk içeren ve manuel olarak inoküle edilen 99 test panelini işleme kapasitesi olan büyük bir inkübatör okuyucusuna sahiptir (47). Duyarlılık testi için optimize edilmiş bir kolorimetrik oksidasyon-redüksiyon göstergesi ve bakteriyel tanımlama için çeşitli florometrik ve kolorimetrik göstergeler kullanır (45). Belirli bir konsantrasyonda bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra paneller manuel olarak inoküle edilir ve inkübatör okuyucu modülüne yüklenir. Daha sonra veritabanı bireysel kuyucuklardaki biyoreaktivitenin kinetik ölçümlerini analiz eder. Phoenix sistemi ile ortalama tanımlama süresi 4,3 saattir. Nihai duyarlılık sonuçlarına ulaşma süresi, ortalama 10,5 saat olmak üzere 7,5–16 saat arasında değişmektedir (48). Tüm sistemler antibiyogram üretimi için bazı temel epidemiyolojik yazılımlar ve veriler sunsa da, Phoenix veri tabanı daha fazla esneklik ve veri analizi sağlar (49).

**2.3.1.2. Vitek 2 (bioMérieux, Fransa):** Bu sistem, Vitek'in ikinci nesil cihazıdır. Daha gelişmiş bir veri analizi modelinin yanı sıra kart tanımlama, organizma süspansiyonu seyreltme ve kart doldurma için tam otomatik bir süreç sunar (45). Mikrolitre hacimlerdeki antibiyotik ve sıvı besiyeri içeren 64 kuyucuklu formatta çok kompakt plastik reaktif kartları (kredi kartı boyutunda) kullanır (47). Cihaz, 30–240 eş zamanlı testi barındıracak şekilde yapılandırılabilir. Vitek 2, klinik açıdan en önemli organizmalar için geniş profiller sağlamak üzere üç dalga boyundaki ışığın kullanıldığı kolorimetrik teknoloji ile çalışır (45). Bu sistemde tür tanımlaması hızlı yöntemlerle ortalama 3 saatte tamamlanırken, kolorimetrik test

metodolojisi gerektiren yavaş büyüyen organizmalar için 5,7 saati bulabilmektedir. Duyarlılık sonuçları ortalama 9 saat olmak üzere 15 saate kadar sürebilir (48,50).

**2.3.1.3. MicroScan (Beckman Coulter, ABD):** 40–96 mikrodilüsyon panelini inkübe edebilen ve analiz edebilen büyük, bağımsız bir inkübatör/okuyucu cihazdır (47). Vitek sisteminin aksine MicroScan panelleri, geleneksel mikrodilüsyon plakları boyutundadır. Paneller manuel olarak inoküle edilir (45). Cihaz üremeyi florometrik yöntemlerle tespit eder. Mikroorganizmalar, hızlı yöntemlerle ortalama 2,5 saatte tanımlanabilirken, geleneksel test metodolojileri kullanıldığında 6-18 saat sürebilir. Duyarlılıklar için nihai sonuçlar, organizmanın türüne bağlı olarak 16,8–27,8 saat aralığında olmak üzere ortalama 20 saatte elde edilir (48,51).

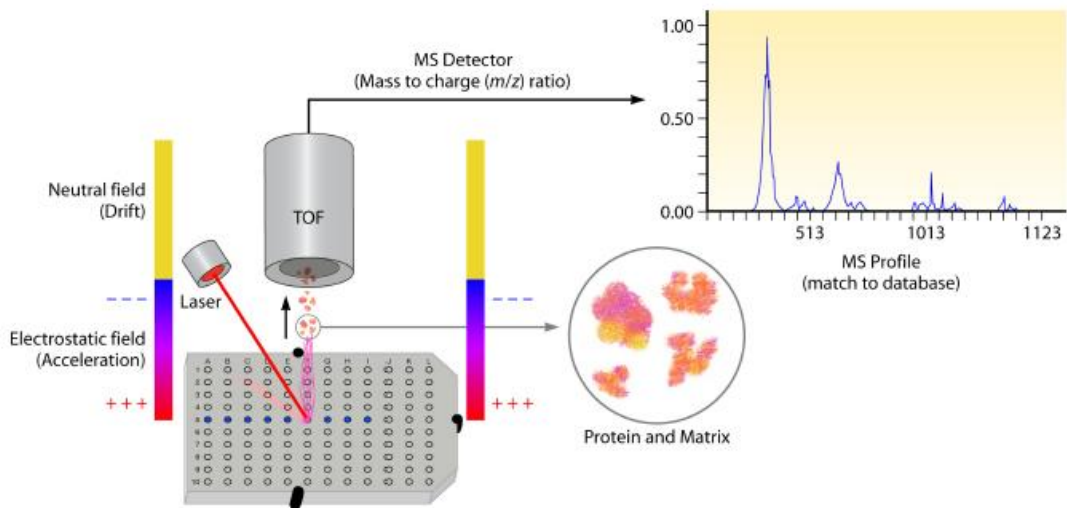
### **2.3.2. Kütle Spektrometrisine Dayalı Tanımlama Sistemleri**

Kütle spektrometrisi (MS) bir iyonlaşma sürecine ve nötr bileşiklerin yüklü iyonlara dönüştürülmesine dayanan, kütle-yük ( $m/z$ ) oranlarının ölçülmesine olanak tanıyan analitik bir tekniktir. MS, 1900'lerin başlarında kullanıma giren bir teknik olmasına rağmen, elektron iyonizasyon işlemi sınırlamaları nedeniyle kullanımı kimyasal analizlerle sınırlıydı. Bununla birlikte zamanla elektrosprey iyonizasyon, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon ve çoğunlukla matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) gibi yumuşak iyonizasyon kaynaklarının geliştirilmesi, MS'in polimerler, proteinler, supramoleküler agregatlar ve mikroorganizmalar gibi hassas ve büyük moleküllere uygulanabilirliğini artırmıştır (6). 1994 yılında yapılan bir çalışmada MS tekniği olarak uçuş zamanı kullanılarak MALDI TOF MS teknolojisi geliştirilmiştir (52).

Son yıllarda tekniğin daha da geliştirilmesiyle birlikte mikroorganizmaların tanımlanmasında yeni bir standart haline gelmiştir. MALDI TOF MS, kullanımı kolay, hızlı, doğru ve izolat başına düşük maliyetli (cihazın başlangıç maliyetinden sonra) bir yöntem olması nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (10). Ülkemizde kullanımı onaylı iki ticari sistem

bulunmaktadır: MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Almanya) ve VITEK MS (bioMérieux, Fransa) (9).

MALDI TOF MS yönteminde analiz edilecek olan koloniden az miktarda alınarak metal bir plaka (slayt) üzerine sürülür. Sonrasında bu mikrobiyal numune matriks solüsyonu ile kaplanır. Matriks, kullanılan lazer dalga boyu aralığında güçlü bir optik absorpsiyona sahip düşük kütleli asit moleküllerinden oluşur (8). En sık kullanılan matriks  $\alpha$ -siyano-4-hidroksisinnamik asittir (HCCA) (52). Kurutma sırasında matriks ve numune birlikte kristalleşir. Matriks, hem iyonizasyonun meydana gelebileceği bir yapı iskelesi hem de klinik materyalin iyonizasyonu için bir proton tedarikçisi olarak görev yapar (53). MALDI slaytı cihaza yerleştirildikten sonra lazer atışlarına maruz bırakılır. Matriks, lazerden gelen enerjiyi emerek numunenin desorpsiyonuna yol açar ve bunlar daha sonra gaz fazında buharlaşır ve iyonlaşır. İyonize olan moleküller önce bir elektrostatik alan boyunca hızlandırılır ve sonrasında vakuma tabi tutulan metal bir uçuş tüpünden geçerek dedektöre ulaşır (8). Dedektöre ulaşmak için gereken uçuş süresi (TOF), bileşen proteinlerin kütesine ( $m$ ) ve yüküne ( $z$ ) bağlıdır. Kütle/yük ( $m/z$ ) oranı ve dedektöre ulaşan sinyalin yoğunluğu birlikte bir kütle spektrumu oluşturur. Elde edilen kütle spektrumu referans veri tabanındakiyle karşılaştırılarak mikroorganizma cins ve tür düzeyinde tanımlanır (52).



Şekil 1: MALDI TOF MS'in çalışma prensibi (53)

### 2.3.3. Moleküler Tanımlama Yöntemleri

Moleküler yöntemlerin, hızlı sonuç vermeleri ve duyarlılıklarının yüksek olması nedeniyle patojen tanımlanmasında önemi giderek artmaktadır. Kan kültür şişesinden veya direkt kan örneğinden tanımlama yapabilen kullanımı onaylı cihazlar bulunmakla birlikte, bir kısmında mikroorganizmanın genotipik direnç bilgisi de tespit edilebilmektedir. Ancak deneyimli personel ihtiyacı, başlangıç cihaz maliyetlerinin ve test başı kit maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle bu testler rutin laboratuvar kullanımına girememiştir. Ayrıca moleküler yöntemlerin tespit edebileceği patojenler, her bir testin panelindeki mikroorganizmalarla sınırlıdır.

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan moleküler teknikler, hibridizasyona dayalı ve amplifikasyona dayalı yöntemler olarak sınıflandırılabilir (54). Hibridizasyona dayalı bir yöntem olan peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyonu (PNA FISH) ile, pozitif sinyal veren kan kültür şişelerinden 2,5 saat içinde tanımlama yapılabilmektedir. *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* ve *Candida* spp. için prob kitleri bulunmaktadır. Kullanılacak olan prob kitleri gram boyalı mikroskopik inceleme sonuçlarına göre seçilmektedir (38).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), amplifikasyona dayalı yöntemler arasında en yaygın kullanılan yöntemdir (54). PCR tek bir mikroorganizmayı (*Staphylococcus aureus* gibi) veya aynı anda test edilen mikroorganizma panellerini hedefleyebilir (32). Özellikle direkt tam kandan çalışılan geniş kapsamlı PCR testleri, kan dolaşımı enfeksiyonlarının erken tanısında umut vericidir. Bunlardan biri olan SeptiFast (Roche Diagnostics, Almanya), hastaların kan örneklerinden 4-6 saatte tanımlama yapabilen gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) temelli bir test olup, en sık sepsis etkeni olan 25 patojeni tanımlayabilmektedir (55). Ancak PCR testlerinde canlı mikroorganizmalar yerine nükleik asitlerin saptanması, kanda enfeksiyon olmadan da mikrobiyal nükleik asitlerin varlığı, kan kültürü alınması sırasında ve laboratuvar içi kontaminasyon riskinin yüksek olması sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (54).

### 2.3.4. Direkt Kan Kùltür Şişesinden MALDI TOF MS

MALDI TOF MS teknolojisi izole edilmiş, saf kolonilerle çalışılmak için geliştirilmiş ve onaylanmıştır (9). Ancak doğrudan klinik örneklerin ve kan kùltür şişesinin kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Pozitif sinyal veren kan kùltür şişeleri, MALDI TOF MS analizi için yeterli sayıda mikroorganizma içermeleri ve büyük çoğunluğunda (%89-95) monomikrobiyal üreme olması nedeniyle doğrudan test için ideal örneklerdir (56).

