

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

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**ÜRİNER SİSTEM ENFEKSİYONLARININ HIZLI TANISINDA
İDRAR ÖRNEĞİNİN MATRİKS ARACILI LAZER
DESORPSİYON İYONİZASYON -UÇUŞ ZAMANLI- KÜTLE
SPEKTROMETRESİ (MALDİ-TOF MS) İLE İNCELENMESİ**

DR. ÜMMÜHAN SU TOPALCA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ELİF AKTAŞ SEPETCİ

KLİNİK MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

İSTANBUL-2017

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ümmühan Su Topalca

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri ile bana her konuda yol gösteren, tezimin hazırlanması sırasında deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Elif Aktaş Sepetci'ye, eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen hocam Doç. Dr. Banu Bayraktar'a, desteklerinden dolayı idari sorumlumuz Uzm. Dr. Mehmet Emin Bulut'a, Uzm. Dr. Ayşe Barış'a, Uzm. Dr. Süleyman Pelit'e, bana mutlu bir çalışma ortamı sağlayan asistan arkadaşlarıma, tüm laboratuvar çalışanlarına, ihtisasımın ilk bir yılını geçirdiğim Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, hayatımın her döneminde sevgilerini, desteklerini hissettiğim, her zaman yanımda olan ve bir parçası olmaktan onur duyduğum aileme ve yanlarında huzur bulduğum sevgili eşime ve çocuklarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	XİV
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.Üriner Sistem Enfeksiyonları.....	2
2.1.1.Tanımlar.....	2
2.1.2.Epidemiyoloji.....	3
2.1.3.Etyoloji.....	4
2.1.3.1. Sık İzole Edilen Etkenlerin Genel Özellikleri	5
2.1.3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.3.1.2. <i>Klebsiella</i> spp.....	7
2.1.3.1.3. <i>Proteus</i> spp	7
2.1.3.1.4. <i>Enterobacter</i> spp.....	8
2.1.3.1.5. <i>Pseudomonas</i> spp.....	8
2.1.3.1.6. <i>Staphylococcus</i> spp.	8
2.1.3.1.7. <i>Enterococcus</i> spp	9
2.1.3.1.8. <i>Streptococcus</i> spp.	9
2.1.4. Patogenez	10
2.1.5. Tanı	11
2.1.5.1. Klinik tanı	11
2.1.5.2. Laboratuvar tanı.....	12
2.1.5.2.1. İdrar Örneğinin Alınması.....	12
2.1.5.2.2. Mikroorganizmaların Tanımlanması.....	21

2.1.5.2.3. Manuel Yöntemlerle Tanımlama.....	22
2.1.5.2.3.1. Otomatize Sistemlerle Tanımlama.....	23
2.1.5.2.3.2. MALDİ-TOF MS ile Tanımlama.....	26
2.1.5.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	28
2.1.5.2.4.1. Manuel yöntemlerle duyarlılığın test edilmesi.....	28
2.1.5.2.4.2. Otomatize Sistemlerle Duyarlılığın Test Edilmesi.....	29
2.5.6. Tedavi.....	30
2.2. MALDİ-TOF MS'in Direkt Klinik Örnekte Kullanımı.....	31
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1.Örneklerin İşlenmesi:.....	35
3.2. Mikroskopi.....	36
3.3. Bakteri Tanımlanması.....	37
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	41
4.BULGULAR.....	42
4.1. Yöntem Optimizasyon Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar.....	41
4.1.1. İdrar örneği miktarının sonuca etkisi.....	41
4.1.2. Çalışmada kullanılan SDS konsantrasyonunun sonuca etkisi.....	46
4.1.3. Çalışmada kullanılan deterjan etkili maddenin sonuca etkisi.....	49
4.1.4. Çalışmaya alınan öreneğe ekstraksiyon işlemi yapılmasının sonuca etkisi.....	52
4.1.5. Çalışma öncesinde idrar örneğinin inkübe edilmesinin sonuca etkisi.....	57
4.2. Optimize Yöntem Kullanılarak İdrar Örneklerinin Direkt Olarak MALDİ-TOF MS İle Test Sonuçları.....	60
TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR	73

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Üriner sistem enfeksiyonlarının bakteriyel etyolojisi.....	5
Tablo 2. <i>E.coli</i> 'nin biyokimyasal reaksiyonları.....	6
Tablo 3. İdrar örneklerinin, örnek alma metoduna göre laboratuvarda işlemlenmesi....	19
Tablo 4. İdrar örneklerinin, örnek alma metoduna göre laboratuvarda işlemlenmesi....	20
Tablo 5. Minimal testler ile izolatların raporlanması	21
Tablo 6. Mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılan otomatize sistemlere örnekler	26
Tablo 7. Gram boyalı preparattalökosit yoğunluğunun kategorize edilmesi.....	36
Tablo 8. Farklı miktarlarda idrar örneği kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları.....	42
Tablo 9. İdrar miktarlarına göre, idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması	43
Tablo 10. Farklı miktarlarda idrar örneği kullanımında MALDI-TOF MS ile tanımlanabilen mikroorganizma sayıları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkinin incelenmesi	44
Tablo 11. Farklı miktarlarda idrar örneği kullanılarak MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları.....	45
Tablo 12. MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanan mikroorganizmaların idrar miktarlarına göre dağılımı	46
Tablo 13. Farklı konsantrasyonlarda SDS kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları.....	46
Tablo 14. Farklı SDS konsantrasyonlarına göre idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile direkt mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması..	47
Tablo 15. %0.1 ve %1 SDS konsantrasyonunda MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi.....	47
Tablo 16. Farklı SDS konsantrasyonlarında MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları.....	48

Tablo 17. MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların SDS konsantrasyonlarına göre dağılımı.....	49
Tablo 18. Farklı deterjan etkili maddeler kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları.....	49
Tablo 19. %0.1 SDS ve Tween-80 kullanılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması	50
Tablo 20. Farklı deterjan etkili maddeler kullanılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmalar ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi	50
Tablo 21. Farklı deterjan etkili maddeler kullanılarak MALDI-TOF MS ile direkt mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları.....	51
Tablo 22. MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu olarak tanımlanan mikroorganizmaların Tween-80 ve %0.1'lik SDS kullanımına göre dağılımı.....	52
Tablo 23. Ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu yapılarak ve etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları.....	53
Tablo 24. Ekstraksiyon yöntemlerine göre idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması.....	54
Tablo 25. Ekstraksiyon işlemine göre MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi.....	55
Tablo 26. Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları.....	56
Tablo 27. Tanımlanan mikroorganizmaların ekstraksiyon yöntemlerine göre dağılımı.	57
Tablo 28. İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları.....	58
Tablo 29. İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanıp tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması.	58

Tablo 30. İdrar örneğinin işlem öncesi inkübe edildiği ve edilmediği durumda MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanması ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi	59
Tablo 31. İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile tanımlanma oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları.....	59
Tablo 32. Tanımlanan mikroorganizmaların idrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda dağılımı.....	60
Tablo 33. İdrar örneklerinin MALDI-TOF MS ile test edilmesi sonucu tanımlanan mikroorganizmaların kültürle karşılaştırmalı sonuçları.....	62
Tablo 34. MALDI-TOF MS ile direkt tanımlama ile idrardaki lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi.....	63
Tablo 35. Bakterilerin Gram boyama özelliklerine göre MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanma sayılarının incelenmesi.....	63
Tablo 36. MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma sonuçlarının koloni sayılarına göre dağılımı	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.Optimize yöntemin basamakları	40
---	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

Hz	hertz
Da	dalton
nm	nanometre
ÜSE	Üriner system enfeksiyonu
UTI	Urinary tract infection
MALDI-TOF MS	Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyonİyonizasyon-Uçuş Kütle Spektrometresi(Matrix- AssistedLaserDesorption Ionization-Time of Flight MassSpectrometry)
ml	mililitre
dak	dakika
HIV	<i>Human immunodeficiencyvirus</i>
mm ³	milimetre küp
µm	mikrometre
CO ₂	karbondioksit
GBS	Grup B streptokok
NaCl	Sodyum klorür
µl	mikrolitre
CFU	colony forming unit
MMİ	minimal morfolojikidentifikasyon
İD	identifikasyon
ADT	antibiyotik duyarlılık testi
KKA	koyun kanlı agar
EMB	Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar
mm	milimetre
LAP	Lösin-β-naftilamid

PYRaz

Pirolidonilarilamidaz

PYR

L-pirolidonil- β -naftilamidH₂S

Hidrojen sülfür

TSI

Triple Sugar Iron

LIA

Lysine Iron Agar

SDS

Sodium dodecyl sulfate



ÖZET

Su Topalca Ü. Üriner Sistem Enfeksiyonlarının Hızlı Tanısında İdrar Örneğinin Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon –Uçuş Zamanlı- Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile incelenmesi.T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı.Tıpta UzmanlıkTezi. İstanbul. 2017.

Üriner system enfeksiyonlarının (ÜSE), önemli oranda morbidite, mortalite ve maliyet ile ilişkili olduğu gözönüne alındığında, laboratuvar tarafından hızlı ve anlamlı sonuçların elde edilmesi, uygun tedaviye erken başlanması ve gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi için kritik önem taşımaktadır. ÜSE tanısında altın standart olan kültür sonuçlarının raporlanması iki-üç gün sürmektedir. Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon –Uçuş Zamanlı –Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) mikroorganizmaların kendilerine özgü proteomik parmak izi pik kalıplarına dayanarak tanımlama yapmakta ve dakikalar içinde sonuç vermektedir. Bu çalışmada amaç, üriner sistem enfeksiyonlarının hızlı tanısı için MALDI-TOF MS ile direkt idrar örneğinden etken mikroorganizmanın saptanmasını sağlayacak bir yöntem optimize etmek ve optimize edilen yöntemin idrar örneklerinde Gram boyama ile birlikte kullanımının etkinliğini değerlendirmektir. Ayrıca, idrar örneğindeki lökosit yoğunluğu ve bakteri sayısının MALDI-TOF MS ile tanımlamaya etkisi değerlendirilecektir.

Bu çalışmada, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına Nisan 2016-Aralık 2016 tarihleri arasında rutin kültür için gönderilen 600 idrar örneği prospektif olarak incelenmiştir. Çalışma, iki aşamalı olarak tasarlanmıştır. Birinci aşamada kültürde $\geq 10^5$ CFU/ml saf üreme gözlenen ve +4°C’de saklanmış olan 500 idrar örneği kullanılmış ve literatürde tanımlanmış yöntemlerden yola çıkılarak MALDI-TOF MS ile direkt idrar örneğinden etken mikroorganizmanın saptanması için bir yöntem optimizasyon çalışması yapılmıştır. Yöntem optimizasyonu için 3 ml idrar örneğinin çeşitli santrifüj basamakları ve %0.1 sodyum dodezil sülfat (SDS) ile muamelesi sonrası ekstraksiyon yapılmadan MALDI-TOF MS ile test edilmesi prensibine dayanan bir protokol esas alınmıştır. Bu aşamada, kullanılan idrar miktarı (1.5, 3 ve 5 ml), SDS konsantrasyonu (%0.1 ve %1), deterjan etkili madde (SDS ve Tween-80), MALDI-TOF MS ile değerlendirme öncesi ekstraksiyon işlemi (ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu ve etanol-formik asit ekstraksiyonu ile) ve çalışma öncesinde idrar örneğinin inkübe edilmesinin sonuca etkisi araştırılmıştır. İkinci aşamada Gram boyama sonucunda tek morfolojide

mikroorganizma görülen 100 idrar örneği kullanılmış ve idrar örnekleri kültürle eş zamanlı olarak ilk basamakta optimize edilen yöntem kullanılarak MALDI-TOF MS ile test edilmiştir. Ayrıca, çalışmanın her bir basamağındaki değişkenler için, MALDI-TOF MS kullanılarak kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanması ile lökosit yoğunluğu ve koloni sayısı arasındaki ilişkiler incelenmiştir.

Birinci aşama sonucunda; MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının 3 ml ve 5 ml idrar örneği ile benzer ve 1.5 ml'den daha iyi, %0.1 ve %1 SDS konsantrasyonları ile benzer, SDS ve Tween-80 için benzer, formik asit ve etanol formik asit ekstraksiyonu ile ekstraksiyon yapılmadığı durumdan daha iyi, örneğin direkt işleme alınması ile inkübasyon sonrası işleme alınması durumunda benzer olduğu görülmüştür. Üç ml idrar ve %0.1 SDS kullanılarak, örneğin inkübasyonu yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu ile gerçekleştirilen ikinci aşamada Gram boyama ile tek tip morfolojide mikroorganizma görülen idrar örneklerinin %75'i MALDI-TOF MS ile direkt olarak tanımlanmıştır. 1.5 ml idrar örneği kullanıldığında lökosit yoğunluğu azaldıkça, mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile tanımlanma oranının arttığı, bunun dışında çalışmanın tüm basamaklarında test edilen bütün değişkenler için bol, orta, az ve nadir lökosit içeren örneklerde, tanımlanma oranlarının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın tüm basamaklarında test edilen bütün değişkenler için idrar örneklerinde, koloni sayısı arttıkça mikroorganizmaların tanımlanma oranının da arttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; direkt idrar örneğinde Gram boyama ve MALDI-TOF-MS'in birlikte kullanımıyla kültürde $\geq 10^5$ CFU/ml üreme olan örneklerin %75'inden fazlasında örneğin laboratuvara ulaşmasından sonraki iki saat içerisinde etken bakteri tanımlaması yapmak mümkün olmuştur. MALDI-TOF-MS'in direkt idrar örneğinden mikroorganizma tanımlanması için kullanımı ÜSE tanısına yeni bir perspektif kazandıracaktır.

Anahtar Kelimeler : ÜSE, idrar, Gram boyama, MALDI-TOF-MS

ABSTRACT

Su Topalca Ü.Examination of urine samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-(Time of Flight)-Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in the Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infections.T.C. SağlıkBilimleriUniversity Sisli HamidiyeEtfal Training and Research Hospital Clinical Microbiology Laboratory.Thesis for specialization in medicine. Istanbul. 2017.

Considering that urinary tract infections (UTIs) are associated with significant morbidity, mortality and cost, it is critical to obtain rapid and meaningful laboratory results to perform early diagnosis of these infections, to initiate the appropriate treatment at earlier stages and to avoid unnecessary antibiotic use, It takes two to three days to report the culture results, which is the gold standard for diagnosis of UTI. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight –Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is based on the unique proteomic fingerprint patterns of microorganisms and gives results within minutes. The aim of this study is to optimize a method to determine the microorganism from direct urine sample with MALDI-TOF MS for the rapid diagnosis of UTI and to evaluate the effectiveness of the optimized method in combination with Gram staining in urine samples. In addition, the leukocyte density and number of bacteria in the urine sample will be evaluated for its effect on the identification by MALDI-TOF MS.

In this study, 600 urinesamples, submitted to T.C. Sağlık Bilimleri University Sisli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital Clinical Microbiology Laboratory for routine culture between April 2016 and December 2016, were analyzed prospectively.The study is designed in two stages. In the first stage, 500 urine samples, that had pure growth of $\geq 10^5$ CFU / ml microorganisms in culture and stored at + 4°C, were used and a method optimization study was conducted by the methods described in the literature to identify the microorganism from the urine sample with MALDI-TOF MS. For the method optimization, a protocol was employed that is based on the principle of testing 3 ml of urine sample with MALDI-TOF MS, without any extraction procedure, after various centrifugation steps and treatment with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). At this stage, the effect of the amount of urine used (1.5, 3 and 5 ml), the concentration of SDS (0.1 and 1%), the detergent active substance (SDS and Tween-80), the extraction before the evaluation with MALDI-TOF MS (without extraction, with formic acid extraction and ethanol-formic acid extraction) and the incubation of the urine sample before testing was investigated. In these condstage, 100 urines samples, having a single morphologic

microorganism by Gram staining, were tested with MALDI-TOF MS using the optimized method in the first stage simultaneously with culture. In addition, for the variables in every step of the study, the relationship between culture-compatible detection of microorganisms by MALDI-TOF MS and the leukocyte density and the number of colonies was investigated.

The results of the first stage indicated that the identification rates of microorganisms by MALDI-TOF MS were similar for 3 ml and 5 ml urine sample while better than 1.5 ml urine sample, were similar for 0.1% and 1% SDS concentrations, were similar for SDS and Tween-80, were better for formic acid and ethanol formic acid extraction than absence of any extractions, were same for the direct testing of the sample and post-incubation testing. In the second stage, using 3 ml of urine and 0.1% SDS, without incubation of the sample and with formic acid extraction, 75% of the samples with a single type of morphologic microorganism by Gram staining were identified by MALDI-TOF MS. When 1.5 ml of the urine sample was used, it was observed that the identification rate of microorganisms by MALDI-TOF MS increased as the leukocyte density decreased. Apart from that, the identification rates were close to each other in samples containing abundant, moderate, low and rare leukocytes for all variables tested in all steps of the study. For all the variables tested in all steps of the study, the identification rate of microorganisms increased as the number of colonies in the urine sample increased.

In conclusion, by using Gram staining and MALDI-TOF-MS in combination in direct urine sample, it is possible to identify the microorganism in more than 75% of the samples with a growth of $\geq 10^5$ CFU/ml in culture within two hours after the sample reaches the laboratory. The use of MALDI-TOF-MS for the identification of microorganisms in the direct urine sample will gain a new perspective on the diagnosis of UTI.

Keywords: UTI, urine, Gram staining, MALDI-TOF-MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE); hem ayaktan takip edilen hem de yatan hastalarda en sık karşılaşılan enfeksiyonların başında gelmektedir. Bu tür enfeksiyonlar, bebeklikten yaşlılığa değin altta yatan hastalığı olan, immunsupresif hasta grubunda ve immunkompetan popülasyonda oldukça önemlidir (1).

Üriner sistem enfeksiyonları akut nonkomplike sistitten sepsise kadar uzanabilen geniş bir klinik spektruma sahiptir. Üriner sistem enfeksiyonlarının önemli oranda morbidite, mortalite ve maliyet ile ilişkili olduğu göz önüne alındığında, laboratuvar tarafından hızlı ve anlamlı sonuçların elde edilmesi, bu enfeksiyonların tanısı ile uygun tedaviye erken başlanması ve gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi açısından kritik önem taşımaktadır (2).

Üriner system enfeksiyonlarının tanısında altın standart yöntem, kültür ile etken mikroorganizmanın üretilmesidir. Ancak, kültür sonuçlarının raporlanması 2-3 gün sürebilmektedir. İdrar örneğinde bakteri sayısı fazla olduğunda Gram boyama oldukça faydalıdır. Bununla birlikte bu yöntem ile sadece bakteri morfolojisiyle ilgili bilgi alınabilmektedir ve tanımlama için yeterli değildir (3).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında son yıllarda kullanılmaya başlanan hızlı bir otomatize identifikasyon sistemi olan Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı- Kütle Spektrometresi (MALDİ-TOF MS), mikroorganizmaların kendilerine özgü proteomik parmak izi pik kalıplarına dayanarak tanımlama yapmaktadır. MALDİ-TOF MS ile kültürde üremiş olan mikroorganizmanın tek bir kolonisi kullanılarak dakikalar içinde sonuç alınabilmektedir (4). Bununla birlikte yapılan çalışmalar, yöntemin klinik örnekten etkeni direkt olarak saptama potansiyelinin de olduğunu göstermektedir. Ancak MALDİ-TOF-MS'in direkt klinik örnekte kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda duyarlılık oranları %50-%90 arasında değişmektedir (5-12).