Kan kùltür şişelerinden mikroorganizmaları ayırmak ve konsantre etmek için çeşitli ticari kitler ve laboratuvar içi yöntemler geliştirilmiştir. Bakteri pelletlerinin saflaştırılmasına yönelik prosedürler, yayınlanan protokoller arasında önemli ölçüde farklılık gösterse de, genellikle bir lizis adımını takiben santrifüjleme ve yıkama işlemlerinden oluşur. Konak hücrelerini parçalamak için yaygın olarak kullanılan reaktifler arasında %5 saponin, amonyum klorür, trifloroasetik asit, TritonX ve steril su bulunur (11,57–61). Parçalama işlemi sonrası numune santrifüj edilir, daha sonra su, etanol veya bir salin solüsyonu ile yıkanır. Lizis santrifügasyon yöntemi için solüsyon hazırlama ve ek ekipman satın alma konularında iş gücü ve zaman tasarrufu sağlayan ticari kitler geliştirilmiştir. Şu anda kullanımda olan Sepsityper (Bruker Daltonics), Rapid BACpro II (Nittobo, Japonya) ve VITEK MS kan kùltürü kiti (bioMérieux) olmak üzere üç farklı ticari protokol bulunmaktadır (16,18,62). Bu kitlerin en önemli dezavantajı yüksek maliyetleridir.

Laboratuvarda geliştirilen diğere bir yöntem de serum ayırıcı tüplerin kullanılmasıdır (5,19,63). Kan kùltür şişesinden alınan örnek bu tüplerde santrifüj edildiğinde kan hücreleri jelin altında kalırken mikroorganizmalar jelin üzerinde bir tabaka oluşturur. Bu tabaka yeniden süspansedilerek yeni bir tüpe aktarılır. Optimum saflaştırma için ek yıkama adımları eklenebilir. Bu yöntem diğereğine göre daha az basamaklı ve düşük maliyetlidir (19).

### 2.3.5. Direkt Kan Kùltür Şişesinden Antibiyotik Duyarlılık Testi

Direkt kan kùltür şişesinden MALDI TOF MS ile tanımlama yapıldığında çok kısa bir süre içinde (neredeys e gram boyalı inceleme ile aynı sürede) sepsis etkeni mikroorganizma tanımlanarak ampirik tedavinin seçilmesinde klinisyene yol gösterici olmaktadır (64). Ancak hedefe yönelik antibiyotik tedavisinin verilebilmesi için antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlanması gerekmektedir. Konvansiyonel yöntemde pozitif sinyal sonrası kan kùltür şişelerinden katı agarlara ekim yapıp, 18-24 saat inkübasyon sonunda üreyen kolonilerden otomatize sistemlerde antibiyotik duyarlılık testi çalışılmaktadır. Uzun test süreleri nedeniyle otomatize sistemlerde antibiyotik duyarlılık sonuçları ertesi gün alınabilmektedir (50,65).

Son yıllarda kan kùltür şişesinden MALDI TOF MS ile tanımlama için laboratuvar da geliştirilen yöntemlerle elde edilen bakteri pelletinin otomatize sistemlerde antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bakteri pelletini elde etme yöntemi, kullanılan otomatize sistem ve çalışılan bakteri türlerine göre de ğişmekle birlikte sonuçlar umut vericidir. Bu yöntemle sonuçlar 24 saat daha erken elde edilmektedir (64). Sepsis gibi acil tanı ve tedavi gerektiren bir durumda bu süre morbidite ve mortalitenin azaltılması açısından çok önemlidir. Laboratuvar rutinine entegre edilebilecek basit, düşük maliyetli yöntemlerle, daha çok bakteri türüyle çalışmaların yapılmasına ve yöntemin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma uluslararası etik kurallarına uygun bir şekilde yapılmış olup Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 29.08.2022 tarihli ve 145/05 sayılı karar ile onay alınmıştır. Tek merkezli, laboratuvar ortamında deneysel ve prospektif bir çalışma olarak tasarlanmıştır.

#### 3.1. ÇALIŞMAYA ALINAN NUMUNELER

Bu çalışma 01.09.2022–30.11.2022 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi çeşitli kliniklerinden kan dolaşımı enfeksiyonu ön tanısıyla alınıp Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve BACTEC FX kan kültür cihazına yerleştirilen kan kültürü şişelerinden pozitif sinyal veren 203 adet kan kültürü üzerinde yapılmıştır.

##### Dahil etme kriterleri:

\*Bir hastadan eş zamanlı alınan kan kültür şişelerinden ilk pozitif sinyal veren kan kültür şişesi

\*Pozitif sinyal sonrası kan kültür şişesinden yapılan gram boyalı incelemede tek morfolojide bakteri görülen şişeler

\*Direkt antibiyotik duyarlılık testi için hızlı tanımlama sonucu enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilen şişeler

##### Hariç tutma kriterleri:

\*Eş zamanlı alınan kan kültürlerinden ikinci ve sonraki pozitif sinyal veren kan kültür şişeleri

\*Pozitif sinyal sonrası yapılan gram boyalı incelemede farklı morfolojilerde bakteri görülen şişeler

\*Pozitif sinyal sonrası yapılan gram boyalı incelemede maya görülen şişeler

\*Pozitif sinyal vermesinin üzerinden 18 saatten fazla zaman geçen şişeler

\*Direkt antibiyotik duyarlılık testi için tanımlama sonucu kontaminasyon olarak değerlendirilen şişeler

## 3.2. KAN KÜLTÜRÜ LABORATUVAR İŞLEYİŞİ

### 3.2.1. Kan Kültürü Cihazında İnkübasyon

Kan kültürü örnekleri sürekli monitörize kan kültür sistemi olan BACTEC FX (Becton Dickinson, ABD) cihazında inkübe edildi. Kan kültürleri cihaz ile uyumlu BD BACTEC Plus Aerobic/F ve BD BACTEC Plus Anaerobic/F şişelerine (Şekil 2) set halinde alınarak laboratuvara gönderildi. Kan kültür şişeleri rutin olarak BACTEC FX (Şekil 2) cihazına yerleştirilerek 37°C de 5 gün inkübe edildi. Bu şişelerin dibinde bulunan florometrik sensörler karbondioksit miktarının yükselmesine bağlı olarak floresan sinyal verir. Cihaz tarafından her 10 dakikada bir floresan sinyal ölçümü yapılır. Floresan sinyaldeki artış hızı ve miktarına göre üreme tespit edildiğinde pozitif sinyal verir.



Şekil 2: BD BACTEC FX otomatize kan kültürü sistemi

### **3.2.2. Pozitif Sinyal Sonrası Rutin Prosedür**

Pozitif sinyal veren kan kültür şişeleri en kısa süre içerisinde cihazdan çıkarılarak Gram boyalı inceleme için preparat hazırlandı. Eş zamanlı olarak şişeden alınan örnekten %5 KKA, çikolata agar ve EMB agara 1-2 damla damlatılarak ekim yapıldı. Plaklar 35-37°C sıcaklıkta inkübasyona alındı. Gram boyalı preparat mikroskopta incelendi ve sonuç en geç 1 saat içinde klinisyene bildirildi.

Bir gece inkübasyon sonrası plaklar değerlendirildi. Üreme olan tüm plaklardaki mikroorganizmalar MALDI TOF MS ile tanımlandı ve kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilen bakterilere otomatize sistemde antibiyotik duyarlılık testi çalışıldı.

## **3.3. RUTİN TANIMLAMA VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ**

### **3.3.1. MALDI TOF MS ile Tanımlama**

Çalışmada tüm tanımlama işlemleri MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Almanya) (Şekil 3) cihazı ile yapıldı. Rutin yöntemde agar plaklarda üreyen kolonilerden ahşap çubuk yardımıyla alınarak MALDI slaytı üzerine sürüldü. Üzerine üretici önerileri doğrultusunda 1µl %70 formik asit damlatıldı. Kuruduktan sonra 1µl matriks solüsyonu (HCCA) (Bruker Daltonics, Almanya) damlatıldı ve tekrar kurumaya bırakıldı. Slayt kuruduktan sonra MALDI Biotyper cihazına yerleştirildi ve analiz edildi.



**Şekil 3: MALDI Biotyper**

### **3.3.2. Otomatize Sistemde Antibiyotik Duyarlılık Testi**

Antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix M50 (Becton Dickinson, ABD) cihazında yapıldı. Gram negatif bakteriler için NMIC-433, *Streptococcus* spp. için SMIC/ID-11, diğer gram pozitif bakteriler için PMIC-600 panelleri kullanıldı. Agar plaklarda üreyen bakteriler 0.5 McFarland bulanıklığında suspense edildikten sonra üretici talimatları doğrultusunda Phoenix (Şekil 4) cihazının ilgili panellerine aktarıldı ve cihaza yerleştirildi. Panellerin tanımlama kısmı kullanılmadan, bakteri isimleri MALDI TOF MS ile tanımlama sonucuna göre cihaza kaydedildi ve sadece antibiyotik duyarlılıkları çalışıldı.



Şekil 4: BD Phoenix M50 otomatize sistemi

### **3.4. DİREKT TANIMLAMA VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ**

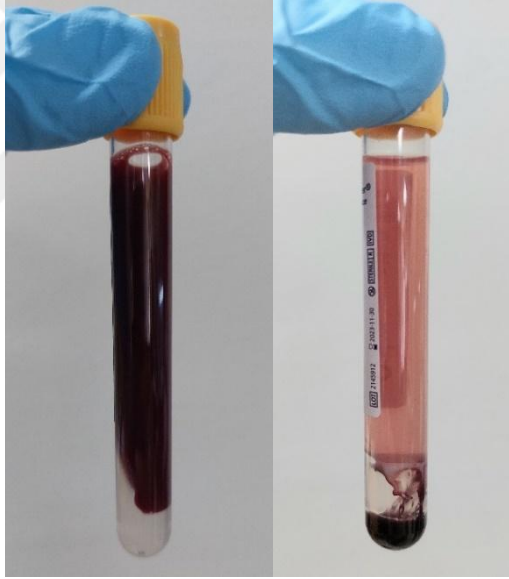
#### **3.4.1. Bakteri Süspansiyonunun Elde Edilmesi**

Kan kültür şişelerinden bakterileri ayırt etmede BD Vacutainer SST II Advance serum ayırıcı tüpleri (Becton Dickinson, ABD) kullanıldı. Bu tüpler, santrifüjlemeden sonra serum ve kan hücrelerini fiziksel olarak ayıran inert bir jel içerir. Kan kültür şişesinden alınan örnek bu tüplerde santrifüj edildiğinde bakteriler jelin hemen üstünde ince bir tabaka oluşturur.

Pozitif sinyal veren kan kültür şişesinden rutin gram boyama ve kültür ekim işlemleri yapıldıktan sonra şişeler direkt tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri için işleme alındı. Azrad ve arkadaşlarının kullandığı yöntem (19) yüksek devirli santrifüj cihazı gerektirmeyecek şekilde modifiye edilerek uygulandı. Bakteri süspansiyonu elde etme işlemi aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

- 1) Pozitif sinyal veren kan kültür şişesinden steril enjektör ile alınan 5ml örnek serum ayırıcı tüpe aktarıldı.
- 2) Tüp 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.
- 3) Jelin üstünde kalan bakteri tabakası korunarak süpernatant atıldı.
- 4) Tüpe 1ml serum fizyolojik (SF) eklendi.
- 5) Hafifçe çalkalanarak bakteri tabakası SF içinde süspansiyon edildi ve boş bir tüpe aktarıldı.
- 6) 4000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
- 7) Bakteri pelleti 500µl SF ile süspansiyon edildi.

Elde edilen bakteri süspansiyonu MALDI TOF MS cihazı ile tanımlama ve Phoenix cihazında antibiyotik duyarlılık testi çalışılması için kullanıldı.



**Şekil 5:**Kan kültür şişesinden serum ayırıcı tüpe alınan örneğin santrifüj öncesi ve sonrası görünümü

### 3.4.2. Direkt MALDI TOF MS ile Tanımlama

Bakteri süspansiyonundan pipet yardımıyla 2µl alınarak MALDI slaytı üzerindeki spota konuldu. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Önce 1µl %70 formik asit damlatıldı. Kuruduktan sonra 1µl matriks solüsyonu (HCCA) damlatıldı ve tekrar kurumaya bırakıldı. Slayt kuruduktan sonra MALDI Biotyper cihazına

yerleştirildi ve analiz edildi. Tanımlama sonuçları ve sonuçların güvenilirlik skorları kaydedildi.

Üretici önerileri doğrultusunda 2 ve üzerindeki 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 değerlendirildi (66).

### **3.4.3. Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi**

Direkt MALDI TOF MS sonucu etken olarak değerlendirilen örnekler antibiyotik duyarlılık testine alındı. Cilt florası üyesi olan koagülaz negatif stafilokoklar iki set kan kültüründe pozitif sinyal verdiklerinde etken olarak değerlendirildi. Antibiyotik duyarlılık testleri tanımlama sonucuna göre BD Phoenix cihazının NMIC-433, PMIC-600 ve SMIC/ID-11 panelleri kullanılarak çalışıldı. Serum ayırıcı tüp yöntemiyle elde edilen bakteri süspansiyonundan pipet yardımıyla alınıp yaklaşık 2ml BD ID broth (Becton Dickinson, ABD) içine aktarılarak 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Üretici talimatları doğrultusunda cihazın ilgili panellerine inoküle edildi ve cihaza yerleştirildi. Panellerin tanımlama kısmı kullanılmadan, bakteri isimleri MALDI TOF MS ile tanımlama sonucuna göre cihaza kaydedildi ve sadece antibiyotik duyarlılıkları çalışıldı.

### **3.5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Direkt kan kültür şişesinden tanımlama sonuçları, sonuçların güvenilirlik skorlarıyla birlikte kaydedildi. Skorlara göre tür düzeyinde güvenilir, cins düzeyinde güvenilir veya güvenilir olmayan tanımlama olarak sınıflandırıldı (66). Direkt tanımlama sonuçları rutin tanımlama sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Direkt tanımlama sonucu rutin tanımlama sonucuyla tür düzeyinde uyumluysa “tür düzeyinde doğru tanımlama”, sadece cins düzeyinde uyumlu ancak tür düzeyinde uyumsuzsa “cins düzeyinde doğru tanımlama”, tür ve cins düzeyinde de uyumlu değilse “yanlış tanımlama” olarak değerlendirildi. MS analizinde herhangi bir pik elde edilemeyen izolatlar tanımlanamadı.

Bütün izolatlar için rutin ve direkt yöntemle Phoenix cihazında çalışılan antibiyotiklerin duyarlılık sonuçları duyarlı (S), yüksek dozda duyarlı (I) veya dirençli (R) olarak kaydedildi. İki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak kategorik uyum değerlendirildi. Kategorik olarak uyumlu olmayan sonuçlardaki hatalar şu şekilde tanımlandı:

Küçük hata: bir yöntemle yüksek dozda duyarlı (I) olarak bulunan izolatin, diğer yöntemle duyarlı (S) veya dirençli (R) olarak saptanması

Büyük hata: rutin yöntemle duyarlı (S) bulunan izolatin, direkt yöntemle dirençli (R) olarak saptanması

Çok büyük hata: rutin yöntemle dirençli (R) bulunan izolatin, direkt yöntemle duyarlı (S) olarak saptanması

Bakteri türlerine ve çalışılan antibiyotiğe göre iki yöntemle elde edilen sonuçlardaki kategorik uyum, küçük hata, büyük hata ve çok büyük hata oranları hesaplandı.

### **3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışma süresince elde edilen veriler Microsoft Excel programına kaydedildi. Verilerin analizi bilgisayar ortamında IBM SPSS v23.0 programı kullanılarak yapıldı. Değerlendirme sonuçları, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde; sayısal değişkenler için ortalama olarak verildi. Antibiyotik duyarlılık testleri; >%90 genel kategorik uyum, <%1,5 çok büyük hata oranı ve <%3 büyük hata oranı olması halinde kabul edilebilir düzeyde uyumlu olarak kabul edildi (67).

## 4. BULGULAR

Çalışmaya 01.09.2022–30.11.2022 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesinin çeşitli kliniklerinden kan dolaşımı enfeksiyonu ön tanısıyla alınıp Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve BACTEC FX kan kültür cihazına yerleştirilen kan kültürü şişelerinden pozitif sinyal veren 203 adet kan kültürü şişesi dahil edildi.

Kan kültürü örneklerinin 134 tanesi yoğun bakım ünitelerinden, 56 tanesi servislerden, 12 tanesi acil servis kliniğinden ve 1 tanesi poliklinikten gönderildi. Kan kültürü örneklerinin alındığı hastaların 117'si (%57,6) erkek, 86'sı (%42,4) kadındı. Hastaların yaşları 18-94 arasında değişmekle birlikte yaş ortalaması 67,9 olarak hesaplandı.

### 4.1. TANIMLAMA SONUÇLARI

Direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS ile tanımlama yapılan 203 kan kültürü şişesinden 3'ünde anaerob bakteri üremesi tespit edildi. Rutinde anaerob kültür yapılmadığı için bu bakteriler rutin yöntemle tanımlanamadı. Bu nedenle 3 kan kültür şişesi için direkt tanımlama sonuçları rutin yöntemle karşılaştırılamadı.

Değerlendirilen 200 kan kültür şişesinden 70'inde (%35) Gram negatif, 130'unda (%65) Gram pozitif bakteri üredi. Gram negatif bakterilerin direkt yöntemle tanımlama sonuçları, güvenilirlik skorları ve rutin yöntemle göre sonuçların doğruluğu Tablo 1'de gösterilmiştir. En sık üreyen Gram negatif bakteriler *E. coli* (n=22), *K. pneumonia* (n=14) ve *A. baumannii* (n=12) olarak tespit edildi. Direkt yöntemle gram negatif bakterilerin 69'u (%98,6) tür düzeyinde doğru tanımlanırken, 1'i (%1,4) sadece cins düzeyinde doğru tanımlandı. Direkt yöntemle yanlış tanımlanan veya tanımlanamayan izolat olmadı. Gram negatif bakterilerin %61,4'ü 2'nin üzerinde güvenilirlik skoruyla tanımlandı. %34,3'ü 1,7-1,99 arasında skorla tanımlanırken, %4,3'ü 1,7'nin altında skorla tanımlandı.

**Tablo 1:** Gram Negatif Bakterilerin Direkt Tanımlama Sonuçları ve Skorları

Bakteri Türü	İzolot Sayısı						Tanımlama	Tanımsız	Toplam
	Tür Düzeyinde Doğru Tanımlama			Cins Düzeyinde Doğru Tanımlama					
	MS Skoru			MS Skoru					
	<1,7	1,7-1,99	≥2	<1,7	1,7-1,99	≥2			
<i>E.coli</i>	-	8	14	-	-	-	-	22	
<i>K.pneumonia</i>	-	5	9	-	-	-	-	14	
<i>A.baumannii</i>	2	3	6	-	1	-	-	12	
<i>P.aeruginosa</i>	1	1	3	-	-	-	-	5	
<i>E.cloacae</i>	-	1	3	-	-	-	-	4	
<i>K.oxytoca</i>	-	-	3	-	-	-	-	3	
<i>S.marcescens</i>	-	2	1	-	-	-	-	3	
<i>A.nosocomialis</i>	-	1	1	-	-	-	-	2	
<i>K.variicola</i>	-	1	1	-	-	-	-	2	
<i>S.maltophilia</i>	-	1	1	-	-	-	-	2	
<i>P.mirabilis</i>	-	-	1	-	-	-	-	1	
<b>Toplam</b>	<b>3</b>	<b>23</b>	<b>43</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>70</b>	
(%)	(4,3)	(32,9)	(61,4)		(1,4)			(100)	

MS: Kütle spektrometrisi

Gram pozitif bakterilerin direkt yöntemle tanımlama sonuçları, güvenilirlik skorları ve rutin yöntemle sonuçların doğruluğu Tablo 2’de gösterilmiştir. En sık üreyen Gram pozitif bakteriler *S. epidermidis* (n=40), *S. aureus* (n=20) ve *S. hominis* (n=20) olarak tespit edildi. Direkt yöntemle Gram pozitif bakterilerin 111’i (%85,4) tür düzeyinde doğru tanımlanırken, 8’i (%6,1) sadece cins düzeyinde doğru tanımlandı. Direkt yöntemle yanlış tanımlanan izolat olmadı, ancak 11 (%8,5) izolat tanımlanamadı. Direkt yöntemle tanımlanamayan izolatların, rutin yöntemle 10 tanesi koagülaz negatif stafilokok, biri ise *Corynebacterium amycolatum* olarak tanımlandı. Gram pozitif bakterilerin %15,4’ü 2’nin üzerinde güvenilirlik skoruyla tanımlandı. %34,6’sı 1,7-1,99 arasında skorla tanımlanırken, %41,5’i 1,7’nin altında skorla tanımlandı.

**Tablo 2:** Gram Pozitif Bakterilerin Direkt Tanımlama Sonuçları ve Skorları

Bakteri Türü	İzolasyon Sayısı						Yanlış Tanımlama	Tanımsız	Toplam
	Tür Düzeyinde Doğru Tanımlama			Cins Düzeyinde Doğru Tanımlama					
	MS Skoru			MS Skoru					
	<1,7	1,7-1,99	≥2	<1,7	1,7-1,99	≥2			
<i>S.epidermidis</i>	16	11	1	3	1	-	-	8	40
<i>S.aureus</i>	5	11	4	-	-	-	-	-	20
<i>S.hominis</i>	10	5	2	3	-	-	-	-	20
<i>E.faecalis</i>	2	5	5	-	-	-	-	-	12
<i>S.haemolyticus</i>	5	2	-	1	-	-	-	2	10
<i>E.faecium</i>	1	2	5	-	-	-	-	-	8
<i>S.capitis</i>	2	1	1	-	-	-	-	-	4
<i>S.peumonia</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	3
<i>C.afermentans</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>S.lugdunensis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>S.simulans</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>S.pettenkoferi</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C.striatum</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>C.amycolatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>C.simulans</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>S.oralis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>S.parasanguinis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>L.monocytogenes</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>B.pumilis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>47</b>	<b>44</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>11</b>	<b>130</b>
(%)	(36,1)	(33,8)	(15,4)	(5,4)	(0,8)	-	-	(8,5)	(100)

MS: Kütle spektrometrisi

Bütün izolatların direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçları Tablo 3'te özetlenmiştir. Toplam 200 bakteriden direkt yöntemle 180'i (%90) tür düzeyinde doğru tanımlanırken, 9'u (%4,5) sadece cins düzeyinde doğru tanımlandı. 11'inde (%5,5) ise direkt yöntemle tanımlama sonucu elde edilemedi.