Bu çalışmada amaç, üriner sistem enfeksiyonlarının hızlı tanısı için MALDİ-TOF-MS ile direkt idrar örneğinden etken mikroorganizmanın saptanmasını sağlayacak bir yöntem optimize etmek ve elde edilecek nihai yöntemin idrar örneklerinde Gram boyama ile birlikte kullanımının etkinliğini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Pyüri ve klinik semptomlar varlığıyla birlikte böbrek, toplayıcı sistem ve/veya mesanede bakteri bulunması üriner sistem enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır (13). Üriner sistem enfeksiyonları, sadece alt üriner sistemin veya hem alt hem de üst üriner sistemin her ikisinin de birlikte enfekte olmasıyla gelişebilmektedir (14).

2.1.1. Tanımlar

Bakteriüri: İdrarda bakteri bulunmasıdır. İdrarda anlamlı bakteriüri; mililitrede 100.000 bakteri bulunmasını ifade eder (14).

Asemptomatik bakteriüri: Hastada üriner sistem enfeksiyonuna dair herhangi bir semptombulunmadığı durumda idrarda anlamlı bakteri saptanması, asemptomatik bakteriüri olarak adlandırılır (14).

Sistit: Hastada dizüri, sık idrara çıkma, idrara sıkışma hissi, sıklıkla suprapubik hassasiyetin de eşlik ettiği sendromdur. Bakteriyel enfeksiyonun eşlik etmediği alt üriner sistem inflamasyonlarında ve üretritlerde de bu semptomlar görülebilir(14).

Piyelonefrit: Hastada ateş, yan ağrısı, kostovertebral açı hassasiyeti, dizüri, sık idrara çıkma gibi semptomların görüldüğü klinik sendrom olarak tanımlanır. Akut pyelonefrit tanısı, bu belirtiler ile birlikte anlamlı bakteriürinin ve akut enfeksiyonun olduğunun gösterilmesiyle konulur (14).

Komplike olmayanüriner sistem enfeksiyonu: Yapısal ya da nörolojik olarak normal olan üriner sistemde gelişen enfeksiyonu ifade eder (14).

Komplike üriner sistem enfeksiyonu: Taş ve kateter gibi fonksiyonel ya da yapısal olarak anormal idrar yolu varlığında oluşan enfeksiyonu ifade eder. Genel olarak erkekler, hamile kadınlar, çocuklar, hastane kaynaklı ve sağlık bakımı ilişkili ÜSE, komplike olarak kabul edilmektedir. Komplike üriner sistem enfeksiyonu etkenleri, komplike olmayanlara göre antimikrobiyal ilaçlara daha dirençlidir. Bazı araştırmacılar, üst üriner sistem enfeksiyonlarının hepsini komplike olarak kabul etmeyi önermektedirler (14).

Ürosepsis: Genel olarak üriner sistem enfeksiyonunun yol açtığı sepsisi tarif eder. Aşağıdaki klinik bulgulardan iki ya da daha fazlasının üriner sistem enfeksiyonuna eşlik etmesini kapsar.

- Vücut ısısı $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$;
- Kalp hızı > 90 atım/dak;
- Solunum sayısı $> 20/\text{dak}$ veya $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$;
- Beyaz küre sayımı $>12,000/\text{mm}^3$, $<4,000/\text{mm}^3$, veya $>10\%$ band formu bulunması (14).

2.1.2. Epidemiyoloji

Üriner sistem enfeksiyonları yılda 150 milyon insanı etkileyen, gerek hastane ortamında gerekse de hastane dışında tüm yaş gruplarında görülebilen hekimlerin en sık karşılaştıkları önemli bakteriyel enfeksiyonlardır (13). Hayatın ilk bir yılında ÜSE, erkek çocuklarda %2.7, kız çocuklarda %0.7 görülmekle beraber bu oran bir yıldan sonra erkek çocuklarda %1 ve kız çocuklarda %3-8 olarak karşımıza çıkmaktadır (15).

Üriner sistem enfeksiyonları kadınlarda, erkeklere oranla daha sık oluşmakta ve cinsel aktif olarak nitelenen 20-40 yaşları arasında diğer yaşlara oranla daha sık görülmektedir. Yapılan araştırmalar, her üç kadından birinin 24 yaşına kadar ve tüm kadınların yaklaşık yarısının hayatları boyunca en az bir defa ÜSE geçirdiğini göstermektedir (16, 17). Herhangi bir üriner sistem anomalisi olmayan sağlıklı kadınlarda gelişen akut sistitlerin %27-44'ü kadarı nüks etmektedir. (18). Bununla birlikte kadınların sadece %0.3'ünde pyelonefrit görülmektedir (17).

Aseptomatik bakteriüri sıklığı gebe ve gebe olmayan kadınlarda benzer olmasına rağmen ÜSE insidansı gebede daha fazladır. Üriner sistem enfeksiyonu gebelikte görülen en sık bakteriyel enfeksiyondur. Enfeksiyona gebeliğin ikinci yarısında daha fazla rastlanmakta ve buna neden olarak da genişleyen uterusun baskısının artması gösterilmektedir (19).

Aseptomatik bakteriüri 50 yaş altı erkeklerde nadiren görülmekle birlikte 65 yaş üzeri erkeklerde %10 oranındadır. Erkeklerde yaşla beraber giderek artan prostat hastalıklarına bağlı olarak ÜSE oranı da artış göstermektedir (16, 17).

Hastanede yatan hastalarda bakteriüri sıklığı, artmış üriner enstrümantasyonuna bağlı olarak daha yüksektir. Ayaktan tedavi edilen hastalarda tek bir kateterizasyon %1 oranında ÜSE riski taşımaktayken, yatan hastalarda bu risk %10 ve üzerine çıkabilmektedir (18).

Renal transplant yapılmış hastalarının %40'ında bakteriyemi görülmekte ve yarısından fazlasındaerken postoperatif dönemde ÜSE gelişmektedir.Bunun yanında, CD4 sayısı

200 mm³ değerinin altına dūřen HIV ile enfekte erkeklerde, ÜSE sıklığının arttığı ve daha ağır bir klinik tablo ile karşılaşıldığı gözlenmiştir (20).

2.1.3. Etiyoloji

Üriner sistem enfeksiyonlarının %95'ten fazlasında etken tek bir bakteridir. *Escherichia coli*, akut üriner sistem enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan etkendir. Obstrüktif üropati, konjenital anomaliler, nörojenik mesane gibi yapısal anomaliler, tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmakta ve *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* cinslerinin de görölme sıklığını arttırmaktadır. Bununla birlikte, bu tür anomaliler varlığında idrarda birden fazla mikroorganizma bulunma ihtimali de artmaktadır. Ayrıca bu hastalarda tekrarlanan kateterizasyon ve antibiyoterapi nedeniyle dirençli izolatlar da ortaya çıkabilmektedir (21).

Koagölaz negatif stafilokoklardan özellikle *Staphylococcus saprophyticus*, cinsel aktif genç kadınlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Bu bakterinin, akut sistit ataklarının %5-15'inden sorumlu olduğu belirtilmektedir (14).

Diyabet hastalarında, *E. coli* ile birlikte *Klebsiella*, *Enterococcus* ve Grup B streptokoklar da ÜSE gelişiminde etken olmaktadır. Özellikle *Klebsiella* ve Grup B streptokoklarla oluşan ÜSE'nin diyabeti olan hastalarda olmayanlara göre 2-3 kat daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (22).

Üriner sistem enfeksiyonları için etyolojik ajanlar, enfeksiyonun toplum kökenli veya hastaneden edinilmiş olmasına göre de farklılık göstermektedir. Toplum kökenli enfeksiyonlarda genellikle *E. coli* etken olarak karşımıza çıkarken, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* türleri daha çok hastane kaynaklı enfeksiyonlarda izole edilmektedir. Ayrıca nadir olmakla birlikte *Corynebacterium urealyticum*'da hastane kaynaklı ÜSE tablosuna neden olabilmektedir. Bu bakteri, immün sistemi baskılanmış hastalarda, özellikle böbrek nakli alıcılarında etken olabilmekte ve pek çok antibiyotiğe dirençli olarak saptanmaktadır (14).

Candida türleri de antibiyotik tedavisi altındaki kateterize hastalarda enfeksiyon etkeni olabilmektedir (13, 14).

Virusler ÜSE etkeni olarak daha az sıklıkta karşımıza çıkmakla beraber, adenovirusler, çocuk hasta grubunda, genellikle erkek çocuk hastalarda ve allojenik kemik iliği alıcılarında hemorajik sistite neden olmaktadır (14). Üriner sistem enfeksiyonlarının bakteriyel etyolojisi ve oranları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Üriner sistem enfeksiyonlarının bakteriyel etyolojisi.

Etken	Komplike olmayan ÜSE (%)	Komplike ÜSE (%)
Gram negatif		
<i>Escherichia coli</i>	70-95	21-54
<i>Klebsiella spp.</i>	1-2	1-10
<i>Proteus mirabilis</i>	1-2	2-17
<i>Citrobacter spp.</i>	<1	5
<i>Enterobacter spp.</i>	<1	2-10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<1	2-19
Diğer	<1	6-20
Gram pozitif		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5-20 veya üzerinde	1-4
<i>Enterococcus spp.</i>	1-2	1-23
Grup B streptokok	<1	1-4
<i>Staphylococcus aureus</i>	<1	1-2
Diğer	<1	2

17 numaralı kaynaktan değiştirilerek kullanılmıştır.

2.1.3.1. Sık İzole Edilen Etkenlerin Genel Özellikleri

2.1.3.1.1. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesi içinde sınıflandırılan *Escherichia coli*, gram negatif enterik basildir. İnsanda alt gastrointestinal sistemde flora bakterisi olarak bulunmakta ve doğumu takip eden saatler içinde kolon mikrobiyasında baskın hale gelmektedir (23).

Boyu 2-4 µm, eni 1-1.5 µm olup bakteriyolojik boyalarla iyi boyanmaktadırlar. Kültürlerden hazırlanan Gram boyalı preparatların bir kısmında küçük, kısa; bir kısmında da normalden uzun morfolojide gözlenmesi, inkübasyon süresi, atmosferik ortam gibi koşullara bağlıdır. Genellikle hareketli olmakla birlikte hareketi yavaştır. *E. coli* fakültatif anaerob bir bakteri olup, optimal üreme ısı 37°C'dir ancak, 20-44°C'de

de üreyebilmektedir. Buyyonda homojen bulanıklık oluşturur. Katı besiyerinde, yuvarlak, düzgün, 1-2 mm çapında, S tipi koloniler yapar. Kanlı agarda bazı suşları beta hemoliz oluşturabilirken MacConkey agarda etrafında safra tuzlarının oluşturduğu pembe alanlarla çevrili laktoz pozitif koloniler meydana getirir. Bunun yanında en karakteristik özelliklerinden biri çoğu suşun EMB agarda metalik röfle oluşturan, yeşil-siyah koloniler oluşturmalarıdır (24, 25). *E. coli*'nin biyokimyasal reaksiyonları, Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. *E.coli*'nin biyokimyasal reaksiyonları

Sitrat testi	Glukozu fermente edebilme	Metil red Testi	Voges-Proskauer testi	İndol üretimi	Üre hidrolizi	Hidrojen sülfid oluşumu
Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif

Antijenik yapısı :*E. coli*'nin serotiplendirilmesi O (somatik), H (flagellar), K (kapsüler) ve F (fimbrial) antijen olmak üzere dört temel yüzey antijenine göre yapılmaktadır. Serotiplendirme özellikle epidemiyolojik çalışmalarda önemlidir. Serotiplendirmede özellikle O ve H antiserumları kullanılmaktadır (23, 26, 27).

Virulans Faktörleri:

K1 kapsülü: *E. coli*'nin kapsülü N-asetilnöraminik asit polimeri olan polisialik asit yapısındadır. İn vitro ortamlarda nötrofillerin ve normal insan serumunun öldürücü etkisine karşı bakteriyi korumaktadır. Ayrıca beyin omurilik sıvısında ve kanda bakterinin canlı kalmasına yardımcı olur.

Tip I (Mannoz sensitif) fimbria:Eritrositleri aglutine etme özelliğine sahip olup bu fimbrialar ortamda mannoz bulunması ile inhibe olur. Bu nedenle bu tip fimbriaya "mannoza duyarlı" fimbria adı verilmektedir. Ökaryotik hücrelere tutunmayı sağlar. Çoğu *E. coli* suşunda bulunduğu için ortak pili olarak da bilinmektedir.

Tip II (Mannoz resistant) fimbria: Değişik yapıdaki adezinler ve kolonizasyon faktörleri bu grupta yer almaktadır:

-S fimbria: Bakteriyemi yapan *E. coli* suşlarında bulunmaktadır.

-P fimbria: Üropatojen *E. coli* suşlarında bulunmaktadır.

-X faktör: Üropatojenitede etkili faktörlerdir (26).

Üriner sistem enfeksiyonuna neden olan *E. coli* suşlarına, genel olarak üropatojen *E. coli* adı verilmektedir. Bir suşun üropatojen olabilmesi için bazı virulans faktörlerini bulundurması gereklidir. Kolonda lokalize *E. coli* suşlarından O1, O2, O4, O6, O7 ve O75 serogruplarına ait olanlar sıklıkla ÜSE oluşturur. Bu suşlar enfeksiyon oluşturabilmek için idrar akımına karşı üriner sistem epitel hücrelerine tutunabilmeli ve burada kolonize olabilmelidir. Üropatojen *E. coli* suşlarında adheranstan sorumlu özgül fimbrialar bulunur. Sadece üropatojen suşlarda bulunan P fimbria; eritrosit, mesane epiteli ve muskuler tabakaya tutunmayı sağlar ve genellikle pyelonefrit yapan suşlarda bulunur. P fimbria içermeyen üropatojen suşlarda ise adezyon; mannoza dirençli adezinlerden AFAI ve AFAII olarak adlandırılan afimbrial adezinler, Dr kan grubuna antijenlerine bağlanan Dr adezinler ve S pili ile mannoza sensitive adezinlerden Tip 1 pili tarafından gerçekleştirilmektedir. Üropatojen suşlarda diğer bir virulans faktörü de hemolizindir. Hemolizin ekstraselüler bir sitolitik toksin olup eritrosit yıkımına, böbrek hücrelerinde sitokin ve süperoksit üretimine neden olarak enflamatuvar cevap ve doku hasarı meydana getirir. Bir diğer önemli virülans faktörü siderofordur. Bakteriyel sideroforlar genel olarak aerobaktin olarak adlandırılır ve özellikle aerobaktin sahibi suşlar düşük demir yoğunluğunda dahi üreyebilmektedir (23-25, 27).

2.1.3.1.2. *Klebsiella* spp

Klebsiella türleri gram negatif, hareketsiz basillerdir. Fakültatif anaerop olup optimal üreme ısıları 37°C'dir. *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyelerine göre morfolojik olarak daha kısa ve kalın basillerdir. Bakteri çevresindeki yoğun polisakkarit kapsül nedeniyle genellikle kültürlerde mukoid koloniler oluşturular. *Klebsiella* türlerinde 80'ne yakın farklı kapsül antijeni (K antijeni) bulunmaktadır. Bu bakteriler McConkey agarda pembe, EMB agarda ise morumsu, mukoid koloniler oluşturmaktadır. Voges-Proskauer ve sitrat testi pozitif olup TSI besiyerinde H₂S oluşumu gözlenmemektedir. Klinik örneklerden en sık izole edilen türler *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* olup bu iki türün ayırımında indol testi kullanılmaktadır. *K. pneumoniae* triptofandan indol oluşturmazken, *K. oxytoca* indol oluşturur. *Klebsiella* türleri pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, menenjit, sepsis gibi klinik tablolara yol açmaktadır (28, 29).

2.1.3.1.3. *Proteus* spp

Proteus türleri, gram negatif hareketli basiller olup doğada yaygındırlar ve insanda normal intestinal flora elemanı olarak da bulunurlar. Biyokimyasal ayırım testlerinden

metil kırmızısı testi pozitif, Voges-Prouskauer reaksiyonu negatiftir. *P. mirabilis* dışındaki üyelerin tümü indol pozitifdir. Kültürlerde halkalar oluşturarak yayılım gösterirler ve karakteristik kokuya sahiptirler. *P. mirabilis* başta olmak üzere *Proteus* türleri, komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarının nedenlerindendir. Bu enfeksiyonların yaklaşık olarak %10'undan etken olarak izole edilmektedirler. Aynı zamanda böbrek taşı oluşumuna neden olarak üst üriner sistemi de etkilerler (30).

2.1.3.1.4. *Enterobacter* spp

Enterobacter türleri, gram negatif, hareketli ve fakültatif anaerob basillerdir. Karbonhidratları gaz oluşturarak parçalarlar. Biyokimyasal ayırım testlerinden metil kırmızısı testi negatif, Voges Proskauer ve sitrat testleri pozitif olup, triptofandan indol ve TSI besiyerinde H₂S oluşturmazlar. EMB ve McConkey agarda morumsu koloniler oluşturmaktadır.

Enterobacter cinsi içinde klinik örneklerden en sık izole edilenler; *E. cloacae*, *E. aerogenes* ve *E. sakazakii* 'dir. *Enterobacter* türleriyle enfeksiyon, endojen kaynaklı olabileceği gibi eksojen kaynaklı da olarak da gelişebilir. Üriner sistem enfeksiyonun yanı sıra alt solunum yolu, deri ve yumuşak doku, kemik ve eklem enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit, endokardit ve intraabdominal enfeksiyonlara da neden olabilmektedirler (29, 30).

2.1.3.1.5. *Pseudomonas* spp

*Pseudomonas*lar, gram negatif, oksidaz pozitif, hareketli, aerobik basillerdir. Karbonhidratları fermente etmezler ve indol ve H₂S negatiftirler. En önemli fırsatçı patojenler arasında bulunan *Pseudomonas*, sağlıklı insanda da kolonize olabilmektedir. Çoğu suşta ekstraselüler bir protein olan alginat bulunur. Alginat sentezinin fazla miktarda olması mukoid koloni (M koloni) tipi oluşumunun yanı sıra biyofilm oluşumu için de önemlidir. Mukoid olmayan suşlar, R koloni veya β-hemolizli S koloni şeklinde görülmektedirler. Kültürlerde "piyosiyenin" pigmenti üretmesi en önemli özelliklerinden biridir. Mukoid koloni oluşturan suşlar özellikle üriner katetere bağlı kronik enfeksiyonlardan sorumludur. *P. aeruginosa*'ya bağlı üriner sistem enfeksiyonları özellikle uzun süreli üriner kateter kullanımı veya cerrahi girişime bağlı olarak hastanede yatan hastalarda görülür (31, 32).

2.1.3.1.6. *Staphylococcus* spp.