**Tablo 3:** Bütün İzolatların Direkt Tanımlama Sonuçları

İzolatlar	Tür Düzeyinde	Cins Düzeyinde	Tanımsız	Toplam
	Doğru Tanımlama	Doğru Tanımlama		
	n (%)	n (%)	n (%)	n
<b>Gram negatif</b>	<b>69 (98,6)</b>	<b>1 (1,4)</b>	<b>0</b>	<b>70</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	49 (100)	0	0	49
Nonfermenter	20 (95,24)	1 (4,76)	0	21
<b>Gram pozitif</b>	<b>111 (85,4)</b>	<b>8 (6,1)</b>	<b>11 (8,5)</b>	<b>130</b>
<i>S.aureus</i>	20 (100)	0	0	20
KNS	59 (76,6)	8 (10,4)	10 (13)	77
<i>Enterococcus</i> spp.	20 (100)	0	0	20
<i>Streptococcus</i> spp.	5 (100)	0	0	5
Gram pozitif basil	7 (87,5)	0	1 (12,5)	8
<b>Toplam</b>	<b>180 (90)</b>	<b>9 (4,5)</b>	<b>11 (5,5)</b>	<b>200</b>

KNS: Koagülaz negatif stafilokok, n: sayı

Direkt yöntemle sadece cins düzeyinde doğru tanımlanan izolatların rutin tanımlama sonuçları ve direkt MS güvenilirlik skorları Tablo 4’te gösterilmiştir. 9 izolattan 2’sinin MS skoru “cins düzeyinde güvenilir” (1,7-1,99) kategorisinde, 7’sinin MS skoru ise “güvenilir olmayan tanımlama” (<1,7) kategorisinde bulundu.

**Tablo 4:** Cins Düzeyinde Doğru Tanımlanan İzolatların Rutin Tanımlama ve Direkt Tanımlama Sonuçları

Rutin Tanımlama	Direkt Tanımlama	MS skoru
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1,74
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,39
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	1,06
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,76
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	1,06
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0,97
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1,03
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	1,66
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,1

Anaerop bakteri üremesi olan kan kültür şişeleri yalnızca direkt yöntemle tanımlandı. Anaerop kültür yapılamadığı için sonuçlar referans yöntemle doğrulanamadı. Tanımlama sonuçları ve MS skorları Tablo 5’te gösterilmiştir. Üç bakterinin de MS skoru “tür düzeyinde güvenilir” ( $\geq 2$ ) kategorisinde tespit edildi. Gram boyalı inceleme sonuçları direkt tanımlama sonuçlarıyla uyumluydu.

**Tablo 5:** Anaerop Bakterilerin MALDI TOF MS Skorları ve Skor Kategorileri

	<b>MALDI TOF MS skoru</b>	<b>Skor kategorisi</b>
<i>Ruminococcus gnavus</i>	2,02	Tür Düzeyinde Güvenilir
<i>Clostridium boltae</i>	2,05	Tür Düzeyinde Güvenilir
<i>Bacteroides fragilis</i>	2,08	Tür Düzeyinde Güvenilir

#### **4.2. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI**

Direkt MALDI TOF MS sonucu ve pozitif sinyal veren şişe sayısına göre kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilen izolatlarla direkt yöntemle Phoenix cihazında antibiyotik duyarlılık testi çalışıldı. Sonuçlar rutin yöntemle elde edilen duyarlılık sonuçlarıyla karşılaştırılarak kategorik uyum ve hata oranları belirlendi.

Direkt yöntemle tanımlanan 70 tane Gram negatif bakterinin hepsi, 130 tane Gram pozitif bakterinin ise 50’si antibiyotik duyarlılık testine alındı. Bakterilere göre direkt antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının kategorik uyum ve hata oranları Tablo 6’da gösterilmiştir. Toplam 120 bakteri için 1758 bakteri-antibiyotik kombinasyonu test edildi ve rutin yöntemle karşılaştırıldı. Kategorik uyum %96,9 (1703) olarak tespit edildi. Küçük hata oranı %1,1 (20), büyük hata oranı %1 (17) ve çok büyük hata oranı %1 (18) olarak saptandı.

Gram negatif bakterilerde çalışılan 1115 testin %96,2’si (1072) kategorik olarak uyumlu bulundu. Küçük hata oranı %1,7 (19), büyük hata oranı %1,2 (14) ve çok büyük hata oranı %0,9 (10) olarak saptandı. En düşük kategorik uyum %92 ile *P. aeruginosa* izolatlarında, en yüksek çok büyük hata oranı ise %3,6 ile *Acinetobacter* türlerinde tespit edildi.

Gram pozitif bakterilerde çalışılan 643 testin %98,1'i (631) kategorik olarak uyumlu bulundu. Küçük hata oranı %0,2 (1), büyük hata oranı %0,5 (3) ve çok büyük hata oranı %1,2 (8) olarak saptandı. En yüksek çok büyük hata oranı %3,75 ile koagülaz negatif stafilocoklarda tespit edildi.

**Tablo 6:** Bakterilere Göre Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları

Bakteriler	Test sayısı	Kategorik uyum	KH	BH	ÇBH
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Gram negatif (n=70)</b>	<b>1115</b>	<b>1072 (96,2)</b>	<b>19 (1,7)</b>	<b>14(1,2)</b>	<b>10 (0,9)</b>
<i>E.coli</i>	440	423 (96,1)	7(1,6)	6(1,4)	4 (0,9)
<i>Klebsiella</i> spp.	360	347 (96,4)	6(1,7)	5(1,4)	2 (0,5)
<i>Acinetobacter</i> spp.	112	107 (95,5)	0	1(0,9)	4 (3,6)
<i>P.aeruginosa</i>	50	46 (92)	3(6)	1(2)	0
<i>E.cloacae</i>	74	73 (98,6)	0	1(1,4)	0
<i>S.marcescens</i>	60	57 (95)	3(5)	0	0
<i>S.maltophilia</i>	2	2 (100)	0	0	0
<i>P.mirabilis</i>	17	17 (100)	0	0	0
<b>Gram pozitif (n=50)</b>	<b>643</b>	<b>631 (98,1)</b>	<b>1(0,2)</b>	<b>3(0,5)</b>	<b>8 (1,2)</b>
<i>S.aureus</i>	320	318 (99,4)	0	0	2 (0,6)
<i>Enterococcus</i> spp.	180	174 (96,7)	0	3(1,7)	3 (1,6)
KNS	80	77 (96,25)	0	0	3 (3,75)
<i>Streptococcus</i> spp.	63	62 (98,4)	1(1,6)	0	0
<b>Toplam</b>	<b>1758</b>	<b>1703 (96,9)</b>	<b>20 (1,1)</b>	<b>17(1)</b>	<b>18 (1)</b>

KNS: Koagülaz negatif stafilocok, n: sayı, KH: Küçük hata, BK: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata

*Enterobacteriaceae* ailesine ait izolatların direkt antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının kategorik uyum ve hata oranları Tablo 7'de gösterilmiştir. 49 izolatta çalışılan 951 testin %96,4'ü (917) kategorik olarak uyumlu bulundu. Küçük hata oranı %1,7 (16), büyük hata oranı %1,3 (12) ve çok büyük hata oranı %0,6 (6) olarak tespit edildi. Amikasin, ampisilin, seftriakson, kolistin ve tigesiklin için kategorik uyum %100 olarak saptandı. Seftolozan-tazobaktam için kategorik uyum kabul edilebilir düzeyin altında (%85,7) bulundu.

**Tablo 7:** *Enterobacteriaceae* Ailesine Ait İzolatların (n=49) Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları

Antibiyotik	Test sayısı	Kategorik uyum	KH	BH	ÇBH
	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Amikasin	49	49 (100)	-	-	-
AMC	49	47 (95,9)	-	2 (4,1)	-
Ampisilin	49	49 (100)	-	-	-
SAM	47	46 (97,9)	-	-	1 (2,1)
Sefazolin	47	46 (97,9)	1 (2,1)	-	-
Sefepim	49	47 (95,9)	2 (4,1)	-	-
Seftazidim	49	46 (93,9)	3 (6,1)	-	-
Sef-Tazo	49	42 (85,7)	-	5 (10,2)	2 (4,1)
Seftriakson	49	49 (100)	-	-	-
Sefuroksim	48	47 (97,9)	1 (2,1)	-	-
Siprofloksasin	49	47 (95,9)	2 (4,1)	-	-
Kolistin*	49	49 (100)	-	-	-
Ertapenem	49	45 (91,9)	-	3 (6,1)	1 (2)
Gentamisin	49	48 (98)	-	-	1 (2)
İmipenem	48	44 (91,7)	3 (6,2)	-	1 (2,1)
Levofloksasin	49	48 (98)	1 (2)	-	-
Meropenem	49	47 (96)	1 (2)	1 (2)	-
TZP	48	46 (95,8)	2 (4,2)	-	-
Tigesiklin	27	27 (100)	-	-	-
TMP-SXT	49	48 (98)	-	1(2)	-
<b>Toplam n (%)</b>	<b>951</b>	<b>917 (96,4)</b>	<b>16 (1,7)</b>	<b>12 (1,3)</b>	<b>6 (0,6)</b>

KH: Küçük hata, BK: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata, AMC: Amoksisilin klavulanik asit, SAM: Ampisilin-sulbaktam, Sef-Tazo: Seftolozan-tazobaktam, TZP: Piperasilin-tazobaktam, TMP-SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol

\*Kolistin duyarlılığı referans yöntemle çalışılmadan kategorik uyum hesaplanmıştır.

Nonfermenter gram negatif bakterilerin direkt antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının kategorik uyum ve hata oranları Tablo 8’de gösterilmiştir. 21 izolatta çalışılan 164 testin %94,5’i (155) kategorik olarak uyumlu bulundu. Küçük hata oranı %1,8 (3), büyük hata oranı %1,2 (2) ve çok büyük hata oranı %2,5 (4) olarak

tespit edildi. Amikasin, seftazidim, imipenem, levofloksasin ve meropenem için kategorik uyum %100 olarak saptandı. En düşük kategorik uyum ve en yüksek çok büyük hata oranı gentamisinde tespit edildi. Gentamisine ait 2 çok büyük hata ve 1 büyük hata *A. baumannii* izolatlarında saptandı.

**Tablo 8:** Nonfermenter Gram Negatif Bakterilerin (n=21) Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları

Antibiyotik	Test sayısı	Kategorik uyum	KH	BH	ÇBH
	N	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Amikasin	19	19 (100)	-	-	-
Sefepim	5	4 (80)	1 (20)	-	-
Seftazidim	5	5 (100)	-	-	-
Sef-Tazo	5	4 (80)	-	1 (20)	-
Siprofloksasin	19	18 (94,7)	1 (5,3)	-	-
Kolistin*	19	18 (94,7)	-	-	1 (5,3)
Gentamisin	14	11 (78,6)	-	1 (7,1)	2 (14,3)
İmipenem	19	19 (100)	-	-	-
Levofloksasin	19	19 (100)	-	-	-
Meropenem	19	19 (100)	-	-	-
TZP	5	4 (80)	1 (20)	-	-
TMP-SXT	16	15 (93,75)	-	-	1 (6,25)
<b>Toplam n (%)</b>	<b>164</b>	<b>155 (94,5)</b>	<b>3 (1,8)</b>	<b>2 (1,2)</b>	<b>4 (2,5)</b>

KH: Küçük hata, BK: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata, Sef-Tazo: Seftolozan-tazobaktam,

TZP: Piperasilin-tazobaktam, TMP-SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol

\*Kolistin duyarlılığı referans yöntemle çalışılmadan kategorik uyum hesaplanmıştır.

*Staphylococcus* türlerinin direkt antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının kategorik uyum ve hata oranları Tablo 9’da gösterilmiştir. 25 izolatta çalışılan 400 testin %98,75’i (395) kategorik olarak uyumlu bulundu. Çok büyük hata oranı %1,25 (5) olarak tespit edildi. Küçük hata ve büyük hata saptanmadı. Amikasin, siprofloksasin, klindamisin, levofloksasin, linezolid, moksifloksasin, oksasilin, penisilin G, teikoplanin, tetrasiklin ve vankomisin için kategorik uyum %100 olarak bulundu.

**Tablo 9:** *Staphylococcus* Türlerinin (n=25) Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları

Antibiyotik	Test sayısı	Kategorik uyum	KH	BH	ÇBH
	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Amikasin	25	25 (100)	-	-	-
Siprofloksasin	25	25 (100)	-	-	-
Klindamisin	25	25 (100)	-	-	-
Daptomisin	25	24 (96)	-	-	1 (4)
Eritromisin	25	24 (96)	-	-	1 (4)
Fosfomisin	25	24 (96)	-	-	1 (4)
Gentamisin	25	24 (96)	-	-	1 (4)
Levofloksasin	25	25 (100)	-	-	-
Linezolid	25	25 (100)	-	-	-
Moksifloksasin	25	25 (100)	-	-	-
Oksasilin	25	25 (100)	-	-	-
Penisilin G	25	25 (100)	-	-	-
Teikoplanin	25	25 (100)	-	-	-
Tetrasiklin	25	25 (100)	-	-	-
TMP-SXT	25	24 (96)	-	-	1 (4)
Vankomisin	25	25 (100)	-	-	-
<b>Toplam n (%)</b>	<b>400</b>	<b>395 (98,75)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>5 (1,25)</b>

KH: Küçük hata, BK: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata, TMP-SXT:Trimetoprim-sulfametoksazol

*Enterococcus* ve *streptococcus* türlerinin direkt antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının kategorik uyum ve hata oranları Tablo 10'da gösterilmiştir. Toplam 25 izolatta çalışılan 243 testin %97,1'i (236) kategorik olarak uyumlu bulundu. Küçük hata oranı %0,4 (1), büyük hata oranı %1,25 (3) ve çok büyük hata oranı %1,25 (3) olarak tespit edildi.

**Tablo 10:** *Enterococcus* (n=20) ve *Streptococcus* (n=5) Türlerinin Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçlarının Kategorik Uyum ve Hata Oranları

Antibiyotik	Test sayısı	Kategorik uyum	KH	BH	ÇBH
	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
AMC	22	22 (100)	-	-	-
Ampisilin	20	20 (100)	-	-	-
Sefepim	5	5 (100)	-	-	-
Sefotaksim	5	4 (80)	1 (20)	-	-
Sefuroksim	5	5 (100)	-	-	-
Siprofloksasin	20	19 (95)	-	1 (5)	-
Kloramfenikol	3	3 (100)	-	-	-
Klindamisin	5	5 (100)	-	-	-
Eritromisin	3	3 (100)	-	-	-
Gentamisin Syn	20	19 (95)	-	-	1 (5)
Levofloksasin	23	21 (91,3)	-	1 (4,35)	1 (4,35)
Linezolid	23	22 (95,65)	-	1 (4,35)	-
Meropenem	5	5 (100)	-	-	-
Moksifloksasin	3	3 (100)	-	-	-
Penisilin G	5	5 (100)	-	-	-
Streptomisin Syn	20	19 (95)	-	-	1 (5)
Teikoplanin	25	25 (100)	-	-	-
Tetrasiklin	3	3 (100)	-	-	-
TMP-SXT	3	3 (100)	-	-	-
Vankomisin	25	25 (100)	-	-	-
<b>Toplam n (%)</b>	<b>243</b>	<b>236 (97,1)</b>	<b>1 (0,4)</b>	<b>3 (1,25)</b>	<b>3 (1,25)</b>

AMC: Amoksisilin klavulanik asit, TMP-SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol

Amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin, sefepim, sefuroksim, kloramfenikol, klindamisin, eritromisin, meropenem, moksifloksasin, penisilin G, teikoplanin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol ve vankomisin için kategorik uyum %100 olarak saptandı.

## 5. TARTIŞMA

Sepsiste uygun antibiyotik tedavisinin erken başlanması, tedavi yanıtını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Kan kültürü; patojen mikroorganizmanın tanımlanmasının yanında, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin de yapılmasına olanak sağladığı için sepsisin mikrobiyolojik tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (31,38). Konvansiyonel yöntemde kan kültür şişelerinin otomatize sistemlerde inkübasyonu ve pozitif sinyal vermesinden sonra, tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesi için katı agarlara ekim yapıp 18-24 saat inkübe edilmesi gerekmektedir. Bu sürecin uzunluğu nedeniyle, klinik değerlendirmeye dayalı geniş spektrumlu ampirik tedavi, sepsis tedavisinin temel dayanağı olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, ampirik antibiyotiklerin hastaların %25-50'sinde yetersiz veya gereksiz olduğu gösterilmiştir (68,69). Gereksiz antibiyotikler, antibiyotik direncinin gelişmesine, *Clostridium difficile* veya invaziv mantar enfeksiyonu riskinin artmasına ve sağlık hizmeti maliyetlerinin yükselmesine yol açabilir (70,71). Uygun olmayan antibiyotikler ise tedavi yanıtını olumsuz etkilemektedir. Etkili antibiyotik tedavisinin başlanmasındaki her bir saatlik gecikme mortaliteyi %7,6 oranında artırmaktadır (6).

MALDI TOF MS teknolojisi günümüzde direkt kan kültür şişesinden tanımlama için kullanılabilir. Bu amaçla çeşitli ticari kitler ve laboratuvar içi yöntemler geliştirilmiştir. Hazır ticari kitlerin en önemli dezavantajı yüksek maliyetleridir. Laboratuvarda geliştirilen yöntemlerde saponin, amonyum klorür, trifloroasetik asit (TFA), TritonX gibi lizis solüsyonları veya serum ayırıcı tüpler kullanılmıştır (5,11,19,57-61,63). Çalışmamızda diğerlerine göre daha az basamaklı ve düşük maliyetli olan serum ayırıcı tüp yöntemi kullanılmıştır. Azrad ve ark.'nın kullandığı yöntem yüksek devirli santrifüj cihazı gerektirmeyecek şekilde modifiye edilmiştir (19). Bu protokol ile kan kültür şişesinden bakteri süspansiyonu elde etme işlemi yaklaşık 20 dakika sürmektedir. Elde edilen bakteri süspansiyonu MALDI TOF MS ile tanımlama ve Phoenix cihazında antibiyotik duyarlılığı çalışılması için kullanılmıştır. Bu yöntemle pozitif sinyal sonrası bir saatten kısa bir sürede patojen

bakteri tanımlanırken, antibiyotik duyarlılık testleri konvansiyonel yöntemle göre yaklaşık 24 saat daha erken sonuçlanmaktadır.

Çalışmamızda değerlendirilen kan kültür şişelerinden %65’inde Gram pozitif ve %35’inde ise Gram negatif bakteri üremesi olmuştur. Ülkemizde yapılan benzer çalışmalarda da Gram pozitif bakteri üremesi %56 ile %67 arasında, Gram negatif bakteri üremesi ise %29 ile %34 arasında bulunduğu bildirilmiştir (72–74).

Bu çalışmada pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinde etken veya kontaminasyon ayırımı yapmadan genel olarak en sık üreyen bakteriler sırasıyla koagülaz negatif stafilokoklar, *E. coli*, *S. aureus* ve *K. pneumonia* olarak tespit edilmiştir. Vendemiato ve ark.’nın yaptığı benzer çalışmada kan kültürlerinde en sık saptanan ilk dört bakteri bu çalışmayla benzer bulunmuştur (75). Mataj ve ark.’nın kan dolaşımı enfeksiyonu etkenlerini araştırdığı çalışmada da; en sık üreyen Gram negatif bakteri *E. coli* iken Gram pozitif bakteri ise koagülaz negatif stafilokok olarak tespit edilmiştir (76).

Literatürde serum ayırıcı tüpler kullanılarak direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS yöntemi ile yapılan çalışmalarda Gram negatif bakterilerin doğru tanımlanma oranları %90 ile %95 arasında, Gram pozitif bakterilerin doğru tanımlanma oranları ise %82,3 ile %92 arasında bulunduğu bildirilmiştir (2,5,19,20). Çalışmamızda da benzer şekilde Gram negatif bakterilerin %98,6’sı, Gram pozitif bakterilerin %85,4’ü direkt MALDI TOF MS yöntemi ile tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır. Saponin kullanılarak yapılan çalışmalarda direkt kan kültür şişesinden Gram negatif bakterilerin doğru tanımlanma oranları sırasıyla %92,6 ve %93, Gram pozitif bakterilerin doğru tanımlanma oranları ise sırasıyla %73,9 ve %81 olduğu tespit edilmiştir (22,77). Amonyum klorür kullanarak direkt kan kültür şişesinden tanımlama yapılan bir çalışmada ise Gram negatif bakterilerin %90’ı, Gram pozitif bakterilerin %73’ü doğru tanımlanmıştır (61).

Direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS ile tanımlama yapılan çalışmalarda sonuçlar benzer olmakla birlikte, bizim çalışmamızda doğru tanımlama oranları çoğu çalışmadan yüksek bulunmuştur. Tanımlama sonuçları arasındaki farklılıkların sebepleri arasında numune elde etmede kullanılan yöntem, kan kültür

şişelerinin içeriği, çalışılan bakteri türleri ve kullanılan MALDI TOF MS sistemi sayılabilir. Direkt kan kültür şişesinden tanımlamada MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Almanya) ve VITEK MS (bioMérieux, Fransa) sistemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada doğru tanımlama oranlarının MALDI Biotyper sisteminde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (57).

Çalışmamızda direkt yöntemle 70 Gram negatif bakterinin tamamı (%100) cins düzeyinde, 69'u (%98,6) ise tür düzeyinde doğru tanımlanmıştır. Direkt yöntemle Gram negatif bakterilerin %95,7'si 1,7'nin üzerinde MS skoru ile tanımlanırken, %61,4'ü 2'nin üzerinde skorla tanımlanmıştır. Bu sonuçlar Gram negatif bakterilerde direkt MALDI TOF MS ile tanımlama sonuçlarının güvenilir olduğunu göstermektedir. Yalnızca bir *A. baumannii* izolatu direkt yöntemle *A. nosocomialis* olarak tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda *Acinetobacter* türlerinin fenotip ve protein profili bakımından benzer olması nedeniyle MALDI TOF MS ile tür düzeyinde tanımlanmasında sorunlar olduğu bildirilmiştir (78–80).

Çalışmamızda direkt yöntemle 130 Gram pozitif bakterinin 119'u (%91,5) cins düzeyinde, 111'i (%85,4) tür düzeyinde doğru tanımlanmıştır. Direkt yöntemle Gram pozitif bakterilerin, %50'si 1,7'nin üzerinde MS skoru ile, %15,4'ü ise 2'nin üzerinde MS skoru ile tanımlanmıştır. Literatürle uyumlu olarak direkt MALDI TOF MS yöntemiyle tanımlama oranları ve skorları, Gram pozitif bakterilerde Gram negatif bakterilerden daha düşük bulunmuştur. Bu durumun en önemli nedeni kan kültür şişesinden elde edilen süspansiyondaki düşük bakteri sayısıdır (1,5). Diğer bir neden ise Gram pozitif bakterilerin hücre duvarındaki kalın peptidoglikan tabakanın protein ekstraksiyonunu olumsuz etkilemesidir (1,53,81).

Direkt MALDI TOF MS yöntemiyle Gram pozitif bakterilerin 8'i (%6,1) sadece cins düzeyinde doğru tanımlanabilmiştir. Bu sekiz bakterinin tümü koagülaz negatif stafilokoklardır. Gram pozitif bakterilerin direkt MALDI TOF MS ile tanımlanmasındaki kısıtlamaların yanı sıra koagülaz negatif stafilokokların yüksek derecede genetik benzerliği, tür düzeyinde tanımlanmalarını zorlaştırmaktadır (53).