Stafilokoklar katalaz pozitif, hareketsiz, sporsuz, 0.5-1,5 µm çapında gram pozitif koklardır. Aerop ya da fakültatif anaerop ortamlarda 37°C'de kolayca ürerler. Gram

boyamada tekli, ikili, dörtlü ve genellikle zm salkımına benzer yapıda morfolojide görülebilen bu bakteriler, %10'luk tuz konsantrasyonlarında üreyebilirler. Deri, orofarenks, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistem florasında bulunurlar. Klinik öneme sahip türler içerisinde en önemlisi *S. aureus* olup, koagülaz negatif stafilokoklar olarak adlandırılan *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* ve *S. lugdunensis* gibi stafilokoklar da enfeksiyon etkeni olabilmektedir. Üriner sistem enfeksiyonları açısından özellikle önemli olan *S. saprophyticus*, cinsel aktif genç kadınlarda daha sıklıkla olmak üzere toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur. *S. saprophyticus* novobiyosine dirençli olmasıyla diğerklinik önemi olan türlerden ayrılır. Hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarında ise etken genellikle *S. epidermidis* 'dir (33, 34).

2.1.3.1.7. Enterococcus spp

Enterokoklar; tekli, ikili veya kısa zincirler halinde bulunan katalaz negatif, fakültatif anaerop gram pozitif koklardır. İnsanlarda gastrointestinal sistem florasının bir üyesidir. Klinik örneklerden izole edilen türlerin %80-90'ını *E. faecalis*, %5-10'nu ise *E. faecium* oluşturmaktadır. L- pirolidonil β -naftilamid(PYR) testi pozitif olup, %6.5 NaCl ve %40 safra tuzu varlığında canlılıklarını koruyabilir ve eskülini hidrolize ederler. Enterokok enfeksiyonlarının büyük bir bölümü endojen kaynaklıdır ve gastrointestinal sistemden köken alır. Enterokokların en sık neden oldukları enfeksiyon hastalığı üriner sistem enfeksiyonlarıdır. Ayrıca, endokardit nedeni de olabilirler (35, 36).

2.1.3.1.8. Streptococcus spp.

Streptococcus cinsi bakteriler gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerop bakterilerdir. Sıvı besiyerinde zincirler oluşturma eğilimindedirler. Bazı viridans streptokoklar ve *S. pneumoniae* reme için %5 CO₂ ihtiyaı duyarlar ve diğertrlerin de oğub u ortamlarda daha iyi ürerler. Streptokoklar arasındaki tür ve grup farklılıklarının nedeni; çeşitli karbonhidratlar, hücre duvarına tutunan yüzey protein antijenleri ve teikoik asit gibi yapıların çeşitliliğinden kaynaklanır. *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. disgalactiae*, *S. equi* ve *S. canis* kanlı besiyerinde beta hemoliz yaparlar ve piyojenik streptokoklar olarak adlandırılırlar. Beta hemolitik streptokoklar içerdikleri Lancefield antijenlerine göre gruplara ayrılırlar. Pyojenik olmayan streptokoklar içinde; α -hemolitik ve nonhemolitiklerle birlikte viridans streptokoklardan β -hemolitikler yer alır.

S. pneumoniae α -hemoliz yapmakla birlikte diğer alfa hemolitiklerden optokin duyarlılığı ve safrada erimesiyle ayrılır (37).

Grup B Streptokoklar β -hemoliz yapmaktadırlar. Fetal komplikasyonlara yol açabilmesi nedeniyle gebelerde bakterinin kolonizasyonunun saptanması önemlidir (37). Gebede idrardan izole edilen Group B streptokokların, erken membran rüptürü, prematüre doğum ve geç başlangıçlı neonatal sepsisle birlikteliği bildirilmiştir. Gebeliğin 35-37. haftalarında GBS taraması önerilmektedir. Bu bakterinin neden olduğu bakteriüri, önceki ya da mevcut gebelik için söz konusu ise intrapartum profilaksi uygulaması gerekliliği oluşur(38).

2.1.4. Patogenez

Bakteriler, üriner sisteme üç yolla ulaşmaktadır.

1. Asendan yol: Üriner sistem enfeksiyonunun ortaya çıkmasına neden olan en yaygın (%90-95) yoldur. *Enterobacteriaceae* üyeleri, özellikle de *E. coli* asendan yolla üriner sisteme ulaşırlar. Bu durum kadınlarda, sonda ve kateter uygulananlarda daha sık görülmektedir (39).

Üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizmaların periüretral alan ve vajina ağzında kolonize olduğu gösterilmiştir. Kadınlarda erkeklere göre üriner sistem enfeksiyonlarının daha fazla görülmesi asendan yolun önemini ortaya koymaktadır. Kadın üretrası daha kısadır, vulvar ve perianal bölgelere yakındır. Dolayısıyla üretra masajı ve seksüel aktivite sonucunda bakterilerin mesaneye girmesi kolaylaşmaktadır. Bakteri mesaneye girdikten sonra orada çoğalmaya başlayarak üreterlere geçmekte ve özellikle vezikoüreteralreflü varlığında, renal pelvis ve parankime de ulaşmaktadır. Gebelik de üriner enfeksiyon riskini artırmaktadır. Postmenapozal dönemdeki kadınların ise %20'den fazlasında endojen flora ile üriner sistem enfeksiyonu gelişmektedir. Ayrıca, postmenapozal dönemde östrojenin azalması nedeni ile tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu oluşma olasılığı artar. Vajinal pH'nın değişmesi ile laktobasil miktarı da azalır ve patojen mikroorganizmalar laktobasillerin yerini alır. Erkeklerde üretranın daha uzun olması ve prostat salgılarının koruyucu antibakteriyel etkileriyle efektif bariyer olarak rol oynamaları, bu yolla enfeksiyon gelişim riskini azaltmaktadır (20, 40).

Genç erkeklerde nadiren üriner sistem enfeksiyonu gelişir. Homoseksüel aktivite, vajen mukozası patojenik mikroorganizmalar ile kolonize partner ile cinsel ilişki gibi

durumlarda risk artmaktadır. Elli yaşın üstündeki erkeklerde prostat hastalıkları ile korele olarak enfeksiyon riskinde de artış görölmektedir (41).

Konakla ilgili koruyucu faktörlerin bozulması ile enfeksiyona yatkınlık artmaktadır. Özellikle nörojenik hastalıklar, üriner obstrüksiyon ve retansiyon gibi durumlarda mesane tamamiyla boşalamadığı için mesanede mikroorganizmalar çoğalır ve mukozayı invaze eder. Vesikoüretral reflü ve valf anomalileri de koruyucu bariyeri azalttığı için enfeksiyonun yayılımını kolaylaştırmaktadır (41).

2. Hematojen yol: Birkaç etken dışında bu yolla üriner sistem enfeksiyonu gelişimi nadirdir. Özellikle yenidoğan ve bebeklerde mikroorganizma, böbreğe bu yolla ulaşmaktadır. *S. aureus*, *Candida* spp, *Salmonella* spp ve *Mycobacterium tuberculosis* vücudun başka bir yerinde enfeksiyon oluşturduktan sonra sekonder olarak üriner sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. Örneğin, *S. aureus* bakteriyemisi veya endokarditi olan hastalarda böbrek sıklıkla etkilenmektedir (40).

3. Lenfatik yol: Bu yolla üriner sistem enfeksiyonu gelişimi tam açıklanmış değildir. Hayvanlarda üreter ve böbreklerin arasında lenfatik bağlantıların olduğu, mesanede artan basıncın böbreklere doğru lenfatik akıma neden olabileceği gösterilmiştir (40).

2.1.5. Tanı

2.1.5.1. Klinik tanı

Üriner sistem enfeksiyonlarında semptomlar, hastanın cinsiyetine, enfeksiyonun lokalizasyonuna ve komplike olup olmasına göre değişiklik göstermektedir. kadınlarda akut komplike olmayan sistit, dizüri, pollaküri, suprapubik hassasiyete yol açmaktadır. Kadınlarda akutkomplike olmayan pyelonefritte bu semptom ve bulgulara ek olarak ateş, titreme, bulantı-kusma ve kostovertebral aç ı hassasiyeti görölmektedir. Erkeklerde üriner sistem enfeksiyonunda çoğunlukla böbreğin bakteriyel invazyonu gelişirken buna eşlik eden yapısal ve ürolojik sorunlar da bulunabilmektedir. Tanıda hastanın semptomları ve fizik muayene bulgularının yanında laboratuvar bulguları da önemlidir (13).

2.1.5.2. Laboratuvar tanı

2.1.5.2.1. İdrar Örneğinin Alınması

Uygun örnek alımı, kültür sonuçlarının doğru değerlendirilmesi ve klinik fayda sağlanması için önem taşımaktadır. Örnek, dikkatli alınmış olsa da perineal, vajinal ya da periüretal flora ile kontamine olabilir. Mümkün olduğu sürece sabah idrarı alınmalı, alınamadığında mesanede en az dört saat beklemiş idrar örneği gönderilmelidir. Örnek vermeden önce hastanın su içmesi, idrarı seyreltip koloni sayısını düşüreceğinden tavsiye edilmemelidir(1, 42).

Suprapubik aspirasyon: Kontamine olma ihtimali en düşük örnek olduğundan özellikle septik tabloda olup acil tedavi ihtiyacı olan bebekler için tercih edilecek örnek alma yöntemidir. İnvazif bir işlem olması nedeniyle laboratuvara gelen örnekler arasında oranı oldukça düşüktür. İşlem sırasında mesanenin dolu olması ve uygun cilt temizliği gereklidir. (43, 44).

Direkt kateterizasyon: Hasta güvenilir şekilde kendiliğinden örnek alamadığında uygulanır. Çocuklarda ve nörolojik ya da ürolojik komplikasyonlar nedeniyle idrar yapamayan hastalarda tercih edilen örnek alma yoludur. İşlem öncesinde uygun cilt temizliği gereklidir. Kateterizasyon yapıldıktan sonra elde edilen ilk bir kaç mililitre idrar dışarı atılmalı, sonraki idrar steril kaba toplanmalıdır. (43, 44).

Sistoskopi ve nefrostomiden alınan idrar: İlgili uzman tarafından enfeksiyon bölgesini belirlemek için alınan invazif örneklerdir. Örnekler laboratuvara “sol böbrek/sağ böbrek” şeklinde işaretlenmiş olarak gelir. (43, 44).

Orta akım idrar: İnvazif olmayan bir işlem olması dolayısıyla en sık tercih edilen idrar örneği alma yöntemidir. Ancak perineal, vajinal ya da üretral flora ile kontaminasyon olasılığı yüksektir. Kadınlar için periüretal bölgenin önden arkaya doğru önce sabunlu ya da sabunsuz bezle, sonrasında su ile ıslatılmış bezle silinmesi ve idrar yapma sırasında labiumların parmaklar yardımıyla ayrılması önerilir. İlk idrar dışarı yapıldıktan sonra, hasta idrarını tutmadan, steril kabı idrar akımına doğru tutmalıdır. Erkeklerin üretral meatusu ıslak bezle silmeleri yeterlidir. Sünnetsiz erkeklerde, kontaminasyonu azaltmak için örnek verme sırasında cildi geriye doğru çekmeye özen gösterilmelidir. Cilt temizliği yapılarak ve yapılmadan verilen örneklerle yapılan karşılaştırmalı bazı çalışmalarda önemli bir fark bulunamadığı, özellikle kadınlarda kontaminasyonu önleyen asıl faktörün idrar örneği verilirken labiumların parmaklarla ayrılması olduğu bildirilmiştir .

Chlamydia trachomatis ve *Neisseria gonorrhoeae* tanısında kullanılacak nükleik asit testleri için orta akım idrar uygun örnek değildir. Bu hastalar perine temizliği yapmadan ve steril kaba idrarın ilk kısmını koyarak örnek vermelidirler (1).

Foley kateterden alınan idrar : Kateterize hastadan idrar örneği alınması gerektiğinde kateter ve toplama tüpleri birbirinden ayrılmamalı, kateterin proksimal giriş yeri uygun şekilde dezenfekte edildikten sonra örnek buradan iğne ile alınmalıdır. Örnek alınma yetecek idrar birikimi için kateter girişinin alt kısmından kısa süreli kısa kaç yapılabilir. Bakteriler, kateteri kolonize etmiş ancak mesaneyi kolonize etmemiş olabilir. Böyle hastalarda uzun süre takılı kalmış kateter yerine, kateter değiştirildiğinde yeni takılmış kateterden örnek almak daha faydalıdır. Kateterin ucundaki idrar torbasından örnek alınmamalıdır. Foley kateterinin kendisi kültür için kabul edilemez (1).

Pediyatrik hastalarda torba ile alınan idrar uygun örnek değildir. Tuvalet eğitimi olan çocuklarda orta akım idrar neredeyse erişkinlerdeki kadar güvenilirdir. Orta akım idrar veremeyen çocuklarda direkt kateterizasyon kullanılarak idrar alınması tercih edilmelidir. Torba ile alınmış idrar örnekleri kabul edilemez düzeyde yüksek yalancı pozitifliklere neden olur (1). Başka örnek alınamadığı durumda torba ile alınmış bir idrar değerlendirilmişse, negatif sonucun anlamlı olduğu ancak pozitif sonucun, tek tip bakteri üremesi olsa bile, uygun alınmış bir örnek ile doğrulanması gerektiği bildirilmektedir (1).

Örneklerin laboratuvara ulaştırılması

Örneklerin laboratuvara steril, sıkı kapatılmış idrar kaplarında ve doğru bir şekilde etiketlenmiş olarak gönderilmesi çok önemlidir. Etiketle hasta bilgileri, idrar örneğinin alınma zamanı ve hangi yöntemle alınmış olduğu mutlaka belirtilmelidir. İdrardaki herhangi bir patojenin ya da kontaminan bakterinin koloni sayılarının değişmemesi için idrar, örnek alınımından sonra mümkün olan en kısa sürede işleme alınmalıdır. Örneğin laboratuvara ulaşması iki saatten önce mümkün değilse örnek buzdolabı ısısında veya koruyucu içinde saklanmalıdır. 24 saati geçen taşımalarda idrar laboratuvara sıklıkla borik asit içeren koruyucu içinde ulaştırılır. Koruyucuların, koloni sayısını 24-48 saate kadar sabit tuttuğu gösterilmiştir. Ancak koruyuculu tüpe 3 ml'den az miktarda idrar konulması durumunda bakteri üremesi borik asit tarafından inhibe edilebilir (1).

İdrar kültürü için red kriterleri:

Aşağıdaki durumlarda red kriterleri işletilir ve klinisyen iletişim kurularak yeni örnek istenir:

- Buzdolabında ya da koruyucuda taşınmadığı halde laboratuvara iki saatten geç getirilmiş örneklerle kültür yapılmaz.
- 24 saat toplanmış idrar örneğine kültür yapılmaz.
- Foley kateter ucuna kültür yapılmaz.
- Kateterize hastanın idrar torbasından kültür yapılmaz.
- Örnek kabında sızıntı varsa kültür yapılmaz.
- Etikette örnek alım zamanı ve örnek alma metodu yoksa yeni bir örnek istenir.
- Bebeklerden idrar torbası ile örnek alımından vazgeçilmelidir. Uygun örnek, kateterle alınmış örnektir.
- Suprapubik örnek dışında idrar, anaerob kültür için kabul edilmez.
- 24 saat içinde aynı yöntemle alınmış ikinci örnek “tekrar” örnektir.

Örneklerin değerlendirilmesi

Örnek alma metodu laboratuvarında seçilecek besiyerinden, ekim yapılacak örnek miktarına, yapılacak işlemlerin derecesine ve raporlamaya kadar her bir basamağı etkilemektedir. İlk epizod komplike olmayan ÜSE için kültüre gereksinim olmaksızın bölge ve hastane sürveyans verilerine göre tedavi verilebilir. İlk 48 saatte düzelme olmadığında ve yineleyen enfeksiyon ya da komplikasyon varlığında kültür yapılması önerilmektedir (1, 2).

İdrarda lökosit varlığının değerlendirilmesi:

Piyüri, akut komplike olmayan ÜSE olan kadınların çoğunda mevcuttur. Bununla birlikte, *Chlamydia* enfeksiyonu, *Trichomonas* enfeksiyonu, pnömoni ve sepsis gibi başka enfeksiyöz hastalıklarda da piyüri olabilir. Ayrıca, taş, organ büyümesi gibi enfeksiyöz olmayan bazı klinik durumlarda da piyüri olabilir. Piyüri tespiti için kullanılan ve farklı duyarlılık ve özgüllüğü olan pek çok laboratuvar metodu vardır. (45) “Dipstick” testi ile lökosit esterez tespiti, hızlı ve ucuz bir lökosit tespit yöntemidir. Bu yöntem için, ÜSE tespitinde %72-96 duyarlılık ve %9-98 özgüllük bildirilmektedir. Vajinal sekresyonla kontaminasyon sonucu yalancı pozitiflikler, glikozüri, ürobilinojen varlığı gibi nedenlerle yalancı negatiflikler gözlenebilir. Negatif sonuç ÜSE’yi ekarte

ettirmez; test sonucu negatif olsa bile hastada semptom varsa tedavi ve/veya ileri tetkik gereklidir. k(45)

Mikroskopik idrar analizi ile santrifüj edilmiş ya da edilmemiş idrarda şekilli hücresel elemanlar, bakteriler, mayalar, parazitler ve kristaller direkt olarak ya da hemositometrede incelenir. Santrifüj edilmiş idrarda genel olarak 5 lökosit/hpf altındaki değerler normal olarak kabul edilir. Santrifüj edilmemiş idrarda ≥ 10 ve ≥ 100 lökosit/hpf sınır değer olarak kullanılmıştır. Santrifüj edilmemiş idrar kullanıldığında manüel mikroskopi ile otomatize mikroskopi sonuçlarının uyumlu olduğu gözlenmiştir (45).

Otomatize idrar mikroskopisi genellikle akım sitometri kullanılarak yapılır. Yeni jenerasyon idrar akım sitometri cihazlarında hem lökosit hem de bakteri tespitini mümkün kılan floresan boyalar ve analitik kanallar kullanılmaktadır. Ancak bu sistemlerde kullanılan çok çeşitli sınır değerler bildirilmiştir ($\geq 25, 30, 40, 150$ lökosit/ μ l). Otomatize mikroskopi ile ÜSE tespitinde duyarlılık %71-98 ve özgüllük %55-92 olarak bildirilmiştir(45).

Yeni kılavuzlar, akut komplike olmayan ÜSE için piyürinin destekleyici olduğunu ancak tanı koydurucu olmadığını, klinik tanının piyüri varlığından daha güvenilir bir belirteç olduğunu bildirmektedir. Piyürinin gösterilmesi atipik semptomları olan kadınlar için faydalı olabilir (45). Kateterize hastalar için hazırlanmış kılavuzlarda piyürinin asemptomatik bakteriüri ve ÜSE için tanısız olmadığı belirtilmektedir (46). Piyüri varlığı, yokluğu veya derecesi kateterize hastalarda asemptomatik bakteriüri ve ÜSE ayırımını yapmak için kullanılmamalıdır. Bakteriüriye piyüri eşlik ediyor olsa bile bu durum asemptomatik hastaların antimikrobiyal tedavi alması yönünde bir belirteç olarak kullanılmamalıdır. Renal tüberküloz hastalarında, nötroopenik hastalarda, kanser hastalarında gerçek bir enfeksiyon olsa bile piyürinin olmayabileceği ve bu hastalarda sadece bakteri varlığının değerlendirilmesi gerektiği unutulmamalıdır (1).

İdrarda bakteri varlığının değerlendirilmesi:

İdrarda bakteri bulunması bakteriüri olarak adlandırılır. Santrifüj edilmemiş, orta akım idrarının Gram boyamasıyla boyanmış preparatının X1000 büyütmede incelenmesinde tek bir bakteri görülmesi, idrarın mililitresinde 10^5 ve daha fazla bakteri varlığına işaret eder.

İdrarda bakteriüriyi saptamaya yönelik bir diğer yöntem olarak nitrit varlığının gösterilmesi kullanılabilir. Bu yöntem, bakterilerin normalde idrarda var olan nitratları

nitritleredönüştürebilmesi esasına dayanır, bunun için idrarın mesanede en az 4 saat beklemiş olması gereklidir. Test için en uygun örnek sabah alınan ilk idrardır. Literatürde testin duyarlılığı % 22,9- 44,9 ve özgüllüğü % 98 olarak bildirilmiştir. Nitrit testinin lökosit esteraz testi ile birlikte kullanılması halinde ise duyarlılığı % 78- 92 ve özgüllüğü % 60- 98 oranında bulunmuştur (14, 47). Bu yöntem, yalancı negatiflik oranının yüksek olması ve tüm üropatojenlerin nitrit pozitifliğine sebep olmaması nedeniyle güvenilir değildir (13, 14).

Gram boyama:

İdrarın Gram boyaması etkenin sayısı ve morfolojisi ile ilgili fikir vermekte faydalıdır; istem olduğunda yapılmalıdır. Yatan hastalarda, sepsis varlığında kan kültürleri pozitifleşmeden idrarın Gram boyasının etkenin belirlenmesinde faydalı olabileceği bildirilmiştir (42).

Gram boyamada, 10 mikrolitre santrifüj edilmemiş idrar kullanılmalı ve metanol ile tespit edilmelidir. Her bir immersiyon alanında bir organizma görülmesi 10^5 CFU/ml üreme ile uyumludur. Çok sayıda skuamöz epitel hücresi varlığı, kontaminasyonu düşündürür. Santrifüj edilmemiş idrarda >10 lökosit/hpf görülmesi, pyüri olarak değerlendirilir. İki yaşından küçük çocuklarda piyüri tespiti için santrifüj edilmemiş idrardaki lökositlerin hemositometrede sayılmasının duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olduğu bildirilmiştir (42, 46).

İdrar kültürü:

Geçmişte ÜSE tanısı kültürde 10^5 CFU/ml tek çeşit bakteri üremesine dayanmaktaydı. Ancak yıllar içerisinde, bu sınır değer duyarlılığının düşük olduğu ve daha düşük bakteri sayılarının da, hastanın klinik bulguları varsa, ÜSE'ye neden olabileceği gösterilmiştir. İdrar kültüründe düşük sayıda bakteri üremesi olan ve tedavi almayan hastaların yaklaşık yarısında iki gün sonra alınan kültürlerde 10^5 CFU/ml bakteri üremesi olduğu gözlenmiştir; düşük sayıda bakteri üremesi, hastanın enfeksiyonun erken aşamasında olduğunun bir göstergesi olabilir (1). Kadınlarda 10^2 ve erkekler 10^3 CFU/ml bakteri üremesinin enfeksiyonla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (1). Çocuklarda piyüri varlığının ÜSE için yönlendirici olduğu ve kültürde 5×10^4 CFU/ml üremenin anlamlı kabul edildiği bildirilmiştir (46).

Laboratuvar işlemleriyle ilgili kılavuzlarda inkübasyon süresi, ve değerlendirilen koloni sayısı ile ilgili ufak farklılıklar olsa da bütün kılavuzlarda değerlendirme, örneğin

alındığı metoda göre değişir. ÜSE değerlendirmesi için yaygın kullanılan “Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology” (CUMITECH) 2c ve klinik mikrobiyoloji uygulamalarında uygulamalar için kılavuz olarak sık kullanılan “Clinical Microbiology Procedures Handbook”ta ÜSE tanısına yönelik öneriler Tablo-3 ve Tablo 4’de gösterilmiştir (1, 42).

2009 yılında yayınlanan CUMITECH 2c, sonrasında yayınlanan “ Infectious Diseases Society of America” (IDSA)’nın kılavuzlarıyla birlikte değerlendirilip, 2011 yılında bir rapor sunulmuştur (45, 48). CUMITECH 2c’de invazif olmayan örnekler arasında sayılan, çocuk hastadan idrar torbasıyla alınan örneklerin tablodan çıkarılarak kabul edilemez örnek olarak değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (Tablo3’te idrar torbası hali hazırda çıkarılmıştır) (45).

Genel uygulama idrar kültürlerinin kanlı agar ve gram negatifler için seçici bir agara (EMB/MacConkey agar gibi) ekilmesidir. Gram pozitifler için bir seçici besiyeri de eklenebilir (CNA/PEA agar gibi). Sistoskopi ya da cerrahi ile alınmış örnekler için çikolata besiyeri eklenebilir. Son zamanlarda kullanılan kromojenik besiyerlerinin [BBL chromagar orientation ,BD Diagnostics), CPS ID3 (bioMerieux) ve Spectra UTI (Remel) gibi] performanslarının da oldukça iyi olduğu bildirilmektedir.

İdrar, örnek alım metoduna göre 0.01 ya da 0.1 ml miktarında, pipet ya da öze ile ekilir ve invazif olmayan örnekler için 16-18 saat, invazif örnekler için daha uzun süre inkübe edilir (Tablo 3 ve Tablo 4). Sadece kanlı agara sayım plağı şeklinde ekim yapılması, diğer besiyerlerine dört saha ekim yapılması uygundur (1, 42). Son zamanlarda, otomatize ekim cihazları da idrar ekimi için kullanılmaya başlamıştır.

Maya üremesinin tespiti için mantar besiyerine ekim yapmaya gerek yoktur. Ancak en az 0.01 ml örnek ekilmesi ve kültürlerin 48-72 saate kadar inkübe edilmesi önemlidir. Gram boyamada mikroorganizma görüldüğü halde kültürde üreme yoksa, özellikle hastada kronik ÜSE veya anatomik bozukluk mevcutsa, idrar örneğinin anaeroplara ve diğer yavaş üreyen etkenler açısından değerlendirilmesi uygun olacaktır. Risk faktörleri olmadan anaeroplara etken olduğu ÜSE çok nadir görülür (1).

Genel olarak, viridans grubu streptokoklar, *Neisseria* türleri, difteroidler, *Lactobacillus* türleri ürogenital flora, difteroidler ve stafilokoklar cilt florası olarak değerlendirilir. Koloni sayıları uygunsa; üropatojen olarak değerlendirilen gram negatif basiller, stafiloklardan *S. aureus* ve *S. saprophyticus*, mayalardan *C. albicans* ve *C. glabrata*, enterokok türleri, GBS başta olmak üzere beta hemolitik streptokoklar, *G. vaginalis*,

Aerococcus urinae ve üreaz pozitif *Corynebacterium* türleri için identifikasyon ve gerekli durumda duyarlılık testleri yapılır. Bakteriyemi ile birlikte seyreden her patojen için identifikasyon ve duyarlılık testleri yapılır (42).

GBS taşıyıcılığının tespiti için gebeden gönderilen idrar örnekleri için laboratuvar uyarılmalıdır. CDC, gebe kadınların idrar örneğinden izole edilen herhangi bir miktardaki GBS'nin raporlanması gerektiğini vurgulamaktadır (49). Oksidaz pozitif ve indol pozitif bakteriler her zaman tür düzeyinde tanımlanmalıdır çünkü *Vibrio* ve *Aeromonas* gibi gram negatif bakteriler sayıya bakılmaksızın patojen olarak kabul edilir (1, 42).

İdrarda en sık üreyen maya, *Candida spp*'dir. *Candida* üremesi olduğunda *C. albicans* ve *C. glabrata*'nın tür düzeyinde identifikasyonu yapılmalıdır. *Candida* üremesi olduğunda temel problem kolonizasyon ve enfeksiyonu ayırt etmenin kolay olmamasıdır. Kateterli hastada 10^4 CFU/ml üremenin enfeksiyona neden olduğu gösterilmişken 10^4 - 10^5 CFU/ml üreme olan kolonizasyon da bildirilmiştir. İdrarda *Candida* varlığı, diabeti ve obstrüksiyonu olan hastalarda daha anlamlı olabilir. Yenidoğanlarda *Candida* üremesi genellikle böbreklerin hematogen yolla enfeksiyonunun işaretidir (1, 42).

Poliklinik kullanımına uygun, idrar örneğinin zaman kaybı olmadan direkt ekilebildiği, semikantitasyon ve izolasyon yapabilen ticari kültür sistemleri geliştirilmiştir [CPS ID3 (bioMerieux), onSite urine culture device (Trek Diagnostics), Dip N count (Starplex Scientific), Uri-Check (Troy Biologicals), Uricult (Orion Diagnostica), DipStreak (Novamed) gibi]. Bu sistemlerin bir kısmında tahmini ön identifikasyona olanak sağlayan kromojenik besiyerleri kullanılmıştır (1). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan hızlı sonuç veren otomatize sistemlerin bir kısmı kültüre dayalıdır [ör. Uro-quick(Alifax)]; bu sistemler saatler içinde izolat elde edilmesi avantajıyla erken identifikasyon ve duyarlılık sonucuna yardımcı olabilir (50). Genel olarak hızlı otomatize sistemler komplike olmayan hastalarda ve negatif sonuçların hızlı elde edilmesinde yararlıdır(1, 51); ancak bu sistemlerin rutin olarak kullanımının değerlendirilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tablo 3. İdrar örneklerinin, örnek alma metoduna göre laboratuvarda işlemlenmesi

Örnek	Ekim	Minimum inkübasyon	İzolat sayısı	Koloni sayısı (CFU/ml)	Yapılacak işlem
İnvazif değil: • Orta akım idrar • Foley kateter girişinden alınan idrar	0.001 ml Kanlı agar MAC/EMB (CNA/PEA opsiyonel)	16 saat	1	<10.000	Mİ
				≥ 10.000	ID ve ADT
				İkisi de <10.000	İkisine de Mİ
			2	İkisi de ≥10.000	İkisine de ID ve ADT
				Bir izolat <10.000	<10.000 olan izolata Mİ
				Bir izolat ≥ 10.000	≥ 10.000 olan izolata ID ve ADT
				10.000	
				Bir izolat ≥100.000	≥100.000 olan izolata ID ve ADT
				İki izolat <10.000	<10.000 olan izolatlara Mİ
			≥3	Diğer üremeler	Bütün izolatlara Mİ: Raporda farklı morfolojilerde bakteri üremesi olduğu belirtilmeli ve tekrar örnek gönderilmesi önerilmektedir
İnvazif:	0.01 ml Kanlı agar MAC/EMB	48 saat	1	< 1000	Mİ
				≥ 1000	ID ve ADT
			2	İkisi de <1000	İkisine de Mİ
				İkisi de ≥ 1000	İkisine de ID ve ADT
				Bir izolat <1000	<1000 olan izolata Mİ
				Bir izolat ≥ 1000	≥ 1000 olan izolata ID ve ADT
				Bir izolat ≥10.000	≥10.000 olan izolata ID ve ADT
			≥3	İki izolat <1000	<1000 olan izolatlara Mİ
				Diğer üremeler	Mİ

[CUMITECH 2c'ye göre düzenlenmiştir (1).]

Mİ;minimum identifikasyon, ID;identifikasyon, ADT; antibiyotik duyarlılık testleri (Maya ve *C. urealyticum* gibi mikroorganizmalar için idrar 0.01 ml ekilir ve uzun inkübe edilir)

Tablo 4. İdrar örneklerinin, örnek alma metoduna göre laboratuvarda işlemlenmesi

Örnek	Ekim	Minimum inkübasyon	Üropatojen izolat sayısı	Yapılacak işlem (CFU/ml'ye göre)
İnvazif değil:			1	<10.000 Mİ ≥ 10.000 (15-30 yaş arası kadında ≥ 1000) olan her bir izolata İD ve ADT
• Orta akım idrar (< 65 yaş poliklinik hastası)	0.01 ml Kanlı agar MAC/EMB (CNA/PEA opsiyonel)	18 saat	2	<100.000 olan her bir izolata Mİ ≥100.000 olan her bir izolata İD ve ADT
			≥3	Raporda koloni sayılarıyla birlikte farklı morfolojilerde bakteri üremesi olduğu belirtilmeli ve tekrar örnek gönderilmesi önerilmelidir
İnvazif değil:			1	<10.000 Mİ ≥ 10.000 ID ve ADT
			2	<100.000 olan her bir izolata Mİ ≥100.000 olan her bir izolata İD ve ADT
• Orta akım idrar (yatan hasta/≥ 65 yaş)	0.01 ml Kanlı agar MAC/EMB CNA/PEA	36 saat	≥3	Lökosit/lökosit esterase normalse: Raporda koloni sayılarıyla birlikte farklı morfolojilerde bakteri üremesi olduğu belirtilmeli ve tekrar örnek gönderilmesi önerilmelidir Veya Klinisyenle iletişim kurulur; Örnek kateter portundan alınmışsa ve semptom varsa: <100.000 olan her bir izolata Mİ ≥100.000 olan her bir izolata İD ve ADT Örnek kateter portundan alınmamışsa ve semptom yoksa: Her bir izolata Mİ Raporda ID gerekiyorsa laboratuvarla iletişim kurulması önerilir
İnvazif:	0.01 ml	48 saat	1	100-1000 (flora ile) Mİ ≥ 1000 (ya da daha düşük sayıda saf üropatojen) İD ve ADT
• Suprapubik aspirasyon	Kanlı agar		2	<1000 olan her bir izolata Mİ ≥ 1000 olan her bir izolata İD ve ADT
• Direkt kateterizasyon	MAC/EMB			
• Sistoskopi	CNA/PEA			
• Nefrostomi			≥3	<10.000 olan her bir izolata Mİ ≥10.000 olan izolata İD ve ADT Veya Klinisyenle görüşerek karar verilir
• Maya kültürü				

”Clinical Microbiology Procedures Handbook” a göre düzenlenmiştir (42).

Mİ;minimum identifikasyon, İD;identifikasyon, ADT; antibiyotik duyarlılık testleri

NOT: Üropatojenlerin onda biri kadar bulunan flora elemanları ihmal edilir. Flora elemanlarının sayıları üropatojenlere benzerse, raporda koloni sayılarıyla birlikte farklı morfolojilerde bakteri üremesi olduğu belirtilmeli ve tekrar örnek gönderilmesi önerilmelidir.

2.1.5.2.2. Mikroorganizmaların Tanımlaması

İdrar kültürü değerlendirilmesi sırasında mikroorganizmalar kılavuzlara uygun şekilde minimal ya da tam olarak tanımlanabilir.

Minimal identifikasyon (tanımlama): Mikroorganizmaların grup olarak veya cins ve/veya tür düzeyinde muhtemel olarak tanımlamasıdır. İdrar kültürlerinin değerlendirilmesi için gerekli olduğunda minimal testler ile izolatlar raporlanabilir (Tablo 5) .

Tablo 5. Minimal testler ile izolatların raporlanması

Rapor	Minimal test
Muhtemel <i>E. coli</i>	MAC veya EMB agarda tipik olarak ürer ve laktoz pozitif olarak görünür veya indol pozitif ve oksidaz negatif
Muhtemel <i>P. aeruginosa</i>	MAC ve EMB agarda laktoz negatif görünür ve oksidaz pozitif ve indol negatif veya Pseudomonas kokusu
Gram negatif basil	EMB veya MAC'da iyi ürer fakat gram-negatif basiller için yukarıdaki kriterlerden hiçbirini karşılamaz
Maya	Islak preparat ve plak üzerinde maya ile uyumlu morfoloji
<i>S. aureus</i>	Katalaz-pozitif, gram-pozitif kok ve lam koagülaz pozitif .
Koagülaz negatif stafilocoklar	Katalaz-pozitif, gram-pozitif kok ve lam koagülaz negatif
<i>Enterococcus</i>	Katalaz-negatif, PYR-pozitif, nonhemolitik ve gram pozitif kok

MAC, Mac Conkey besiyeri; EMB, eozin metilen mavisi besiyeri

52 numaralı kaynaktan değiştirilerek kullanılmıştır.

Tam identifikasyon (tanımlama): Mikroorganizmaların cins ve tür düzeyinde tanımlamasıdır.

2.1.5.2.3. Manuel Yöntemlerle Tanımlama

1960'lı yıllara kadar bakteri tanımlaması büyük oranda yoruma dayalı karar verme becerisi ve tüp ve besiyeri ortamlarının kullanımına dayanmaktaydı. Geleneksel bakteri tanımlaması; koloni morfolojisi, Gram boyama sonuçları, tüp besiyerindeki reaksiyonların değerlendirilmesi, aglütinasyon testleri ve antimikrobiyal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesine dayanmaktadır.

Manuel tanımlama için koloni yapısının dikkatli incelenmesi önemlidir. Seçici olmayan kanlı agarda çoğu stafilokok türü 37°C'de 24 saatte 1-3 mm çapında koloniler oluşturur. *S. aureus* kolonileri pigmente, düzgün, hafif kabarık, hemolitik görünürken koagülaz negatif stafiloklar pigmentless, düzgün, hafif konveks ve opak koloniler oluşturur (34). Streptokok kolonileri kanlı agarda genelde gri-beyaz, parlak görünümündedir. Beta hemolitik streptokokların çapı genellikle 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası 0.5 mm ve üzerindedir. Kromojenik agarda açık yeşil renkte görülürler (37). Enterokoklar kanlı agarda 24 saatlik inkübasyonun ardından bazı daha ufak morfolojideki varyantlar haricinde 1-2 mm çaplarında görülürler. Genellikle alfa ya da non hemolitik olmakla beraber tavşan veya insan kanı içeren agarlarda bazı *E. faecalis* kolnilerine beta hemoliz yapmış olarak rastlanabilmektedir (36).

Gram negatif bakteriler için seçici özelliği olan Mac-Conkey ve EMB besiyerleri kullanılmaktadır. *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. gibi laktozu kullanan *Enterobacteriaceae* üyeleri Mac-Conkey agarda kırmızı-mor koloni oluştururlarken, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. gibi laktozu kullanmayan *Enterobacteriaceae* üyeleri bu besiyerinde renksiz, şeffaf koloni oluştururlar. EMB besiyerinde ise laktoz fermentasyonu sonucu *E. coli* metalik yeşil refle veren mavi-siyah koloniler, diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri pembe koloniler oluşturur ve nonfermenter üyeler de yarı saydam veya renksiz koloniler olarak gözlenir (27).