Literatürde direkt yöntemle yanlış tanımlama oranları %0 ile %4 arasında değişmektedir (2,19,82). Çalışmamızda ise yanlış tanımlanan izolat olmamıştır.

Değerlendirilen 200 örnekten 11'inde (%5,5) MS analizinde herhangi bir kütle spektrum piki elde edilememiştir. Tanımlanamayan 11 izolatın 10 tanesi koagülaz negatif stafilokok, 1'i *C. amycolatum* olmak üzere tümü Gram pozitif bakterilerdir. Aynı zamanda tümü cilt florası üyesi olup, üremeleri kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir. Tanımlanamayan izolatlar hariç tutulduğunda, direkt kan kültür şişesinden yapılan MS analizinde tanımlanabilen izolatların sonuçları değerlendirildiğinde, tüm sonuçlar rutin yöntemle elde edilen sonuçlarla cins düzeyinde uyumlu bulunmuştur.

Çalışmaya dahil edilen şişelerin üçünde anaerop bakteri üremiştir. Bu bakteriler direkt MALDI TOF MS yöntemiyle *Ruminococcus gnavus*, *Clostridium boltae* ve *Bacteroides fragilis* olarak tanımlanmıştır. Üçünün de MS skorları 2'nin üzerinde olup tür düzeyinde güvenilir kategorisindedir. Tanımlama sonuçları Gram boya incelemesi ile uyumlu bulunmuştur. Laboratuvarımızda anaerop kültür yapılamadığı için direkt tanımlama sonuçları doğrulanamamıştır. Dai ve ark.'nın yaptığı çalışmada direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS ile 30 anaerop bakterinin 28'i (%93,3) doğru tanımlanmıştır (83). Bu da direkt MALDI TOF MS yönteminin, üremesi için özel şartlar gerektiren anaerop bakterileri tanımlamak için güvenilir olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda üretici firma tarafından belirlenen tür düzeyinde güvenilir MS skor limitinin ( $\geq 2$ ) yüksek olduğu ve düşürülmesi gerektiği bildirilmiştir (19,82,84). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da 1,8'in üzerinde skorla tanımlanan tüm izolatlar tür düzeyinde doğru olarak tanımlanmıştır.

Sepsis tedavisinde patojen mikroorganizmanın erken tanımlanması ampirik tedavinin seçilmesinde klinisyene yol gösterici olsa da, hedefe yönelik antibiyotik tedavisinin verilebilmesi için antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlanması gerekmektedir. Pozitif kan kültür şişesinden elde edilen bakteri süspansiyonu kullanılarak otomatize sistemlerde duyarlılık çalışıldığında, sonuçlar konvansiyonel yöntemle göre yaklaşık 24 saat daha erken alınabilmektedir. Wu ve ark.'nın serum ayırıcı tüp yöntemiyle Vitek-2 cihazını kullanarak 38 Gram pozitif ve 88 Gram negatif bakteri ile yaptıkları çalışmada; Gram pozitif bakterilerde %0,2 küçük hata,

%0,2 büyük hata, %0,4 çok büyük hata, %99,2 oranında kategorik uyum tespit edilirken, Gram negatif bakterilerde %0,7 küçük hata, %0,2 büyük hata, %0,5 çok büyük hata ve %98,6 oranında kategorik uyum saptanmıştır (2). Jo ve ark.'nın saponin yöntemiyle Vitek-2 cihazını kullanarak 51 Gram pozitif ve 69 Gram negatif bakteri ile yaptıkları çalışmada; Gram pozitif bakterilerde %2,2 küçük hata, %0,1 büyük hata, %0,5 çok büyük hata, %97,2 oranında kategorik uyum bulunurken, Gram negatif bakterilerde %1,4 küçük hata ve %98,6 oranında kategorik uyum saptanmıştır (22). Bu çalışmamızda genel olarak küçük, büyük ve çok büyük hata oranları diğer çalışmalara göre yüksek, kategorik uyum ise benzer olarak bulunmuştur. Antibiyotik duyarlılık testleri için >%90 genel kategorik uyum, <%1,5 çok büyük hata oranı ve <%3 büyük hata oranının kabul edilebilir olduğu bildirilmektedir (67). Dolayısıyla çalışmamızın sonuçları bu kriterleri karşılamaktadır.

Pheonix cihazı ile yapılan çalışmaların çoğu Gram negatif bakteriler üzerinde yapılmıştır. Bahçe ve ark.'nın 120 Gram negatif bakteri ile yaptıkları çalışmada kategorik uyum %95,5 olarak bulunurken, %2 küçük hata, %1,1 büyük hata ve %1,2 çok büyük hata tespit edildiği bildirilmiştir (4). Funke ve ark.'nın 309 Gram negatif bakteriyi içeren çalışmada %99 kategorik uyum, %0,8 küçük hata, %0,1 büyük hata ve %0,1 çok büyük hata bulmuşlardır (85). Wimmer ve ark.'nın 110 Gram negatif bakteri ile yaptıkları çalışmada %98 kategorik uyum, %1,37 küçük hata, %0,32 büyük hata ve %0,26 çok büyük hata tespit edilmiştir (86). Bu çalışmaların üçünde de serum ayırıcı tüp yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamızda Gram negatif bakterilerde kategorik uyum %96,2, küçük hata %1,7, büyük hata %1,2, çok büyük hata ise %0,9 olarak bulunmuştur. Sonuçlar büyük oranda benzerlik gösterse de hata oranları arasındaki farklar; serum ayırıcı tüp kullanılarak uygulanan protokoldeki değişiklikler ve çalışılan izolatların duyarlılık profillerindeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda Enterobacteriaceae ailesine ait 49 izolatta çalışılan 951 test sonucu değerlendirildiğinde kategorik uyum %96,4 olarak tespit edilmiştir. Romero-Gomez ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise bu oran çalışmamızla uyumlu olarak %96,6

bulunmuştur (87). Test edilen 20 antibiyotikten sadece seftolozan-tazobaktam için kategorik uyum kabul edilebilir düzeyin altında saptanmıştır.

Nonfermenter Gram negatif bakterilerin direkt antibiyotik duyarlılık sonuçları değerlendirildiğinde kategorik uyum %94,5 olarak tespit edilmiştir. Bu oran Bahçe ve ark.'nın çalışmasında %93,7 (4), Pan ve ark.'nın çalışmasında %93,22 (21), Romero-Gomez ve ark.'nın çalışmasında ise %92,3 (87) olarak çalışmamıza göre daha düşük bulunmuştur. Test edilen 12 antibiyotikten 5'inin (amikasin, seftazidim, imipenem, levofloksasin, meropenem) kategorik uyumu %100 olarak saptanmıştır. *Pseudomonas* izolatlarının sayısı değerlendirme için yetersiz olsa da, tedavide ilk seçenek olan seftazidim için kategorik uyumun %100 olması anlamlıdır.

*S. aureus* izolatlarında direkt yöntemle çalışılan 320 testin %99,4'ü kategorik olarak uyumlu bulunmuştur. Pan ve ark.'nın yaptığı çalışmada bu oran %98,6 olarak tespit edilmiştir (21). Sonuçlar benzer olmakla birlikte çalışmamızda daha yüksek kategorik uyum bulunmuştur. Çalışmamızdaki *Stapylococcus* türlerinin tamamı değerlendirildiğinde kategorik uyum %98,75 olarak saptanmıştır. Test edilen 16 antibiyotikten 11'i için kategorik uyum %100 olarak bulunmuştur. Oksasilin sonuçlarının %100 uyumlu olması yöntemimizin metisilin direncini tespit etmede güvenilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca vankomisin, teikoplanin ve linezolid için de kategorik uyumun %100 olması sevindiricidir.

*Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerinde çalışılan toplam 243 testin %97,1'i kategorik olarak uyumlu bulunmuştur. Pan ve ark.'nın çalışmasında *Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerinde çalışılan 68 testte kategorik uyum %94,1 olarak tespit edilmiştir (21). Romero-Gomez ve ark.'nın çalışmasında ise *Enterococcus* türlerinde çalışılan 396 testte kategorik uyum çalışmamızla benzer şekilde %97,7 olarak saptanmış (87). Çalışmamızda test edilen 20 antibiyotikten sadece sefotaksim için kategorik uyum kabul edilebilir düzeyin altında bulunmuştur. Vankomisin için kategorik uyumun %100 olması yöntemimizin vankomisin dirençli enterokokları (VRE) tespit etmede etkili olabileceğini göstermektedir.

Pozitif sinyal veren kan kültür şişesinden direkt tanımlama ve antibiyotik duyarlılığı çalışmalarında kritik basamak bakterilerin kan hücreleri, serum ve sıvı

besiyerinden ayrıştırılmasıdır. Özellikle direkt yöntemle çalışılan antibiyotik duyarlılık testlerinde tespit edilen hataların yetersiz inokulum miktarı veya yetersiz yıkama işlemi nedeniyle bakterilerin şişe içeriğinden tamamen ayrıştırılmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda direkt yöntemle çalışılan antibiyotik duyarlılık testlerinde kabul edilebilir düzeylerin üzerinde uyum bulunmuştur. Ancak hataları daha da azaltmak için kan kültür şişesinden bakteri süspansiyonunu elde etmede kullanılan protokolün geliştirilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmanın kısıtlılıklarından biri bazı bakteri türlerinde izolat sayısının düşük olmasıdır. Çalışmamız 3 aylık bir dönemde yapılmış olup 203 kan kültür şişesinden tanımlama yapılmış ve 120 izolatta antibiyotik duyarlılığı çalışılmıştır. Çok merkezli ve daha uzun dönemde yapılacak olan çalışmalarda daha fazla türde bakteri tanımlanabilir ve antibiyotik duyarlılık testlerinin çalışıldığı izolat sayıları artırılabilir. Ayrıca polimikrobiyal üreme ve maya üremesi olan örnekler çalışma dışı bırakılmıştır. Bu nedenle serum ayırıcı tüp kullanılarak direkt MALDI TOF MS ile tanımlama yönteminin mayalar ve polimikrobiyal üremelerdeki performansı değerlendirilememiştir.

Çalışmanın diğer bir kısıtlılığı ise direkt yöntemle Phoenix cihazından elde edilen antibiyotik duyarlılığı sonuçları değerlendirilirken, test performanslarını karşılaştırmak için rutin yöntemle Phoenix cihazından alınan sonuçların referans yöntem olarak kabul edilmesidir. İki yöntemle elde edilen sonuçlardaki uyumsuzlukların manuel olarak tekrar test edilmesi hata oranlarının daha doğru şekilde elde edilmesini sağlayabilirdi.

## 6. SONUÇ

Çalışmamızda 200 kan kültür şişesinden serum ayırıcı tüp kullanılarak geliştirilen yöntemle direkt MALDI TOF MS ile tanımlama yapıldı ve sonuçlar katı besiyerinde üreme sonrası kolonilerden yapılan MALDI TOF MS sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

Direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS yöntemiyle Gram negatif bakterinin %98,6'sı tür ve %1,4'ü sadece cins düzeyinde, Gram pozitif bakterilerde ise %85,4'ü tür ve %6,1'i sadece cins düzeyinde doğru tanımlandı. Gram negatif bakterilerde yanlış tanımlanan veya tanımlanamayan izolat tespit edilmedi. Gram pozitif bakterilerde ise yanlış tanımlanan izolat olmazken, %8,5'i direkt yöntemle tanımlanamadı.