Gram pozitif kokların identifikasyonunda stafilokok, streptokok ve enterokokları ayırdetmek için katalaz testi kritik bir öneme sahiptir. Katalaz testi genel olarak stafilokoklarda pozitifdir. Tür ayrımı için yapılan koagülaz testinden kesin sonuç alınması için lam testi yerine tüp koagülaz testi daha güvenilirdir. Lam koagülaz testi

insanlarda enfeksiyona yol açan *S. aureus* ve *S. lugdunensis*'te de pozitif sonuçlanırken tüp koagülaz testinde *S. lugdunensis* için değişken sonuç alınabilmektedir. Üriner sistemde enfeksiyona yol açabilen *S. saprophyticus* novobiosine dirençli oluşuyla diğer birçok koagülaz negatif stafilokoktan ayrılır (34, 53).

Katalaz testi negatif olan gram pozitif koklar arasında streptokok ve enterokoklar klinik olarak önemli iki türdür. Üriner sistem enfeksiyonuna neden olabilen *S. agalactiae*, Lancefield grup B antijen varlığıyla tanımlanabilmektedir. Ayrıca *S. aureus*'un hemolizini ile *S. agalactiae* CFB proteininin eritrositleri sinerjik olarak lizise uğratması prensibine dayanan CAMP testi *S. agalactiae* için pozitif sonuçlanır. Pozitif reaksiyon, *S. aureus* beta hemolizi ve CAMP faktörü difüzyon bölgesinde üçgen şeklinde genişlemiş bir hemoliz zonu oluşmasıyla gerçekleşir. Bazı viridans streptokoklarda da gözlense de hippurati hidrolize ederek glisin oluşumuna yol açması *S. agalactiae*'nin ayırdedici diğer bir reaksiyonudur (37).

Enterococcus cinsi bakteriler safra tuzları varlığında eskülini hidrolize ederler ve bu reaksiyon safra-eskülin testi olarak adlandırılır. Lösin aminopeptidaz oluşturarak lösin- β -naftilamidi (LAP) hidrolize ederler. Çoğu enterokok cinsi pirolidonil arilamidaz (pirolidonaz, PYRaz) üretimiyle L-pirolidonil- β -naftilamid (PYR) hidrolizi yapar. Bu üç testin pozitif sonuçlanmasıyla birlikte %6.5 NaCl içeren buyyonda üremesi enterokok tanımlanmasında gereklidir (36).

Gram negatif bakteriler manuel olarak tanımlanırken mikroorganizmanın çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarını ortaya çıkaran testlerden faydalanılır. Bu testlerden birkaç dakikada sonuç alınabileceği gibi her bir reaksiyon için ilgili besiyerlerine koloniden ekim yapılarak 24-48 saat inkübasyonun ardından da değerlendirilme yapılabilir (24).

Sitokrom oksidaz enzimi varlığını saptamak için ‘’oksidaz testi’’ yapılır. *Enterobacteriaceae* üyesi mikroorganizmaların çoğunda sitokrom oksidaz enzimi bulunmamaktadır. Bu enzim tetramethyl-p-phenylenediamine'i oksitleyerek indofenol oluşumuna yol açar. Bu reaksiyon sonucu mor renk oluşumu gözlenir. Öze yardımıyla şüphelenilen koloniden bir miktar alınarak tetramethyl-p-phenylenediamine ayırıcı içeren oksidaz diski üzerine sürülür. Diskin renginde mora değişim, şüphelenilen koloninin oksidaz enzimini ürettiğini gösterir. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin oksidaz testi pozitifdir. Oksidaz testi negatif saptanan gram negatif basiller *Enterobacteriaceae* düşünülerek diğer biyokimyasal tanımlama testlerine tabi tutulurlar (24).

Gram negatif bakteri tanımlaması için Triple Sugar Iron (TSI) agar, Lysine Iron Agarda (LIA) agar, üreaz, metil kırmızısı ve Voges Proskauer testleri sıkça kullanılır. TSI agar ile; bakterilerin şekerleri kullanma, hidrojen sülfür (H_2S) ve gaz oluşturma yetenekleri test edilir. TSI içerisinde; bir birim glukoz, on birim sukroz ve on birim laktoz olmak üzere üç şeker bulunmaktadır. Besiyeri içeriğinde kazein, et peptonları, sodyum tiyosülfat, ferrik amonyum sülfat ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı bulunmaktadır. Bakteri glukoz fermentasyonu yapıyorsa dip kısmı sarı (asit), yüzey kısmı kırmızıdır (alkali). Bakteri laktoz, sukroz ya da bunlardan her ikisini birden kullanıyorsa dipte ve yüzeyde sarı renk oluşumu gözlenmektedir. Fermentasyon sırasında bakteri gaz oluştursa, besiyerinin dip kısmında gaz kabarcıkları, yer değişikliği ve çatlamlar gözlenmektedir (52, 54). Sodyum tiyosülfat, besiyerinde sülfür kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bakteri, kükürtlü bileşikler parçalayıp H_2S oluşturduğunda, ferröz sülfat ferröz sülfite dönüşmekte ve siyah renk oluşmaktadır (55). LIA besiyerinde lizinin dekarboksilasyonu ve deaminasyonu ile H_2S oluşumu test edilmektedir. Besiyeri içeriğinde pepton, et özütü, glukoz, lizin, sodyum tiyosülfat, ferrik amonyum sitrat, bromkrezol moru, krezol kırmızısı bulunmaktadır. Dekarboksilasyon reaksiyonu, besiyerinin dip kısmında gerçekleşmektedir. Başlangıçta, glukoz fermentasyonuna bağlı olarak dip kısımda sarı renk oluşmakta, lizinin dekarboksilasyonu sonrası oluşan alkali ürünler nedeniyle, besiyeri tekrar mor renge dönüştürmektedir. H_2S oluşumu, siyah renk değişimiyle saptanmaktadır. Deaminasyon besiyerinin yüzeyin kısmında gerçekleşmekte ve kırmızı renk oluşumu gözlenmektedir (52, 54).

Üreaz besiyeri içinde üre, glukoz, pepton ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı bulunmaktadır. Üreaz enzimine sahip olan bakteriler besiyerindeki üreyi parçalayarak amonyak, karbondioksit ve su oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan bu ürünler birleşerek amonyum karbonat oluşturmakta ve alkali ortam meydana getirmektedirler. Alkali ortam pembe renk değişimine neden olmaktadır (54).

Metil kırmızısı ve Voges proskauer testi için Clark Lubs besiyerine ekim yapılır. 24 saat inkübe edildikten sonra metil kırmızısı ve Voges proskauer testleri için ikiye ayrılır. Metil kırmızısı testiyle bakterinin glikoz fermentasyonu yaparak kuvvetli asit oluşturup oluşturumaması incelenir. Asit oluşumu, metil kırmızısı ayırıcı eklenince kırmızı renk değişimiyle gözlenir. Voges-Proskauer testiyle bakterinin asetil metil karbinol (asetoin)

oluşturup oluşturmaması incelenir. Alfa naftol ve KOH içeren ayıraçların eklenmesiyle kırmızı renk oluşumu pozitif sonucu gösterir (54).

2.1.5.2.3.1. Otomatize Sistemlerle Tanımlama

Geleneksel manuel yöntemlerle biyokimyasal reaksiyonlara dayalı olarak yapılan mikroorganizma tanımlanması, tanımlamada kullanılan biyokimyasal reaksiyonların daha daha pratik hale getirilmesiyle son yıllarda yerini otomatize sistemlere bırakmaya başlamıştır. Sistem bağımlı yaklaşımlarda; pozitif ve negatif reaksiyon kalıplarının çıkmasına izin veren bir dizi substrat seçimi ile veri tabanı profilleri ile karşılaştırılabilen metabolik bir profil ortaya çıkmaktadır. Otomatize tanımlama sistemlerinde; *Enterobacteriaceae* üyeleri, *Enterobacteriaceae* dışı gram negatif bakteriler, gram pozitif koklar, gram negatif koklar, anaeroplara, aeroplara, mayalar için farklı substrat dizilerinden oluşan paneller kullanılmaktadır. Bu paneller indikatör kombinasyonuna bağlı çalışmaktadırlar. Bunlar; substratın kullanımından oluşan pH değişiklikleri, kromojenik veya florojenik bileşiklerin salınımına bağlı enzimatik reaksiyonlar, çeşitli karbon kaynaklarının varlığında metabolik aktivitenin tetrazolium bazlı indikatörleri, uçucu ve uçucu olmayan asitlerin saptanması ve görülebilir üremenin tanımlanmasıdır. Her ne kadar hızlı olarak belirtilse de ortalama 2-4 saat süren inkübasyon periyoduna ihtiyaç duymaktadır. Sistemlerin avantajları arasında standardize yöntemler olması, uygulama kolaylığı, zaman tasarrufu, panel oluşturma seçeneği, ürün yelpazesi genişliği, erken sonuç alabilme, dijital ortamdaki veri tabanından otomatik tanımlama, birlikte antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarını da alabilme, dijital ortamda kayıt ve sonuç gönderme ve arşiv oluşturma sayılabilmektedir. Maliyet, cihazların bakımı için teknik servis bağımlılığı, kalibrasyon ve kontrol gerekliliği, veri tabanı güncelleme gereksinimi, bazı durumlarda ek test gerekliliği ve kit bağımlılığı dezavantajlar arasındadır. Reaksiyon doğruluğu üretici firma önerileri ile bağlantılıdır. İnokulum hazırlanması, inkübasyon şartları ve testlerin değerlendirilmesi kullanıcıya bağlıdır (56). Mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılan otomatize sistemlere ve sistemlerin dayalı olduğu reaksiyonlarına örnekler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Mikrobiyoloji laboratuvarında yaygın olarak kullanılan otomatize sistemlere örnekler

Reaksiyon	Üreme gereksinimi	Analit	Pozitif sonuç göstergesi	Sistem örnekleri
pH	Evet	Karbonhidrat kullanımı	pH bağımlı renk değişikliği	API, Crystal, Vitek, MicroScan kanvansiyonel, Phoenix, Sensititre panelleri
Enzim profili	Hayır	Enzimler	Kromojene bağımlı renk değişikliği, florijen salınımı	MicroScan hızlı, Cyrstal, Vitek, Phoenix, Sensititre panelleri
Karbon kaynakları	Evet	Organik ürünler	Tetrazolium işaretli karbon kaynaklarına elektron transferi	Biolog
Uçucu olan/olmayan asit	Evet	Hücrel yağ asitleri	Ürünlerin kromatografik izlenmesi	MIDI
Üremenin görsel olarak saptanması	Evet	Çeşitli substratlar	Bulanıklık saptanması	API 20C AUX panelleri

57 numaralı kaynaktan değiştirilerek kullanılmıştır (57).

2.1.5.2.3.2. MALDI-TOF MS ile Tanımlama

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında son yıllarda kullanılmaya başlanan hızlı bir otomatize identifikasyon sistemi olan Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi mikroorganizmaların kendilerine özgü proteomik parmak izi pik kalıplarına dayanarak tanımlama yapmaktadır. MALDI-TOF MS sisteminde mikroorganizmalara ait protein, peptid, şeker gibi biyomoleküllerin ve polimer, dendrimer, makromolekül, büyük organik moleküllerin iyonize edildikten sonra iyonların uçuş zamanlarına dayanarak protein profilleri çıkarılmaktadır. Bu profil spektrumlarına ait grafiksel görüntülerin, sistemin veri tabanındaki referans

organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür bazında tanımlanabilmektedir.

MALDI-TOF MS'in klasik kullanımı, kültürde üretilen saf koloni bakterinin ya da mayanın test edilmesi şeklindedir. MALDI-TOF MS sisteminde test edilecek mikroorganizma direkt transfer metoduyla çelik bir plak üzerine ince bir film olarak sürülür. Analiti iyonize etmek için organik, aromatik ve zayıf asidik bir matriks solüsyonu eklenir ve oda ısısında kurutulur (58). Analit sisteme girdikten sonra üzerine lazer atışları gönderilir ve lazer enerjisinin matriks tarafından absorbe edilir. Matriks moleküllerinin fotoiyonizasyonu, matriksten analite proton transferini ve böylece analitin iyonizasyonunu kolaylaştırır (59). İyonizasyon işlemi sonunda moleküller uyarılarak katı veya sıvı halden yüklü iyonize gaz molekülleri haline dönüştürülürler. Uçuş zamanlı kütle analizörleri, üretilen iyonların iyon kaynağı içerisinde dedektöre ulaşmak için sabit bir mesafeyi kat etmeleri prensibine dayanır. İyonlara yaklaşık bir metre uzunluğundaki bir tüp içinde hareket etmeleri için hızlandırıcı voltaj uygulanmaktadır (60). Levhadan ayrılan iyonize analit molekülleri, uygulanan voltaj ile hızlandırılarak uçuş tüpü içerisinde dedektöre ulaşana kadar sürüklenirler ve kütle/yük oranlarına (yük genellikle 1'dir) göre ayrılırlar (58). Moleküllerin uçuş zamanı ile molekül ağırlıkları belirlenir. Bütün moleküllere aynı kinetik enerji verildiği için, moleküllerin kütlesi, analit moleküllerinin uçuş tüpünü katetme süresiyle ters orantılıdır (59). Farklı kütledeki iyonlar farklı hızlarda yol alır ve dedektöre farklı zamanlarda ulaşırlar (60). Dedektöre ulaşan veriler işlenerek; önceden profiller çıkarılmış mikroorganizmalarla kıyaslanır, tepe noktaları 2000-20000 arasında değişen final kütle spektrumlarıyla sonuçlanır. Kütle spektrumları türe özgü parmak izleridir, tekrarlanabilirliği yüksektir ve üreme koşullarından fazla etkilenmezler. Elde edilen kütle spektrum parmak izi, uygun algoritmalar ile referans kütüphanelerdeki temel spektrumlarla kıyaslanarak tanımlama gerçekleşir (58). MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ve VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) mikrobiyolojide yaygın olarak kullanılan MALDI-TOF-MS sistemleridir (Willinge, Bader).MALDI-TOF MS ile *Enterobacteriaceae*'lar, non-fermentatif gram negatif bakteriler, stafilokoklar ve streptokoklar başta olmak üzere pek çok mikroorganizma türünde hızlı, kolay ve güvenilir bir şekilde tanımlanabilmektedir (61).

2.1.5.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri:

Bakteriyel izolatların CLSI veya EUCAST önerileri doğrultusunda antimikrobiyal duyarlılıklarını saptamak ve klinisyene teknik açıdan doğru ve kolay anlaşılıp yorumlanabilir bir şekilde rapor etmek, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevlerindendir (kaynak.clsi ve eucast) Antimikrobiyal duyarlılık testleri sıvı dilüsyon, agar dilüsyon veya agar difüzyon gibi konvansiyonel yöntemlerle yapılabileceği gibi, otomatize ve yarı otomatize sistemlerle de duyarlılık test edilebilir. Uygun yöntem seçiminde kolay uygulanabilirlik, maliyet, test edilecek ajanları seçme inisiyatifi, yarı otomatize veya otomatize sistemlerin kullanılma olanağı gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Konvansiyonel yöntemlere oranla daha hızlı sonuç verme amacıyla otomatize sistemler kullanılması hasta tedavisine önemli bir katkı sunmaktadır. (62).

2.1.5.2.4.1. Manuel Yöntemlerle Duyarlılığın Test Edilmesi

Dilüsyon yöntemleri

Dilüsyon yöntemleri, disk difüzyon yöntemiyle duyarlılığı test edilemeyen zor üreyen bakterilerin test edilmesi için uygun bir yöntemdir. Sıvı ve agar dilüsyon şeklinde uygulanabilmektedir. Agar dilüsyon testleri birkaç ilaca karşı birden fazla izolatın aynı anda test edilmesinde ve inokulum kontaminasyonlarının ve heterojen direnç fenotiplerinin saptanmasında kullanılabilecek en uygun testlerdendir. Plakların hazırlanma aşamasının oldukça zahmetli ve uzun zaman alması nedeniyle pratik değildir. Sıvı dilüsyon testleri makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleriyle yapılabilmektedir. Makrodilüsyon yönteminde 1 ml'den fazla ve genellikle 2 ml besiyeri içeren test tüpleri kullanılır. Testin değerlendirmesinde üreme görülen tüpten bir sonraki tüp konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilir. Herhangi bir antibiyotiğin bir bakteriye karşı etkinliğini belirleyen standardize ve güvenilir bir test olmakla birlikte zahmetli olması ve mikrodilüsyon gibi daha kolay uygulanabilir yöntemler bulunması nedeniyle pratikte pek yaygın kullanılmamaktadır (63).

Disk difüzyon yöntemi

Disk difüzyon testiyle birçok bakterinin antibakteriyel ajanlara karşı duyarlılığı belirlenebilir. Testi uygulamak için test edilecek antibiyotiğin belirli miktarı emdirilmiş olan kağıt diskler kullanılır. Diskler, bakterinin inoküle edildiği agar yüzeyine yerleştirilip inkübe edilir. İnkübasyon süresince diskteki antibiyotik agara yayılır.

Diskten uzaklaştıkça antibiyotik konsantrasyonu logaritmik bir şekilde azalmakta olup disk çevresinde giderek azalan miktarda antibiyotik içeren bir alan oluşur. Agar yüzeyine inokule edilen bakteri inhibitör konsantrasyonun ilerisindeki bölgede üreyebilir. Testi yorumlamada kullanılan duyarlılık ve direnç kategorileri 300'den fazla bakterinin tanımlanmış olan MİK sınır değerlerinin inhibisyon zon çaplarıyla karşılaştırılması sonucu oluşturulmuştur. Disk difüzyon testi kolay uygulanabilir, özel donanım gerektirmeyen, düşük maliyetli bir duyarlılık testidir. Klinik mikrobiyoloğun test edilecek antibiyotikleri seçme inisiyatifi bulunması ve sonuç raporlarının klinisyence kolay anlaşılır olmasıyla avantajlı bir yöntemdir. Sadece duyarlılık kategorisini gösterip bazı durumlarda gereken MİK sonucunu verememesi ise dezavantajları arasındadır (63).

2.1.5.2.4.2. Otomatize sistemle duyarlılığın test edilmesi

Ticari antimikrobiyal test sistemleri ilk olarak 1980'lerde tanıtılmaya başlanmış olup klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına 1990'lı yıllardan itibaren girmeye başlamıştır (64). Otomatize sistemler buyyon mikrodilüsyon yöntemiyle duyarlılığı test etmektedirler. Cihaz içine panellerin yerleştirilmesini takiben sonuç alınması için herhangi bir manuel müdahaleye gerek kalmadan 16 saatlik inkübasyonun ardından antimikrobiyal duyarlılık sonucu alınabilmektedir. Tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, veri yönetiminin uzman sistem analizleriyle yapılması otomatize sistemlerin avantajlarından (57). Daha hızlı sonuç alınabilmesiyle mortalite hızı ve yoğun bakımda kalma oranlarının düşmesiyle maliyet azalmaktadır (65).

İdrar kültüründen elde edilen izolatlar için antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlanması:

Komplikasyon olmayan ÜSE'nin tedavisi genellikle ampiriktir. Ancak uygun ampirik tedavinin belirlenmesi için komplike ve komplike olmayan ÜSE'de direnç durumunu objektif olarak gösteren verilere ihtiyaç vardır. ÜSE tedavisi giderek artan direnç oranları nedeniyle daha zor hale gelmiştir. Anlamlı üreme olduğunda antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekir. Çoğu antibiyotik kısmen ya da tamamen glomerüler filtrasyon yoluyla atılır. Ayrıca, pek çok antibiyotik (TMP-SXT, siprofloksasin gibi) tübüler sekresyonla üriner alana ulaşır ve glomerüler filtrasyon hızı düşük olsa bile idrarda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilirler. Sonuç olarak pek çok antibiyotik idrarda seruma göre 100-1000 kat daha yüksek konsantrasyona ulaşabilir.

Ancak, rutin antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlaması antibiyotiğin ulaştığı serum konsantrasyonlarına dayanmaktadır ve kan dolaşımı enfeksiyonlarındaki cevabı yansıtır. Bakterinin idrardan temizlenmesi, kandaki antibiyotik seviyesinden çok idrardaki antibiyotik seviyesiyle ilişkilidir. Dolayısıyla, serum konsantrasyonlarına dayalı olarak yorumlanan antibiyotik duyarlılık sonuçlarının klinik anlamlılığı tam olarak bilinmemektedir. Hastadaki yanıtı öngörebilmek için duyarlılık testlerinin idrar konsantrasyonlarına göre yorumlanması daha uygun olacaktır. (1, 45). Mevcut kılavuzlarda sadece idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılmak üzere bazı antibiyotikler ve değerlendirme kriterleri mevcuttur (CLSI’da trimetoprim, fosfomisin, nitrofurantoin, siprofloksasin, norfloksasin, ofloksasin, lomefloksasin, sefazolin, sulfonamidler, EUCAST’ta trimetoprim, fosfomisin, nitrofurantoin, siprofloksasin, levofloksasin ve mesilinam için ÜSE kriterleri mevcuttur) (66, 67). Makrolidler, klindamisin ve kloramfenikol gibi ÜSE için kullanımı uygun olmayan antibiyotikler bildirilmemelidir. Direkt idrardan duyarlılık testi yapılması önerilmez. Ancak özel istek üzerine, Gram boyamada tek tip morfoloji görüldüyse yapılabilir. Bu durumda, üreme olduğunda standart duyarlılık testi de mutlaka yapılmalıdır (1, 66, 67).

Sonuçların raporlanması

Kültürde üreme olmadığında raporun “negatif” ya da “üreme olmadı” şeklinde değil; 0.001 ml ekim yapıldıysa “ ≥ 1000 CFU/ml üreme olmadı” ve 0.01 ml ekim yapıldıysa “ ≥ 100 CFU/ml üreme olmadı” şeklinde düzenlenmesi önerilir. Flora elemanları ürettiğinde raporda normal ürogenital flora ürettiği belirtilmelidir. Üreme olan kültürler için rapor, koloni sayılarıyla birlikte minimum identifikasyon ya da tam identifikasyon ve duyarlılık sonuçlarını içermelidir. Karışık üreme olduğunda koloni sayısı bildirilmeli ve farklı morfolojilerde bakteri üremesi olduğu belirtilerek tekrar örnek gönderilmesi önerilmelidir (Tablo 3 ve Tablo 4). Besiyerinde antibiyotiğe bağlı inhibisyon gözleendiğinde raporda koloni sayısı belirtilmemeli, “Antimikrobiyal inhibisyon nedeniyle koloni sayısı güvenilir değildir” şeklinde bir not düşülmelidir (1, 42)..

2.5.6. Tedavi

Asemptomatik bakteriüri, eşlik eden piyüri olsa bile gebe kadınlar ve idrar yolunda invazif işlem uygulanacak hastalar haricinde tedavi edilmez. (2).

Komplike olmayan ÜSE için ampirik tedavi olarak nitrofurantoin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX), fosfomisin ve pivmesilinamdan birinin tercih edilmesi önerilir. TMP-SMX direncinin bir bölgede %20'den fazla olduğu biliniyorsa, ampirik tedavi protokolünden çıkarılmalıdır. Bu ilaçlar, hastaya ait bir nedenle kullanılmadığında, florokinolonlar ya da beta-laktamlar kullanılabilir. Bazı bölgelerde florokinolon direncinin yüksek olduğu unutulmamalıdır. Beta-laktam kullanılacaksa ampisilin veya amoksisilinin tek başına kullanımından kaçınılmalıdır (68).Tekrarlayan enfeksiyonlar ve komplike İYE tedavisi, antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre yapılır (14).

İdrarda *Candida* üremesi olan çok düşük doğum ağırlıklı bebekler, invazif genitoüriner işlem yapılacak hastalar, nötropenik hastalar, renal transplant alıcıları ve semptomatik hastalar için antifungal tedavi önerilmektedir (1).

Organizmanın duyarlı olduğu bir antibiyotik ile tedavi sonrasında 48 saat içinde bakterinin idrardan elimine edildiği varsayılmaktadır. Tedavi sonrası bakteriyolojik iyileşmeyi göstermek için kültür gönderilmesi önerilmemektedir. Ancak semptomların devam etmesi ya da tekrar etmesi durumunda kültür gönderilmelidir. Çocuklarda kültür negatifleşmesine rağmen ateş 48 saatten biraz daha uzun sürebilir. Gebeler ve renal hasar açısından yüksek riski olan hastalar için tedavinin tamamlanmasından sonraki 1-2 hafta içinde nüks varlığının tespiti için kültür yapılması önerilir (1).

2.2. MALDİ-TOF MS'in Direkt Klinik Örnekte Kullanımı

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan geleneksel yöntemlerle hastaya sonuç raporlanması genellikle en az 48 saat sürmektedir. Kültür, altın standart olarak kabul edilmekle birlikte mikroorganizmaların üremesi için uygun ortama ve yeterli süreye ihtiyaç duymaktadır. Son yıllarda rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlayan ve kültürde mikroorganizma üremesinin ardından dakikalar içinde tanımlama yapılmasına olanak sağlayan MALDİ-TOF MS sistemi mikrobiyolojik tanıda bir çığır açmıştır. Bu sistemin kolay üreyen gram pozitif ve gram negatif bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir(69)MALDI-TOF MS'in aynı zamanda, özellikle rutin laboratuvarlarda zor tanımlanan gram pozitif basillerin, anaeroplara ve bazı non-fermenter bakterilerin identifikasyonunda geleneksel yöntemlere göre üstün olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (70, 71). Bununla birlikte, bazı organizmaların doğru olarak tanımlanmasında

sorunlar yaşanmaktadır. *S. pneumoniae* ve *S. mitis* gibi aynı cins içerisinde yakın türler doğru olarak tanımlanamayabilmektedir (72, 73). Benzer şekilde *Shigella* cinsi bakteriler ile *E. coli* 'nin ayrımını yapmakta MALDI-TOF MS yetersiz kalmaktadır. (74, 75).

Geleneksel metotlarla karşılaştırmalı olarak, MALDI-TOF MS ile kan, steril vücut sıvısı ve idrar gibi direkt klinik örneğin test edildiği çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda, özellikle tek tip mikroorganizma içeren klinik örnekler için, oldukça güvenilir ve hızlı sonuç alındığı belirtilmektedir (76).

Yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan kan dolaşımı enfeksiyonlarında hızlı tanı ve tedavi hayati önem taşımaktadır. Etkili antimikrobiyal tedavi almayan hastalar başta olmak üzere yoğun bakım hastalarının %30-70'inde bu enfeksiyonlar gelişmektedir. (76). Etken identifikasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığın saptanma süresi sağ kalım, hospitalizasyon süresi ve maliyetle doğru orantılıdır. Septik şok evresinin ilk altı saati içerisinde antibiyotik tedavisinin gecikmesi, hastanın hayatta kalma oranını her saat için %7.6 oranında düşürmektedir (77). Etkili antibiyotik seçimi için enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların hızlı ve uygun yöntemlerle tespit edilmesi önemlidir (78). Geleneksel metotlara göre kan kültür cihazında pozitif sinyal alındıktan sonra subkültür ve antimikrobiyal duyarlılık testi için ilave 2-3 güne ihtiyaç duyulmaktadır. MALDI-TOF MS sistemiyle pozitif sinyal alınan kan kültürü şişelerinden subkültüre gerek kalmadan direkt olarak hızlı, güvenilir ve ucuz bir şekilde tanımlama yapılabilen ve böylelikle rutin metotlara göre en az 24 saat daha kısa sürede sonuç verebilmekte ve hastanede kalım süresini kısaltarak maliyeti azaltmaktadır (79). Yapılmış çalışmalarda direkt kan kültür şişesinden gram negatif bakterilerin %93,5'i, gram pozitif bakterilerin %78,5'inin doğru bir şekilde tanımlandığı bildirilmiştir (76).

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında olduğu gibi bakteriyel menenjit de hayatı tehdit eden enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. Erken tanı ve hızlı antimikrobiyal tedavi başlanması hayati önem taşımaktadır. Bakteriyel menenjitli olgularda etkenin kültürle izolasyonunu beklemeden Gram boyamanın hemen ardından direkt beyin omurilik sıvısından MALDI-TOF MS ile tanımlanması ve uygun tedavinin hızlı bir şekilde başlanması mümkün olmaktadır (11). Ayrıca beyin omurilik sıvısının yanında diğer steril vücut sıvılarının direkt olarak MALDI-TOF MS ile test edildiği çalışmalar yapılmakta ve etkenin tanımlanma oranı %93,8 ve %97 arasında değişmektedir (80).

ÜSE, yaygın toplum kökenli ve hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar arasındadır. Etken mikroorganizmanın hızlı tanısı, gereksiz ve/veya etkisiz ampirik antibiyotik tedavinin önlenmesi için önem taşımaktadır. MALDI-TOF MS sistemi, kan ve steril vücut sıvılarında olduğu gibi son yıllarda idrarın da direkt olarak test edilmesinde kullanılmaya başlanmıştır (81). Bununla birlikte henüz çalışma sayısı kısıtlıdır. Bu çalışmalarda duyarlılık oranları %50-%90 arasında değişmektedir. Rutin laboratuvara kültür için gönderilen idrar örneklerinin çoğunda üreme olmaması ve bazı idrar örneklerinde birden fazla türde organizma bulunması, MALDI-TOF MS'indirekt idrar örneğine uygulanmasındaki sorunlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun için örneğin öncelikle bakteriyel yükü açısından değerlendirilmesi uygundur. Gram boyama, bakteriyel yükün saptanmasının yanında etken mikroorganizma tipinin belirlenmesinde de etkili bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Klinik örnekteki mikroorganizma sayısı 10^5 CFU/ml ve üzerinde olduğunda oldukça etkilidir. Son zamanlarda idrardaki lökosit ile birlikte bakteri yükü ile ilgili bilgi veren akım sitometre yöntemlerinin kullanımı da MALDI-TOF MS ile test edilecek idrar örneklerinin seçimi açısından oldukça faydalı bulunmuştur. MALDI-TOF MS ile direkt idrar örneğini test ederken idrardaki epitel, lökosit ve benzeri hücresel elemanların ayrılması gerekmektedir. Aksi takdirde bu elemanlar protein piklerini etkilemekte ve güvenilir olmayan tanımlamalar gerçekleşmesine neden olabilmektedir. Bunun için öncelikle idrar örneğinin düşük devirde, kısa süreli santrifüj edilmesi, böylece bu hücresel elemanların pellet oluşturmaları ve idrar örneğinin bu pelletten ayrılması gerekmektedir. Bir sonraki adım olarak ise mikroorganizmanın tanımlanabilmesi için pellet elde edilmesi hedeflenmektedir. Daha yüksek devirde ve daha uzun süreli santrifüjle bu mümkün olabilmektedir. (5-11, 79, 81, 82).

Sanchez-Juanes ve arkadaşları, idrar örneğini hücresel elemanlardan ayırmak için deterjan etkili sodyum dodezil sülfat (SDS) ile çalışma öncesi muamele etmiş ve bu işlem uygulanmadan yapılan testlerde güvenilir tanımlama elde edilemeyen örneklerin önemli bir kısmı tanımlanabilmiştir (9). SDS, Kim ve arkadaşları tarafından da idrar örneğinin MALDI-TOF MS ile direkt olarak test edilmesinde santrifüj basamaklarından sonra kullanılmış ve 100.000 CFU/ml üzeri sayıdaki bakterileri önemli oranda MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanmıştır (5).

MALDI-TOF MS'in direkt idrarda kullanımıyla ilgili çalışmalar devam etmekle birlikte çeşitli çalışmalarda kullanılan idrar miktarı, deterjan etkili madde, santrifüj basamakları değişmektedir ve henüz standart bir protokol oluşturulamamıştır (10). Direkt örnekte duyarlılığı yüksek bir yöntem ile etken mikroorganizma tanımlanması, ÜSE teavisinde önemli katkı sağlayacaktır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Nisan 2016-Aralık 2016 tarihleri arasında rutin kültür için gönderilen 600 idrar örneği prospektif olarak incelenmiştir.

Çalışma, iki aşamalı olarak tasarlanmıştır:

Birinci aşamada; literatürde tanımlanmış yöntemlerden yola çıkılarak direkt idrar örneğinden bakteri tanımlaması için bir yöntem optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu aşamada, laboratuvarımıza rutin olarak gönderilmiş ve kültürü yapılmış olan idrar örnekleri buzdolabında bir gece bekletilmiş, 18 saatlik inkübasyonun ardından ≥ 100.000 CFU/ml koloni sayısında tek tip mikroorganizma üremesi olan idrarlar MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) ile çalışmaya alınmıştır. Bu aşama için çalışmaya 500 idrar örneği dahil edilmiştir.

İkinci aşamada; laboratuvarımıza rutin olarak kültür için gönderilen ve Gram boyama sonucunda tek morfolojide mikroorganizma görülen 100 idrar örneği kültürle eş zamanlı olarak ilk basamakta optimize edilen yöntem kullanılarak direkt olarak MALDI-TOF MS ile test edilmiş ve elde edilen bulgular kültür sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca, yöntem optimizasyon aşamasındaki her bir değişken için, MALDI-TOF MS kullanılarak kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanması ile lökosit yoğunluğu ve koloni sayısı arasındaki ilişkiler incelenmiştir.

İstatiksel analizler için tüm örnekler ait Gram boyama, kültür ve MALDI-TOF MS sonuçları kaydedilmiştir.

3.1.Örneklerin İşlenmesi:

İdrar örneği, Gram boyama yapılmak üzere santrifüj edilmeden temiz lamaların üzerine alınarak preparat hazırlanmıştır. BBL CHROMagar Orientation (Becton Dickinson, Almanya) besiyerlerine kantitatif ekim yapılmıştır. Ekim işlemi idrar örneğinin alınma

şekline göre farklı hacimlerde özelerle yapılmıştır. Orta akım idrarı 0.001 ml, direkt kateterizasyon, pediatrik sonda, suprapubik aspirasyon, sistoskopi ile alınmış örnekler ve nefrostomi örnekleri 0.01 ml hacmindeki özeyle ekilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında idrar örnekleri, plaklarda üreme olup olmadığı değerlendirilerek test edileceği için ekim işleminin hemen ardından kapakları sıkıca kapatılarak + 4°C’de saklanmıştır.

İkinci aşamada ise Gram boyalı preparatında tek tip morfolojide mikroorganizma görülen klinik örnekler direkt olarak test edilmiştir.

3.2. Mikroskopi

Preparat hazırlamak için lamın üzerine mumlu kalemle alan çizilmiş, santrifüj edilmeden iyice karıştırılarak 10µl idrar öze yardımıyla lama alınmış ve havada kurutulmuştur. Saf metanolle sabitlenen preparat boya standına yerleştirilerek Gram boyama yapılmıştır. Tüm boyalar lamı kaplayacak şekilde uygulanmış, süre bitiminde boya akıtılmış ve hafif akan çeşme suyunda boyanın fazlası yıkanmıştır. İlk boya olarak 30 saniye süreyle kristal viyole, ikici olarak 30 saniye süreyle iyotlu boya olan lugol solüsyonu, renk giderici olarak aseton alkol, son olarak zıt boya olarak 30 saniye süreyle safranin uygulanmıştır.

Lökositler ışık mikroskopunda 10X objektif ile “nadir, az, orta, bol” şeklinde derecelendirilmiştir (Tablo 7). Bakteriler, yağlı immersiyon objektifiyle incelenmiştir (3). Lökosit ve bakteri varlığı not edilmiştir.

Tablo 7. Gram boyalı preparattalökosit yoğunluğunun kategorize edilmesi

Lökosit sayısı	Kategori
≤ 1	Nadir
1-9	Az
10-25	Orta
≥ 25	Bol

42 numaralı kaynağa göre düzenlenmiştir.

3.3. Bakteri Tanımlanması

Çalışmanın ilk aşaması olan yöntem optimizasyonu basamağında; ekim yapılan besiyerleri 37°C’de 18-24 saat inkübasyon sonrası ≥ 100.000 CFU (“colony forming unit”/koloni oluşturan birim)/ml saf üreme açısından değerlendirilmiş ve üreyen mikroorganizma tanımlaması MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Almanya) ile yapılmıştır. Koloni sayımı yapılırken, idrar örneğinin alınma şekli dikkate alınmıştır. 0.001 ml’lik özeyle ekimi yapılmış örnekler için plaktaki koloni sayısı 1000 ile çarpılarak, 0.01 ml’lik özeyle ekimi yapılmış örnekler için plaktaki koloni sayısı 100 ile çarpılarak hesaplanmıştır. Yoğun üreme gözlenen plaklarda $\frac{1}{4}$ sahadaki koloniler sayılıp dört katı hesaplandıktan sonra öze hacmine göre 100 veya 1.000 ile çarpılarak mililitredeki koloni sayısı belirlenmiştir. Orta akım idrarı örneklerinde plakta yaklaşık 100 koloni varlığında, koloni sayısı 100.000 CFU/ml, 1.000 koloni varlığında 1.000.000 CFU/ml, 1.000’den fazla koloni varlığında $>1.000.000$ CFU/ml olarak değerlendirilmiştir. direkt kateterizasyon, pediatrik sonda, suprapubik aspirasyon, nefrostomi ve sistoskopi ile alınmış örnekler ise 100 ile çarpılarak aynı yöntemle hesaplanmıştır.

≥ 100.000 CFU/ml saf üreme gözlenen idrar örnekleri, direkt olarak MALDI-TOF MS ile tanımlanmak üzere bekletildikleri $+4^{\circ}\text{C}$ ’lik buzdolabından çıkarılmıştır. Üreme gözlenmeyen, birden fazla tipte veya 100.000 CFU/ml’den az sayıda mikroorganizma üremesi gözlenen idrar örnekleri çalışma dışı bırakılmıştır.

Yöntem optimizasyonu:

Yöntem optimizasyonu için, Kim ve arkadaşlarının (5) tanımladığı yöntem esas alınmıştır. Bu yöntem, idrarın santrifüj basamakları ve sodyum dodesil sülfat (SDS) (Roche, Amerika Birleşik Devletleri) ile muamelesi sonrası MALDI-TOF MS ile test edilmesi prensibine dayanır.

Yöntem aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. 3 ml idrar örneği 2.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilir. Süpernatant başka bir ependorfa alınır.
2. Süpernatant 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pellet deiyonize suyla yıkanır. Bu işlem pelletin bulunduğu ependorfa deiyonize su eklenip 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek yapılır.