Çalışmamızda direkt yöntemle tanımlanan bakterilerden etken olarak değerlendirilen 120 bakterinin, tanımlama için elde edilen bakteri süspansiyonu kullanılarak Phoenix cihazında antibiyotik duyarlılık testleri çalışıldı. Sonuçlar katı besiyerinde üreme sonrası Phoenix cihazında çalışılan duyarlılık testi sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Kategorik uyum >%90, büyük hata oranı <%3 ve çok büyük hata oranı <%1,5 olduğu için rutin yöntemle kabul edilebilir düzeyde uyumlu olduğu bulundu.

Sonuç olarak hızlı, kolay ve düşük maliyetli olan serum ayırıcı tüp yönteminin, direkt kan kültür şişelerinden tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testi çalışılmasında etkili bir yöntem olduğu ve rutin yöntemle kabul edilebilir düzeyde uyumlu sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Bu yöntemle pozitif sinyal sonrası 1 saatten kısa sürede patojen bakteri tanımlanabilmekte ve antibiyotik duyarlılık testleri rutin yöntemle göre yaklaşık 24 saat daha erken sonuçlanmaktadır. Yapılacak geniş örneklemlerle çalışmalarla yöntemin daha da geliştirilmesiyle birlikte sepsis tanılı hastalarda hedefe yönelik tedavinin daha erken başlanmasını ve mortalitenin azaltılmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Ruiz-Aragón J, Ballester-Téllez M, Gutiérrez-Gutiérrez B, de Cueto M, Rodríguez-Baño J, Pascual Á. Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018 Oct 1;36(8):484–92.
2. Wu S, Xu J, Qiu C, Xu L, Chen Q, Wang X. 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*. 2019 Feb 1;157:16–20.
3. Adhikari KJ, Fowler RA, Rubenfeld GD, Gordon D, Rubenfeld D, Adhikari NKJ, et al. Critical Care 1 Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* [Internet]. 2010;375:1339–85. Available from: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/index.html).
4. Bahçe YG, Toyran A, Aksoy A. Direct identification and determination of antimicrobial susceptibility of gram negative bacilli using the Phoenix™ FX system in blood cultures flagging positive. *Mikrobiyol Bul*. 2019;53(2):119–33.
5. Freimann S, Shapira M, Athamna A. Serum separator tube method for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight analysis. *Access Microbiol*. 2019 Apr 1;1(2).
6. Di Gaudio F, Indelicato S, Indelicato S, Tricoli MR, Stampone G, Bongiorno D. Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with Sepsityper kit. *J Microbiol Methods*. 2018 Dec 1;155:1–7.
7. Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern G v. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul 1;41(7):3119–25.
8. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Vol. 36, *FEMS Microbiology Reviews*. 2012. p. 380–407.
9. Luethy PM, Johnson JK. The Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for the Identification of Pathogens Causing Sepsis. Vol. 3, *The journal of applied laboratory medicine*. NLM (Medline); 2019. p. 675–85.
10. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. 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*. 2010 Mar;48(3):900–7.

11. Bazzi AM, Rabaan AA, El Edaily Z, John S, Fawarah MM, Al-Tawfiq JA. Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. *J Infect Public Health*. 2017 May 1;10(3):308–15.
12. Scott JS, Sterling SA, To H, Seals SR, Jones AE. Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry in blood bacterial infections: A systematic review and meta-analysis. *Infect Dis*. 2016 Jul 2;48(7):530–6.
13. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016 Nov 1;52:37–42.
14. Campigotto A, Goneau L, Matukas LM. Direct identification and antimicrobial susceptibility testing of microorganisms from positive blood cultures following isolation by lysis-centrifugation. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Nov 1;92(3):189–93.
15. McIver CJ, Er N, Mukerjee C, Tokis S, Taylor P. A simplified and rapid method for the direct identification of microorganisms in positive BacT/ALERT blood culture bottles using MALDI-TOF MS. *Pathology*. 2018 Oct 1;50(6):676–9.
16. Schieffer KM, Tan KE, Stamper PD, Somogyi A, Andrea SB, Wakefield T, et al. Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK® diagnostic blood culture systems. *J Appl Microbiol*. 2014;116(4):934–41.
17. Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette MP, de Mol P, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol*. 2012 Nov;61(PART 11):1511–6.
18. Kayin M, Mert B, Aydemir S, Özenci V. 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. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2019 Nov 1;38(11):2133–43.
19. Azrad M, Keness Y, Nitzan O, Pastukh N, Tkhawkho L, Freidus V, et al. Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect Dis*. 2019 Jan 18;19(1).
20. Yuan Y, Wang J, Zhang J, Ma B, Gao S, Li Y, et al. Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Clin Lab Anal*. 2020 Apr 1;34(4).
21. Pan HW, Li W, Li RG, Li Y, Zhang Y, Sun EH. Simple sample preparation method for direct microbial identification and susceptibility testing from positive blood cultures. *Front Microbiol*. 2018 Mar 20;9(MAR).

22. Jo SJ, Park KG, Han K, Park DJ, Park YJ. Direct identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and the vitek 2 system. *Ann Lab Med.* 2016 Mar 1;36(2):117–23.
23. KLİMUD. Kan Dolaşımı Örneklerinin Laboratuvar İncelemesi Rehberi 2022.
24. Prof.Dr.Hakkı Bilgehan. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5th ed. 2009. 317 p.
25. Seifert H. The Clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. In: *Clinical Infectious Diseases.* 2009.
26. Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. Sepsis: Evolving concepts and challenges. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2019;52(4).
27. Perner A, Holst LB, Haase N, Hjortrup PB, Møller MH. Common Sense Approach to Managing Sepsis. Vol. 34, *Critical Care Clinics.* W.B. Saunders; 2018. p. 127–38.
28. Walkey AJ, Lagu T, Lindenauer PK. Trends in sepsis and infection sources in the United States: A population-based study. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Feb 1;12(2):216–20.
29. Azar AM, Redfield RR, Rothwell CJ, Director MBA. Health, United States, 2017, With Special Feature on Mortality [Internet]. 2017. Available from: <https://www.>
30. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest.* 2009 Nov 1;136(5):1237–48.
31. Florio W, Morici P, Ghelardi E, Barnini S, Lupetti A. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections. Vol. 44, *Critical Reviews in Microbiology.* Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 351–70.
32. Gonzalez MD, Chao T, Pettengill MA. Modern Blood Culture: Management Decisions and Method Options. Vol. 40, *Clinics in Laboratory Medicine.* W.B. Saunders; 2020. p. 379–92.
33. Fabre V, Carroll KC, Cosgrove SE. Blood Culture Utilization in the Hospital Setting: a Call for Diagnostic Stewardship. 2022.
34. Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: How to obtain, process, report, and interpret. Vol. 19, *Clinical Microbiology and Infection.* Blackwell Publishing Ltd; 2013. p. 513–20.
35. Başustaoğlu A. Kan Kültürü Uygulama Kılavuzu. 2013.
36. Cheng MP, Stenstrom R, Paquette K, Stabler SN, Akhter M, Davidson AC, et al. Blood Culture Results Before and After Antimicrobial Administration in Patients With Severe Manifestations of Sepsis: A Diagnostic Study. *Ann Intern Med.* 2019 Oct 15;171(8):547–54.

37. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. Vol. 21, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2015. p. 313–22.
38. Martinez RM, Wolk DM. Bloodstream Infections. Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, Tang YW, editors. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016 Aug 12;4(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0031-2016>
39. Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC. Time to Detection of Positive BacT/Alert Blood Cultures and Lack of Need for Routine Subculture of 5-to 7-Day Negative Cultures. Vol. 30, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1992.
40. Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP, Joho K, Wakefield T, Reller LB, et al. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organisms: A retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol*. 2006 Jan;44(1):257–9.
41. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged Incubation and Extensive Subculturing Do Not Increase Recovery of Clinically Significant Microorganisms from Standard Automated Blood Cultures [Internet]. 2005. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/>
42. Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, Morello JA, Leitch CD, Matushek S, et al. Multicenter Clinical Evaluation of a Continuous Monitoring Blood Culture System Using Fluorescent-Sensor Technology (BACTEC 9240). Vol. 31, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1993.
43. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, Diguiseppi JL, Willert, M, Mirrett S, et al. BacT/Alert: an Automated Colorimetric Microbial Detection System. Vol. 28, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1990.
44. Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, Sangwan G, Lawhorn J, Drake CA, et al. Decreased mortality associated with prompt gram staining of blood cultures. *Am J Clin Pathol*. 2008 Dec;130(6):870–6.
45. Kuper KM, Boles DM, Mohr JF, Wanger A. Antimicrobial susceptibility testing: A primer for clinicians. Vol. 29, *Pharmacotherapy*. 2009. p. 1326–43.
46. Holland TL, Woods CW, Joyce M. Antibacterial Susceptibility Testing in the Clinical Laboratory. Vol. 23, *Infectious Disease Clinics of North America*. 2009. p. 757–90.
47. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. Vol. 49, *Clinical Infectious Diseases*. 2009. p. 1749–55.
48. Mittman SA, Huard RC, Della-Latta P, Whittier S. Comparison of BD Phoenix to Vitek 2, MicroScan MICRoSTREP, and Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3557–61.
49. Donay JL, Mathieu D, Fernandes P, Prégermain C, Bruel P, Wargnier A, et al. Evaluation of the Automated Phoenix System for Potential Routine Use in the Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr;42(4):1542–6.

50. Eigner U, Schmid A, Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and phoenix systems. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):3829–34.
51. Chapin KC, Musgnug MC. Validation of the automated reading and incubation system with sensititre plates for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2003 May 1;41(5):1951–6.
52. Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. Vol. 25, *Molecules*. MDPI AG; 2020.
53. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul;26(3):547–603.
54. Peters RPH, Agtmael MAV, Danner SA, Savelkoul PHM, Vandembroucke-Grauls CMJE. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis.* 2004 Dec 1;4(12):751–60.
55. Josefson P, Strålin K, Ohlin A, Ennefors T, Dragsten B, Andersson L, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [Internet]. 2011;30(9):1127–34. Available from: <https://hal.science/hal-00676224>
56. Buetti N, Marschall J, Atkinson A, Kronenberg A. National Bloodstream Infection Surveillance in Switzerland 2008-2014: Different Patterns and Trends for University and Community Hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016 Sep 1;37(9):1060–7.
57. Chen JHK, Ho PL, Kwan GSW, She KKK, Siu GKH, Cheng VCC, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1733–9.
58. Monteiro J, Inoue FM, Lobo APT, Sugawara EK, Boaretti FM, Tufik S. Fast and reliable bacterial identification direct from positive blood culture using a new TFA sample preparation protocol and the Vitek® MS system. *J Microbiol Methods.* 2015 Feb 1;109:157–9.
59. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O, Vandenberg O. 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. Vol. 31, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2012. p. 2269–81.
60. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porrás-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection.* 2011;17(4):546–51.