3. 1,5 ml %0,1 SDS ilave edilip 37 °C’de 10 dakika inkübe edilir. 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. Deiyonize suyla yukarıda belirtildiği gibi yıkanır.
4. Pelletten 8-10 mikrolitre alınıp targeta yayılır. Kuruması beklenir. Matrix damlatılıp kuruması beklenir. MALDI-TOF MS cihazıyla test edilmek üzere cihaza yerleştirilir (5).

Optimizasyon için sırasıyla aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir:

- 1.Çalışmaya alınan idrar örneğinin miktarının sonuca etkisi araştırılmıştır. Bunun için, referans çalışmada kullanıldığı gibi 3ml, eş zamanlı olarak 1.5 ve 5 ml idrar test edilmiştir.
- 2.Çalışmada kullanılan SDS konsantrasyonunun sonuca etkisi araştırılmıştır. Bunun için, referans çalışmada kullanıldığı gibi %0.1, eş zamanlı olarak %1 oranlarında SDS kullanılmıştır.
- 3.Çalışmaya alınan örneğin MALDI-TOF MS ile test edilmeden önce ekstraksiyon işlemi yapılmasının sonuca etkisi araştırılmıştır. Bunun için örnek, referans çalışmada olduğu gibi herhangi bir ekstraksiyon yapmadan ve eş zamanlı olarak formik asit ekstraksiyonu ve etanol-formik asit ekstraksiyonu sonrası test edilmiştir.
- 4.Çalışmada kullanılan deterjan etkili maddenin sonuca etkisi araştırılmıştır. Bunun için, referans çalışmada kullanılan SDS, Tween-80 (Merck, Almanya) ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir.
- 5.Çalışma öncesinde idrar örneğinin inkübe edilmesinin sonuca etkisi araştırılmıştır. Bunun için, örnekler esas alınan yöntemle karşılaştırmalı olarak 37°C etüvde 30 dakika inkübasyon sonrası test edilmiştir.

Optimize edilen yöntem kullanılarak idrar örneklerinin test edilmesi:

İkinci basamakta; laboratuvarımıza rutin olarak gönderilen ve Gram boyama sonucunda tek morfolojide mikroorganizma görülen 100 idrar örneği kültürle eş zamanlı olarak ilk basamakta optimize edilen yöntem kullanılarak direkt olarak MALDI-TOF MS ile test edilmiş ve elde edilen bulgular kültür sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Optimizasyon basamaklarından sonra Kim ve arkadaşlarının yöntemine formik asit ekstraksiyonu eklenmiştir. Bu yöntem, aşağıdaki basamaklardan oluşmuştur:

1.3 ml idrar örneği 2.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilir. Süpernatant başka bir ependorfa alınır.

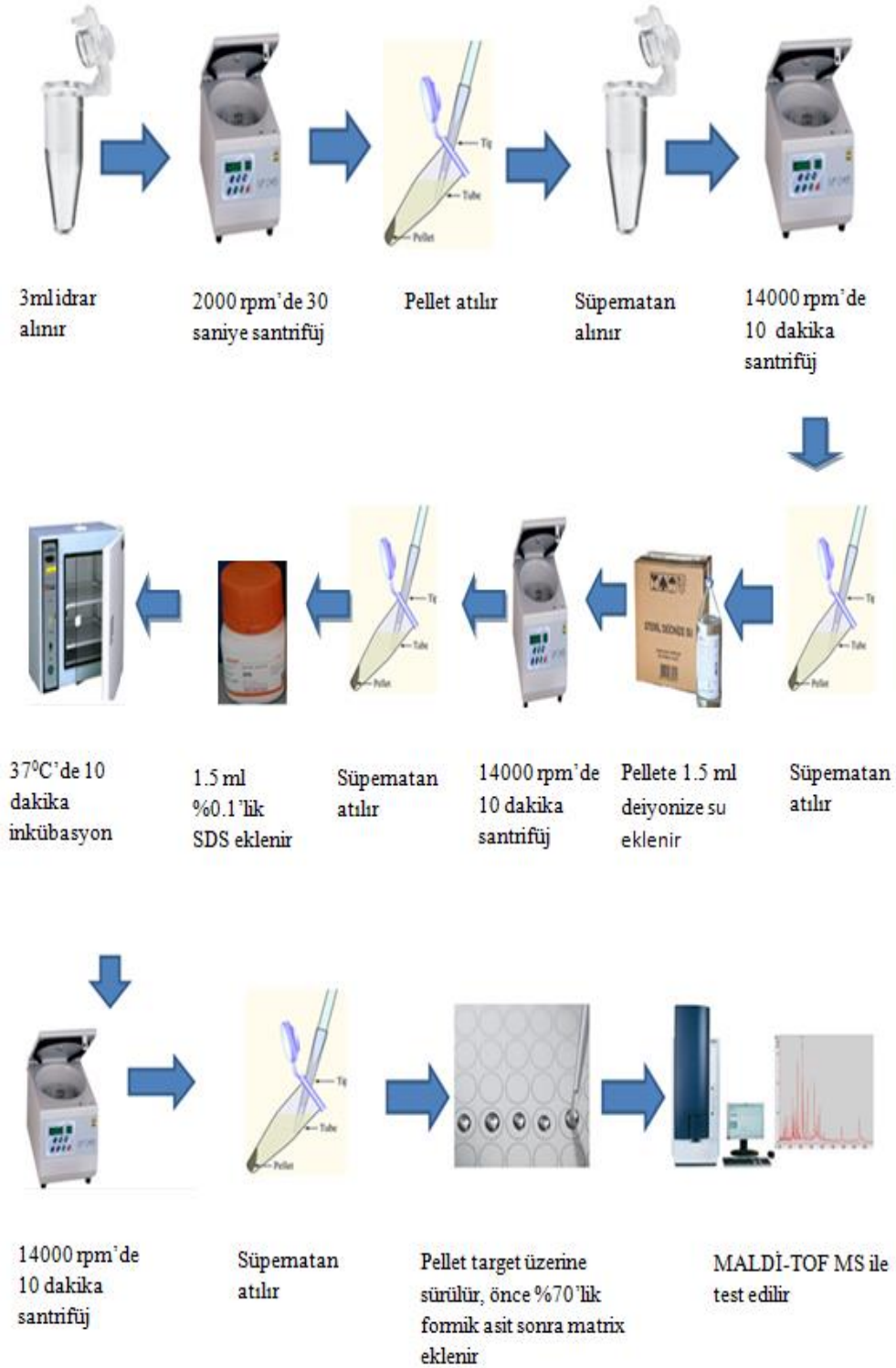
2.Süpernatant 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pellet deiyonize suyla yıkanır. Bu işlem, pelletin bulunduğu ependorfa deiyonize su eklenip 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantın atılarak yapılır.

3.1,5 ml %0,1 SDS ilave edilip 37 °C’de 10 dakika inkübe edilir. 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir. Deiyonize suyla yukarıda belirtildiği gibi yıkanır.

4.Pelletten 8-10 mikrolitre alınıp targeta yayılır. 3 µl %70’lik formik asit eklenip kuruması beklenir. Matrix damlatılıp kuruması beklenir. MALDI-TOF MS cihazıyla test edilmek üzere cihaza yerleştirilir.

Optimize yöntemin basamakları Şekil.1’de özetlenmiştir.

Şekil 1. Optimize yöntemin basamakları



MALDI-TOF MS ile değerlendirme:

MALDI-TOF MS ile değerlendirme için Bruker Microflex LT model FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics, Almanya) yazılımı kullanılmıştır. Lineer pozitif iyon modunda, 2000-20.000 Da ktle aralığında, mikroorganizma tanımlama için optimize edilmiş uygun yöntemle lmler gerçekleştirilmiştir. İyon kaynağı olarak 340 nm'de 60 Hz frekansında nitrojen lazer kullanılmıştır. Spektrumların elde edilmesinde her bir örnek için, toplamda 240 olacak şekilde 40'arlı paketlerden oluşan lazer atışları gerçekleştirilmiştir.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Araştırmanın amacı doğrultusunda birbiri ile ilişkili ölçümleri karşılaştırmak için McNemar ve Cochran's Q testleri kullanılmıştır. Bağımsız lmleri karşılaştırmak için ise Ki-kare (χ^2) analizi gerçekleştirilmiştir. İdrar örneklerinde tanımlanan mikroorganizmalar yüzde ve frekans hesaplamaları ile incelenmiş ve raporlanmıştır. SPSS 22.0 istatistik paket programı kullanılarak veriler analiz edilmiştir. Analiz sonuçları %95 güven düzeyinde ele alınmış ve $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada Nisan 2016-Aralık 2016 tarihlerinde toplam 600 idrar örneği test edilmiştir.

4.1 Yöntem Optimizasyon Aşamasında Elde Edilen Sonuçlar

4.1.1 İdrar örneği miktarının sonuca etkisi

1,5, 3 ve 5 ml idrar örneği kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Farklı miktarlarda idrar örneği kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları

Kültürde üreyen mikroorganizma	Sayı	İdrar miktarı (ml)		
		1,5	3	5
<i>E. cloacae</i>	1	1	1	1
<i>E. faecalis</i>	2	-	-	-
<i>E. coli</i>	82	42	67	69
<i>K.pneumoniae</i>	14	8	11	11
<i>P. mirabilis</i>	1	1	1	1
Toplam	100	52	80	83

İdrar miktarlarına göre, idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9. İdrar miktarlarına göre, idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması

	Sonuç	
	Tanımlanmadı	Tanımlandı
1.5 ml	%48	%52
3 ml	%20	%80
5 ml	%17	%83

Örnek miktarlarına göre alınan sonuçlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. 1,5 ml örneğinin tanımlanma oranı, 3 ml ve 5 ml örneklerinden istatistiksel olarak anlamı düşük bulunmuştur ($p < 0,001$, Kappa=0,426).

3 ml idrar örneği kullanımı, ile 1,5 ml idrar örneği kullanımının mikroorganizmaların tanımlanması ve tanımlanmaması açısından arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$, Kappa=0,363). 3 ml idrar örneği kullanımında tanımlama oranları anlamlı olarak yüksek saptanmıştır.

5 ml idrar örneği kullanımı 1,5 ml idrar örneği kullanımına göre mikroorganizmaların tanımlanması ve tanımlanmaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,375$, Kappa=0,826).

3 ml ve 5 ml örneklerinin tanımlama oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,001$). 3ml ve 5 ml idrar örneği kullanıldığında tanımlanma oranı birbirine yakındır.

1,5, 3 ve 5 ml idrar örneği kullanımında MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenme sonuçları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Farklı miktarlarda idrar örneği kullanımında MALDI-TOF MS ile tanımlanabilen mikroorganizma sayıları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkinin incelenmesi

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n(%)				
Lökosit yoğunluğu	Sayı	İdrar miktarı(ml)		
		1.5	3	5
BL	51	20 (39,2)	37 (72,5)	39 (76,5)
OL VE AL	33	20 (60,6)	28 (84,8)	29 (87,9)
NL	16	12 (75)	14 (87,5)	14 (87,5)
Toplam	100	52 (100)	79 (100)	82 (100)

BL, bol lökosit; OL, orta lökosit; AL, az lökosit; NL, nadir lökosit

1.5 ml idrar miktarı kullanıldığında lökosit yoğunluğu azaldıkça, mikroorganizmaların tanımlanma oranı artmaktadır ($\chi^2=7,71$; $p<0,05$).

3 ml idrar örneği kullanıldığında bol, orta ve az, nadir lökosit varlığında, mikroorganizmaların tanımlanma oranları birbirine oldukça yakındır ($\chi^2=2,67$; $p>0,05$).

5 ml idrar örneği kullanıldığında bol, orta ve az, nadir lökosit varlığında, mikroorganizmaların tanımlanma oranları birbirine oldukça yakındır ($\chi^2=2,16$; $p>0,05$).

1,5, 3 ve 5 ml idrar örneği kullanılarak MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Farklı miktarlarda idrar örneği kullanılarak MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n(%)				
Koloni sayısı (CFU/ml)	Sayı	İdrar miktarı (ml)		
		1.5	3	5
100.000	27	1 (3,7)	8 (25,9)	10 (37)
1.000.000	30	8 (26,7)	29 (96,7)	29 (96,7)
>1.000.000	43	43 (100)	43 (100)	43 (100)
Toplam	100	52 (100)	80 (100)	83 (100)

İdrarda bulunan mikroorganizmaların koloni sayısı arttıkça, 1.5 ml idrar kullanımı durumunda mikroorganizmaların tanımlanma oranının da arttığı anlaşılmıştır ($\chi^2=72,64$; $p<0,01$).

İdrar örneği içindeki mikroorganizmaların koloni sayıları arttıkça, 3 ml idrar kullanımı durumunda mikroorganizmaların tanımlanma oranının arttığı anlaşılmıştır ($\chi^2=62,92$; $p<0,01$).

İdrar örneğindeki mikroorganizmanın koloni sayısı arttıkça 5 ml idrar kullanıldığında mikroorganizmaların tanımlanma oranının arttığı anlaşılmıştır ($\chi^2=62,92$; $p<0,01$).

MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu olarak tanımlanan mikroorganizmaların idrar miktarlarına göre dağılımı Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanan mikroorganizmaların idrar miktarlarına göre dağılımı

İdrar Miktarı	Mikroorganizma	Sayı (n)
1.5 ml	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>E. coli</i>	42
	<i>K. pneumoniae</i>	8
	<i>P. mirabilis</i>	1
	Tanımlanmadı	48
3 ml	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>E. coli</i>	66
	<i>K. pneumoniae</i>	11
	<i>P. mirabilis</i>	1
	Tanımlanmadı	21
5 ml	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>E. coli</i>	69
	<i>K. pneumoniae</i>	11
	<i>P. mirabilis</i>	1
	Tanımlanmadı	18

4.1.2 Çalışmada kullanılan SDS konsantrasyonunun sonuca etkisi

%0.1 ve %1 konsantrasyonlarda SDS kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Farklı konsantrasyonlarda SDS kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları (n)			
Kültür	Sayı	%0.1 SDS	%1 SDS
<i>A.baumannii</i>	1	-	-
<i>E. coli</i>	79	64	57
<i>E. cloacae</i>	2	-	-
<i>E. faecalis</i>	3	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	14	12	12
<i>S. liquefaciens</i>	1	-	-
Toplam	100	77	70

%0.1 ve %1 konsantrasyonlarda SDS kullanılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması Tablo 14’te gösterilmiştir.

Tablo 14. Farklı SDS konsantrasyonlarına göre idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile direkt mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları (n)		
%0.1 SDS	% 1 SDS	
	Tanımlanmadı	Tanımlandı
Tanımlanmadı	18	5
Tanımlandı	12	65

McNemar Test $p>0,05$

İdrar örneklerinde mikroorganizmaların tanımlanması ve tanımlanmaması, SDS konsantrasyon oranlarına göre anlamlı olarak farklılaşmamaktadır ($p>0,05$).

%0.1 ve %1 SDS konsantrasyonunda MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenme sonuçları Tablo 15’te gösterilmiştir.

Tablo 15. %0.1 ve %1 SDS konsantrasyonunda MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)			
Lökosit yoğunluğu	Sayı	SDS konsantrasyonu	
		%0.1 SDS	%1 SDS
BL	43	36 (83,7)	33 (76,7)
OL	27	22(81,5)	21 (78,8)
AL	11	6 (54,5)	4 (36,4)
NL	19	13 (68,4)	12 (63,2)
Toplam	100	77 (100)	70 (100)

BL, bol lökosit; OL, orta lökosit; AL, az lökosit; NL, nadir lökosit

%0.1 SDS konsantrasyonu kullanıldığında bol, orta, az ve nadir lökosit varlığında mikroorganizmaların tanımlanma oranları birbirine yakındır ($\chi^2=5,32$; $p>0,05$).

%1 SDS konsantrasyonunda mikroorganizmaların tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunlukları arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($\chi^2=8,059$; $p\leq 0,05$). Az lökosit varlığında tanımlama oranları anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

%0.1 ve %1 SDS konsantrasyonunda MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16. Farklı SDS konsantrasyonlarında MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)			
Koloni sayısı (CFU/ml)	Sayı	SDS konsantrasyonu	
		%0.1 SDS	%1 SDS
100.000	24	10 (10,3)	7 (32)
1.000.000	40	36 (89,7)	31 (76,9)
>1.000.000	36	31 (86,1)	32 (88,9)
Toplam	100	77 (100)	70 (100)

%0.1 konsantrasyonda SDS kullanıldığında, 1.000.000 CFU/ml ve >1.000.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinde, mikroorganizmaların tanımlanma oranı anlamlı olarak daha yüksektir ($\chi^2=20,636$; $p<0,01$).

%1 konsantrasyonda SDS kullanıldığında, idrar örneklerindeki mikroorganizmaların koloni sayıları arttıkça, %1 SDS konsantrasyonunda mikroorganizmaların tanımlanma oranı anlamlı olarak artmaktadır ($\chi^2=24,20$; $p<0,01$).

MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu olarak tanımlanan mikroorganizmaların SDS konsantrasyonlarına göre dağılımı Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17. MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların SDS konsantrasyonlarına göre dağılımı

Konsantrasyon	Mikroorganizma	Sayı (n)
%0.1 SDS	<i>E. coli</i>	64
	<i>E. faecalis</i>	1
	<i>K. pneumoniae</i>	12
	Tanımlanmadı	23
%1 SDS	<i>E. coli</i>	57
	<i>E. faecalis</i>	1
	<i>K. pneumoniae</i>	12
	Tanımlanmadı	30

4.1.3 Çalışmada kullanılan deterjan etkili maddenin sonuca etkisi

%0.1 SDS ve Tween-80 kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18. Farklı deterjan etkili maddeler kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n			
Kültür	Sayı	%0.1 SDS	Tween-80
<i>A.baumannii</i>	1	-	-
<i>E. coli</i>	69	57	57
<i>E. asburiae</i>	1	1	1
<i>E. cloacae</i>	2	1	1
<i>E. faecalis</i>	5	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	20	19	19
<i>P. aeruginosa</i>	1	1	1
<i>P. mirabilis</i>	1	1	1
Toplam	100	80	80

%0.1 SDS ve Tween-80 kullanılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması Tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19. %0.1 SDS ve Tween-80 kullanılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması

Tween-80	%0.1 SDS	
	Tanımlanmadı	Tanımlandı
Tanımlanmadı	18	2
Tanımlandı	1	79

McNemar Test $p>0,05$

Tabloya göre, idrar örneklerinde mikroorganizmaların tanımlanması ve tanımlanmaması durumları Tween-80 ve % 0.1 SDS konsantrasyonlarına göre farklılaşmamaktadır ($p>0,05$).

%0.1 SDS ve Tween-80 kullanılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenme sonuçları Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20. Farklı deterjan etkili maddeler kullanılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmalar ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)			
Lökosit yoğunluğu	Sayı	Deterjan etkili madde	
		%0.1 SDS	Tween-80
BL	40	35(87,5)	35 (87,5)
OL	46	33 (71,7)	33 (71,7)
AL ve NL	14	13 (92,9)	12 (85,7)
Toplam	100	81 (100)	80 (100)

BL, bol lökosit; OL, orta lökosit; AL, az lökosit; NL, nadir lökosit

%0.1'lik SDS kullanıldığında mikroorganizmaların tanımlanması, lökosit yoğunluğu ile anlamlı bir şekilde değişmemektedir ($\chi^2=4,94$; $p>0,05$).