61. Prod'Hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification From positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr 1;48(4):1481–3.
62. Yonezawa T, Watari T, Ashizawa K, Hanada D, Yanagiya T, Watanabe N, et al. Development of an improved rapid BACpro® protocol and a method for direct identification from blood-culture-positive bottles using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2018 May 1;148:138–44.
63. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010;16(11):1631–8.
64. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA. Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection.* Elsevier B.V.; 2020. p. 142–50.
65. van Belkum A, Bachmann TT, Lüdke G, Lisby JG, Kahlmeter G, Mohess A, et al. Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Jan 1;17(1):51–62.
66. Schulthess B, Brodner K, Bloemberg G V., Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun;51(6):1834–40.
67. Yonetani S, Okazaki M, Araki K, Makino H, Fukugawa Y, Okuyama T, et al. Direct inoculation method using BacT/ALERT 3D and BD Phoenix System allows rapid and accurate identification and susceptibility testing for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods in aerobic blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 Jun;73(2):129–34.
68. Willemsen I, Groenhuijzen A, Bogaers D, Stuurman A, Van Keulen P, Kluytmans J. Appropriateness of antimicrobial therapy measured by repeated prevalence surveys. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Mar;51(3):864–7.
69. Vora NM, Kubin CJ, Furuya EY. Appropriateness of gram-negative agent use at a Tertiary Care Hospital in the setting of significant antimicrobial resistance. *Open Forum Infect Dis.* 2015 Jan 1;2(1).
70. Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: Systematic review and meta-analysis. Vol. 340, *BMJ (Online).* 2010. p. 1120.
71. Schuts EC, Hulscher MEJL, Mouton JW, Verduin CM, Stuart JWTC, Overdiek HWPM, et al. Current evidence on hospital antimicrobial stewardship objectives: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016 Jul 1;16(7):847–56.

72. Turhanoglu M. Evaluation of the Results Obtained from Microbiological Analysis of Blood Cultures over 5 Years. *Journal of Family Medicine and Health Care*. 2016;2(4):43.
73. Süzük Yıldız S, Evren E, Hekimoğlu CH, Altinok S, Şimşek H, Karahan ZC, et al. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house tween® 80 method: Experimental and clinical study. *Mikrobiyol Bul*. 2021;54(4):523–34.
74. Çetin F, Mumcuoğlu I, Aksoy A, Gürkan Y, Aksu N. Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2014;71(2):67–74.
75. Vendemiato AVR, von Nowakonski A, Marson FA de L, Levy CE. Microbiological characteristics of sepsis in a University hospital. *BMC Infect Dis*. 2015 Feb 14;15(1).
76. Mataj V, Guney M, Sig AK, Uskudar-Guclu A, Albay A, Bedir O, et al. An investigation into bacterial bloodstream infections and antibiotic resistance profiles in a tertiary hospital for a ten-year period. *Clin Lab*. 2020;66(8):1467–77.
77. Huang YL, Sun QL, Li JP, Hu YY, Zhou HW, Zhang R. Evaluation of an in-house maldi-tof ms rapid diagnostic method for direct identification of micro-organisms from blood cultures. *J Med Microbiol*. 2019 Jan 1;68(1):41–7.
78. Lee K, Yong D, Jeong SH, Chong Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: Increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Med J*. 2011 Nov;52(6):879–91.
79. Jeong S, Hong JS, Kim JO, Kim KH, Lee W, Bae IK, et al. Identification of acinetobacter species using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann Lab Med*. 2016 Jul 1;36(4):325–34.
80. Turton JF, Shah J, Ozongwu C, Pike R. Incidence of acinetobacter species other than *a. baumannii* among clinical isolates of acinetobacter: Evidence for emerging species. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr 1;48(4):1445–9.
81. Loonen AJM, Jansz AR, Bergland JNB, Valkenburg M, Wolffs PFG, Van Den Brule AJC. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2012 Apr;50(4):1437–9.
82. Barnini S, Ghelardi E, Brucculeri V, Morici P, Lupetti A. 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 *Clinical microbiology and vaccines*. *BMC Microbiol*. 2015 Jun 18;15(1).
83. Dai Y, Xu X, Yan X, Li D, Cao W, Tang L, et al. Evaluation of a Rapid and Simplified Protocol for Direct Identification of Microorganisms From Positive Blood Cultures by Using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 11;11.
84. Canalp HZ, Bayraktar B. Direct Rapid Identification from Positive Blood Cultures by MALDI-TOF MS: Specific Focus on Turnaround Times. 2021.

85. Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for Direct Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Rods from Positive Blood Cultures in a Three-Phase Trial. *J Clin Microbiol.* 2004 Apr;42(4):1466–70.
86. Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, Land GA, Davis JR, Musser JM, et al. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI biotyper and the BD phoenix system. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul;50(7):2452–4.
87. Romero-Gómez MP, Gómez-Gil R, Paño-Pardo JR, Mingorance J. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective. *Journal of Infection.* 2012 Dec;65(6):513–20.



## EKLER

### Ek-1. Etik Kurul Kararı



T.C. Sağlık Bakanlığı  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi  
Dışkapı Yıldırım Beyazıt  
Eğitim ve Araştırma Hastanesi



#### KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR TARİHİ:29.08.2022  
KARAR NO : 145/05

Hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Klinięinde **Uz.Dr. Mustafa AĀATAY** sorumluluğunda yapılması planlanan **Dr. Gölřah MİROğLU**' na ait "Pozitif Sinyal Veren Kan K¼lt¼r Şişelerinden MALDI TOF MS İle Direkt Tanımlama ve BD Phoenix Otomatize Sistemi İle Direkt Antibiyotik Duyarlılık Testi çalışılması" konulu tez çalışması amaç, yaklaşım ve y¼ntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

## Ek-2. Tez Konusu Onay Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 18.05.2022-129760



T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
Gülhane Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı :E-86241737-100--129760  
Konu :GTF Tez İnceleme ve Değerlendirme  
Akademi Kurul Kararları

### DAĞITIM YERLERİNE

Gülhane Tıp Fakültesi Tez İnceleme ve Değerlendirme Akademik Kurulu, 12.05.2022 tarihinde saat 14:00'da Dekan Yardımcısı Prof.Dr.Sedat YILMAZ başkanlığında üyelerin uzaktan dijital ortamda online olarak katılımı ile toplanmıştır.

Toplantıda, Dekanlığımızla afileye olan SUAM'larda görevli 95 (doksan beş) uzmanlık öğrencisine ait tez incelenerek değerlendirilmiş olup; tezlerle ilgili Ek'teki kararların alınmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim

Prof. Dr. Mehmet Ali GÜLÇELİK  
Dekan

Ek:Kurul Kararı

Dağıtım:  
Ankara Şehir Sağlık Uygulama ve Araştırma  
Merkezi Müdürlüğüne  
Ankara Atatürk Sanatoryum Sağlık Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğüne  
Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Sağlık  
Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne  
Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji  
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi  
Müdürlüğüne  
Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk  
Sağlığı ve Hastalıkları Sağlık Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğüne  
Ankara Gülhane Sağlık Uygulama ve Araştırma  
Merkezi Müdürlüğüne  
Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi  
Müdürlüğüne

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : \*BSPBS26BFB\* Pin Kodu :59752

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys>

Adres:Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Yerleşkesi Emrah Mah. 0618  
Etlik/Keçiören/ANKARA  
Telefon:0 312 304 61 73 Faks:0 312 304 61 90  
Web:<http://sbu.edu.tr>  
Kep Adresi:sbu@hs01.kep.tr

Bilgi için: Levent YILDIRIM  
Unvanı: Uzman



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

1/2

S NO	ADI SOYADI	GÖREVLİ OLDUĞU SUAM	TEZ KONUSU	SONUÇ
1	Dr. Süleyman Emre DEDE	Ankara Sağlık SUAM	Sars-CoV-2 virüsüne bağlı pnömoni ARDS (akut respiratuvar distres sendromu makrofaj aktivasyon sendromu gelişen ve standart yoğun bakım tedavisine ek olarak Anakinra tedavisi alan hastalarda klinik profilin ve laboratuvar bulguların değerlendirilmesi	Kabul edildi.
2	Dr. Aybüke Kevser ABASIYANIK	Ankara Sağlık SUAM	Epileptik gebelerde hastalık seyri ile ilaç kullanımının gebelek ve yenidoğan sonuçlarına etkisi	Kabul edildi.
3	Dr. Merve Sultan AKÇAM	Ankara Atatürk Sanatoryum SUAM	Probiyotik kullanımının uzamış sarılığa etkisi	Kabul edildi.
4	Dr. Aslan Ali KIRGIN	Ankara Atatürk Sanatoryum SUAM	Çocuk Acil polikliniğine başvuran hastaların başvuru ve izlemlerinde stres hiperigliseminin değerlendirilmesi	Kabul edildi.
5	Dr. Abdullah KILAVUZ	Ankara Atatürk Sanatoryum SUAM	Obez Çocuk ve Adölanlarda troid fonksiyon testlerinin değerlendirilmesi	Kabul edildi.
6	Dr. Merve SARIYILDIZ PEHLIVAN	Ankara Atatürk Sanatoryum SUAM	Body Roundness Index'in (vücut yuvarlak indeksi BR1) spinal anestezi duyuşal blok seviyesi üzerine etkisi	Kabul edildi.
7	Dr. Fatma BETÜL ŞAHİN	Ankara Şehir SUAM	Kategori II FHR trasesine sahip fetüslerin erken neonatal sonuçlarını incelenmesi	<b>Kabul edilmedi:</b> Başvuru usul ve esaslarına aykırı bulunduğundan başvuru reddedilmiştir.
8	Dr. Taner KARLIDAĞ	Ankara Şehir SUAM	Akut Aşil Tendon Ruptürü Tamirinde Açık ve Minimal Invasiv Cerrahi Yöntemlerinin Klinik ve Fonsiyonel Sonuçlarının Karşılaştırılması	Kabul edildi.
9	Dr. Seher KÖKÇEOĞLU	Ankara Sağlık SUAM	EWG SOP2 kriterlerine göre sınıflandırılan diyabetik yaşlı hastalarda hastalık ilişkili parametrelerin ve diyabetik tedavilerin incelenmesi	Kabul edildi.
10	Dr. Mustafa ILDEŞ	Ankara Sağlık SUAM	Kesici Delici alet yaralanması nedeniyle genel cerrahi servisine yatırılan hastalarda glukoz/potasyum oranını travma şiddeti morbitide mortalite ve operasyon gereksinimini değerlendirmede kullanılabilirliği araştırılacaktır.	Kabul edildi.
11	Dr. Orhan AHMEDOV	Ankara Sağlık SUAM	Kolorektal kanserlerde açık ve laparoskopik cerrahinin karşılaştırılması.	Kabul edildi.
12	Dr. Gülşah MIROĞLU	GTF Mik.ve Kl.Mik.AD.Bşk.İği	Pozitif sinyal veren kan kültür şişelerinden MALDI TOF MS ile direkt tanımlama ve BD phocenixotomatize sistemi ile direkt antibiyotik duyarlılık testi çalışması	Kabul edildi.
13	Dr. Necdet SALDI	GTF Aile Hek.AD.Bşk.İği	Hekimlerin defansif (çekinik) tıp hakkındaki görüşlerinin değerlendirilmesi	Kabul edildi.
14	Dr. Nuh CAN KOÇAK	Ankara Şehir SUAM	Tam manyetik yükseltmeli sol ventrikül destek cihazının in vitro dolaşımında düşük ve yüksek devirlerdeki çalışmasının hemoliz ve tromboz üzerine etkisi	<b>Kabul edilmedi:</b> Program yöneticisi/tez danışmanın hakem üye olması uygun değildir.
15	Dr. Hacer Sena BALABAN	GTF Aile Hek.AD.Bşk.İği	Kronik ağrısı olan hastalarda opioid reçete etme konusunda aile hekimlerinin bilgi tutum ve davranışları ve engelleyen durumların saptanması	Kabul edildi.
16	Dr. Osman Kaan KALKAN'	Ankara Şehir SUAM	Ankara ili Hastane acil servislerine 112 ambulaansı ile alandan nakledilen ve reddedilerek ankara şehir hastanesi acil tıp kliniğine getirilen hastaların retrospektif değerlendirilmesi	<b>Kabul edilmedi:</b> Program yöneticisi/tez danışmanın hakem üye olması uygun değildir. Hakem değerlendirme