Tween-80 kullanıldığında, örneğin lökosit yoğunluğuyla mikroorganizmaların tanımlanma oranları anlamlı olarak değişmemektedir ($\chi^2=3,654$; $p>0,05$).

%0.1 SDS ve Tween-80 kullanılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 21'de gösterilmiştir.

Tablo 21. Farklı deterjan etkili maddeler kullanılarak MALDI-TOF MS ile direkt mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)			
Koloni sayısı (CFU/ml)	Sayı	Deterjan etkili madde	
		%0.1 SDS	Tween-80
100.000	28	12 (42.9)	10 (35,7)
1.000.000	43	42 (97,7)	42 (97,7)
>1.000.000	29	27 (93.1)	28 (96.5)
Toplam	100	81 (100)	80 (100)

%0.1'lik SDS kullanıldığında, 1.000.000 CFU/ml ve >1.000.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinde, mikroorganizmaların tanımlanma oranı anlamlı olarak daha yüksektir ($\chi^2=47,68$; $p<0,01$).

Tween-80 kullanıldığında, aynı şekilde 1.000.000 CFU/ml ve >1.000.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinde, mikroorganizmaların tanımlanma oranı anlamlı olarak daha yüksektir ($\chi^2=36,998$; $p<0,01$).

MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu olarak tanımlanan mikroorganizmaların Tween-80 ve %0.1'lik SDS kullanımına göre dağılımı Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 22. MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu olarak tanımlanan mikroorganizmaların Tween-80 ve %0.1'lik SDS kullanımına göre dağılımı

	Mikroorganizma	Sayı (n)
Tween-80	<i>E. coli</i>	57
	<i>E. asburiae</i>	1
	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>K. pneumoniae</i>	19
	<i>P. mirabilis</i>	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1
	Tanımlanmadı	20
%0.1 SDS	<i>E. coli</i>	57
	<i>E. asburiae</i>	1
	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>K. pneumoniae</i>	19
	<i>P. mirabilis</i>	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1
	Tanımlanmadı	20

4.1.4 Çalışmaya alınan örneğe ekstraksiyon işlemi yapılmasının sonuca etkisi

Ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu yapılarak ve etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 23'te gösterilmiştir

Tablo 23. Ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu yapılarak ve etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)				
Kültür	Sayı	Ekstraksiyon yok	Formik asit ekstraksiyonu	Etanol-formik asit ekstraksiyonu
<i>A. baumannii</i>	1	1	1	1
<i>E. aerogenes</i>	1	1	1	-
<i>E. asburiae</i>	1	-	-	-
<i>E. coli</i>	69	58	63	61
<i>E. faecalis</i>	4	-	2	3
<i>K. pneumoniae</i>	19	16	18	17
<i>P. mirabilis</i>	2	1	1	1
<i>S. aureus</i>	1	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	2	-	-	-
<i>Toplam</i>	100	77	86	83

Ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu yapılarak ve etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması Tablo 24'te gösterilmiştir.

Tablo 24. Ekstraksiyon yöntemlerine göre idrar örneklerinde MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması

	Sonuç	
	Tanımlanmadı	Tanımlandı
Ekstraksiyon yok	23%	77%
Formik asit	14%	86%
Etanol-formik asit	17%	83%

(Q=8,4; p<0,05)

Ekstraksiyon yöntemlerine göre alınan sonuçlar karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Q=8,4; p<0,05).

Ekstraksiyon yapılmayan idrar örneklerinde mikroorganizmaların tanımlanmadığı numunelerin birçoğunda (n=10) formik asit ekstraksiyonu ile mikroorganizma tanımlanabilmiştir (p<0,05).

Ekstraksiyon yapılmayan idrar örneklerinde mikroorganizmaların tanımlanmadığı numunelerin birçoğunda (n=9) etanol-formik asit ekstraksiyonu ile mikroorganizma tanımlanabilmiştir (p<0,05).

Etanol-formik asit ekstraksiyonuna göre formik asit ekstraksiyonu ile mikroorganizma tanımlanma oranı anlamlı olarak yüksektir (p<0,05).

Ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu yapılarak ve etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının idrardaki lökosit yoğunluğu ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 25'te gösterilmiştir.

Tablo 25. Ekstraksiyon işlemine göre MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)				
Lökosit yoğunluğu	Sayı	Ekstraksiyon işlemi		
		Ekstraksiyon yok	Formik asit ekstraksiyonu	Etanol-formik asit ekstraksiyonu
BL	49	35 (71,4)	40 (81,6)	38 (77,6)
OL ve AL	51	42 (82,4)	46 (90,2)	45 (88,2)
Toplam	100	77 (100)	86 (100)	83 (100)

BL, bol lökosit; OL, orta lökosit; AL, az lökosit; NL, nadir lökosit

Ekstraksiyon yapılmadığı durumda idrar örneğinin direkt tanımlanma oranları ile lökosit yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($\chi^2=1,684$; $p>0,05$).

Formik asit ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı durumda idrar örneğinin direkt tanımlanma oranları ile lökosit yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($\chi^2=1,522$; $p>0,05$).

Etanol-formik asit ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı durumda idrar örneğinin direkt tanımlanma oranları ile lökosit yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($\chi^2=2,02$; $p>0,05$).

Ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu yapılarak ve etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 26'da gösterilmiştir.

Tablo 26. Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak MALDI-TOF MS ile mikroorganizma tanımlama oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)				
Koloni sayısı Sayı (CFU/ml)	Sayı	Ekstraksiyon yok	Formik asit ekstraksiyonu	Etanol-formik asit ekstraksiyonu
100.000	35	16 (76,9)	24 (88,5)	20
1.000.000	26	24 (76,9)	24 (92)	25
>1.000.000	39	37 (77,1)	38 (97,4)	38
Toplam	100	77	86	83

Ekstraksiyon yapılmadığı durumda, idrar örneğinin direkt tanımlanma oranları koloni sayılarına göre anlamlı olarak değişmemektedir ($\chi^2=0,001$; $p>0,05$).

Formik asit ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı durumda idrar örneğinin direkt tanımlanma oranları koloni sayıları ile anlamlı olarak farklılaşmamaktadır ($\chi^2=1,631$; $p>0,05$).

Etanol-formik asit ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı durumda mikroorganizmaların tanımlanma oranları ile koloni sayıları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($\chi^2=0,798$; $p>0,05$).

MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu olarak tanımlanan mikroorganizmaların ekstraksiyon yöntemlerine göre Tablo 27’de gösterilmiştir.

Tablo 27. Tanımlanan mikroorganizmaların ekstraksiyon yöntemlerine göre dağılımı

İdrar Miktarı	Mikroorganizma	Sayı (n)
Ekstraksiyon yok	<i>A. baumannii</i>	1
	<i>E. coli</i>	58
	<i>E. aerogenes</i>	1
	<i>K.pneumoniae</i>	16
	<i>P. mirabilis</i>	1
	Tanımlanmadı	23
Formik asit	<i>A. baumannii</i>	1
	<i>E. aerogenes</i>	1
	<i>E. coli</i>	63
	<i>E. faecalis</i>	2
	<i>K.pneumoniae</i>	18
	<i>P. mirabilis</i>	1
	Tanımlanmadı	14
Etanol-formik asit	<i>A. baumannii</i>	1
	<i>E. coli</i>	61
	<i>E. faecalis</i>	3
	<i>K.pneumoniae</i>	17
	<i>P. mirabilis</i>	1
	Tanımlanmadı	17

4.1.5 Çalışma öncesinde idrar örneğinin inkübe edilmesinin sonuca etkisi

İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 28’de gösterilmiştir

Tablo 28. İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile tanımlanan mikroorganizmaların kültür ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları (n)			
Kültür	Sayı	30 dak etüv	Etüv yok
<i>E. cloacae</i>	2	1	1
<i>E. faecalis</i>	6	1	1
<i>E. coli</i>	69	58	58
<i>K. pneumoniae</i>	23	21	21
Toplam	100	81	81

İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması Tablo 29’da gösterilmiştir.

Tablo 29.İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanıp tanımlanmama durumlarının karşılaştırılması

30 dk etüv	Etüv yok	
	Tanımlanmadı	Tanımlandı
Tanımlanmadı	19	0
Tanımlandı	0	81

McNemar Test $p>0,05$

İdrar örneklerinin direkt olarak tanımlanması, 30 dakika etüvde bekletilmemesine göre anlamlı olarak farklılaşmamaktadır ($p>0,05$). 30 dakika etüvde bekletilen ve etüvde bekletilmeyen örneklerden elde edilen sonuçlar birbiri ile tamamen örtüşmektedir.

İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi Tablo 30’da gösterilmiştir.

Tablo 30. İdrar örneğinin işlem öncesi inkübe edildiği ve edilmediği durumda MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanması ile lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)			
Lökosit yoğunluğu	Sayı	30 dakika inkübasyon	İnkübasyon yok
BL	45	37 (82,2)	37 (82,2)
OL	39	33 (84,6)	33 (84,6)
AL ve NL	16	11 (68,8)	11 (68,8)
Toplam	100	81	81

BL, bol lökosit; OL, orta lökosit; AL, az lökosit; NL, nadir lökosit

30 dakika inkübe edilen ve edilmeyen örneklerde idrar örneğinin direkt tanımlanma oranları birbirine yakındır ($\chi^2=1,94$; $p>0,05$).

İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 31’de gösterilmiştir.

Tablo 31. İdrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda MALDI-TOF MS ile tanımlanma oranlarının kültürdeki koloni sayısı ile karşılaştırmalı sonuçları

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları n (%)			
Koloni sayısı	Sayı	30 dak etüv	Etüv yok
(CFU/ml)			
100.000	14	3 (21,4)	3 (21,4)
1.000.000	35	28 (80)	28 (80)
>1.000.000	51	50 (98)	50 (98)
Toplam	100	81	81

30 dakika inkübe edilen ve direkt işleme alınan idrar örneklerinde, koloni sayısı arttıkça direkt tanımlanma oranının da arttığı belirlenmiştir ($\chi^2=41,93$; $p<0,01$).

Tanımlanan mikroorganizmaların idrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda dağılımı Tablo 32’de gösterilmiştir.

Tablo 32. Tanımlanan mikroorganizmaların idrar örneğinin direkt kullanıldığı ve işlem öncesi inkübe edildiği durumda dağılımı

Etüv	Mikroorganizma	Sayı (n)
30 dk etüv	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>E. coli</i>	58
	<i>E. faecalis</i>	1
	<i>K.pneumoniae</i>	21
Etüv yok	<i>E. cloacae</i>	1
	<i>E. coli</i>	58
	<i>E. faecalis</i>	1
	<i>K.pneumoniae</i>	21

Birinci aşama sonrasında:

1. Çalışmaya alınan idrar örneğinin miktarı değerlendirildiğinde; 3 ml ve 5 ml idrar örneği ile benzer şekilde ve 1.5 ml’den daha iyi sonuç alındığı görülmüş, bir sonraki aşama için kullanılacak idrar örneği miktarı 3 ml olarak belirlenmiştir.
2. Çalışmada kullanılan SDS konsantrasyonu değerlendirildiğinde; %0.1 ve %1 SDS konsantrasyonları için benzer sonuç alındığı görülmüş, bir sonraki aşama için kullanılacak SDS konsantrasyonu %0.1 olarak belirlenmiştir.
3. Çalışmada kullanılan deterjan etkili madde değerlendirildiğinde; SDS ve Tween-80 için benzer sonuç alındığı görülmüş, , bir sonraki aşama için kullanılacak deterjan etkili madde SDS olarak belirlenmiştir.
4. Çalışmaya alınan örneğe ekstraksiyon işlemi yapılması değerlendirildiğinde; formik asit ve etanol formik asit ekstraksiyonu ile ekstraksiyon yapılmadığı durumdan

daha iyi sonuç alındığı görülmüş, bir sonraki aşama için formik asitle ekstraksiyon yapılması kararlaştırılmıştır.

5. Çalışma öncesinde idrar örneğinin inkübe edilmesi değerlendirildiğinde; örneğin direkt işleme alınması ile 37°C etüvde 30 dakika inkübasyon sonrası işleme alınması için benzer sonuç alındığı görülmüş, bir sonraki aşamada örneğin direkt işleme alınması kararlaştırılmıştır.

4.2 Optimize Yöntem Kullanılarak İdrar Örneklerinin Direkt Olarak MALDI-TOF MS İle Test Sonuçları

Laboratuvarımıza rutin olarak kültür yapılmak üzere gönderilen ve Gram boyama sonucunda tek tip morfolojide mikroorganizma görülen 100 idrar örneğinin ilk basamakta laboratuvar şartlarımıza göre optimize edilen yöntem kullanılarak MALDI-TOF MS ile test edildiği ikinci aşamada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Bu aşamada kültürde 100.000 CFU/ml saf bakteri üremesi olan tüm idrar örnekleri için Gram boyama ile kültürle uyumlu olarak tek tip morfolojide bakteri görülmüştür.
- Gram boyama ile tek tip morfolojide bakteri görülen bir idrar örneğinde kültürde 10.000 CFU/ml saf bakteri üremesi olmuştur.
- Gram boyama sonucunda tek tip morfolojide mikroorganizma görülen idrar örneklerinin MALDI-TOF MS ile test edilmesi sonucu tanımlanan mikroorganizmaların kültürle karşılaştırmalı sonuçları Tablo 33'te gösterilmiştir.

Tablo 33. İdrar örneklerinin MALDI-TOF MS ile test edilmesi sonucu tanımlanan mikroorganizmaların kültürle karşılaştırmalı sonuçları.

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları (n)		
Mikroorganizma	Kültür	MALDI-TOF MS
	n	n
<i>E. faecalis</i>	2	-
<i>E. faecium</i>	3	2
<i>E. aerogenes</i>	4	4
<i>E. cloacae</i>	2	1
<i>E. coli</i>	65	54
<i>K. pneumoniae</i>	15	12
<i>P. aeruginosa</i>	3	1
<i>P. mirabilis</i>	2	1
<i>S. marcescens</i>	1	-
Üreme olmadı	3	-
Toplam	100	75

Tablo 34. MALDI-TOF MS ile direkt tanımlama ile idrardaki lökosit yoğunluğu arasındaki ilişkilerin incelenmesi

MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilen mikroorganizma sayıları (n)		
Lökosit yoğunluğu	Sayı	MALDI-TOF MS
BL	59	43
OL	27	20
AL ve NL	14	12
Toplam	100	75

BL, bol lökosit; OL, orta lökosit; AL, az lökosit; NL, nadir lökosit

İdrar örneklerinin direkt tanımlanması ile lökosit yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($\chi^2=1,01$; $p>0,05$).

Bakterilerin Gram boyama özelliklerine göre MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanma sayılarının incelenmesi Tablo.35'te gösterilmiştir.

Tablo 35. Bakterilerin Gram boyama özelliklerine göre MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanma sayılarının incelenmesi

	MALDI-TOF MS ile tanımlanan	Tanımlama yapılamadı	Toplam
Gram negatif	73	19	92
Gram pozitif	2	3	5
Üreme olmadı	0	3	3
Toplam	75	25	100

MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma sonuçlarının koloni sayılarına göre dağılımı Tablo 36'da gösterilmiştir.

Tablo 36. MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma sonuçlarının koloni sayılarına göre dağılımı

Koloni sayısı (CFU/ml)	Kültür sonucu n	MALDI-TOF MS ile tanımlama sonucu n
0	3	-
10.000	1	-
100.000	11	-
1.000.000	29	21
>1.000.000	56	54
Toplam	100	75

Gram boyama ile tek tip morfolojide mikroorganizma görülen idrar örneklerinin %75'i MALDI-TOF MS ile direkt olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmaların 3'ü *E. faecium*, 4'ü *E. aerogenes*, 1'i *E. cloacae*, 54'ü *E. coli*, 12'si *K. pneumoniae*, 1'i *P. aereginosa*, 1'i *P. mirabilis* olarak doğru bir şekilde tanımlanmıştır.

MALDI-TOF MS ile kültürle uyumlu mikroorganizma tanımlanma ve tanımlanmama durumları ile kültürdeki koloni sayıları arasındaki ilişkilerin incelenmesi Tablo 35'te gösterilmiştir.

100.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinin %72,4'ünde ise mikroorganizma tanımlanmıştır. 1.000.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinin %94,6'sında ise mikroorganizma tanımlanmıştır. >1.000.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinin ise %100'ünde mikroorganizma tanımlanmamıştır. İdrar örneklerinin tanımlanması ile koloni sayıları arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($\chi^2=49,28$; $p<0,01$). Koloni sayıları arttıkça idrar örneklerinin direkt tanımlanma oranı daha artmaktadır.

TARTIŞMA

Enfeksiyon hastalıkları içerisinde önemli bir yere sahip olan ÜSE, önemli mortalite ve morbidite sebebi olarak tüm dünyada yaygın görülmektedir. Zaman içinde yaygın olarak kullanılmakta olan antibakteriyellere direnç gelişimi artmakla beraber ÜSE etkenlerinin sıklığı belirgin bir şekilde değişmemektedir. Ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalarda en sık etken *Enterobacteriaceae* ailesi olmakla beraber, aile içinde en sık görülen etken *E. coli* 'dir (83-85).

Chlabics ve arkadaşlarının (83) 18-65 yaş arasında, komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonu bulunan 119 hastayı dahil ettikleri çalışmalarında, en sık etken *E. coli* olarak (%75.6) tespit edilmiş olup, bunu takip eden etkenler *Staphylococcus spp.* (%7.6), *P. mirabilis* (%3.4) ve *K. pneumoniae* (%2.5) olarak belirlenmiştir.

Bayraktar ve arkadaşlarının (86) yatan ve ayaktan hastalarla yaptıkları çalışmalarında; en sık etken olarak *E. coli* (%63.7) saptanmış olup, diğer etkenler sırasıyla *Klebsiella spp.* (%16.8), *Enterobacter spp.* (%8), ve *Proteus spp.* (%7.3) olarak gözlenmiştir. Arslan ve arkadaşlarının (87) yaptıkları çalışmada komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarında en sık etken olarak *Enterobacteriaceae* grubu bakteriler saptanmış olup *E. coli* (%90), *Klebsiella spp.* (%8) ve *Proteus spp.* (%1) ve *Enterobacter spp.* (%1) en sık üreyen mikroorganizmalar olarak bildirilmiştir.

Rifaioğlu ve arkadaşları (88) 2005-2008 yılları arasında hastanelerindeki ÜSE etkenlerinin antibiyotik duyarlılıklarındaki değişimleri inceledikleri çalışmalarında; kültür sonuçlarına göre en sık üreyen mikroorganizma *E. coli* (% 67,2) olmakla birlikte, diğer etkenleri sırasıyla *Proteus spp.* (% 7,5), *K. pneumoniae* (% 3,9) ve *P. aeruginosa* (% 3,2) olarak bildirmiştir. Bizim çalışmamızda tüm idrar örneklerinden (n=600) elde edilen izolatların dağılımında ulusal ve uluslararası verilerle uyumlu olarak *E. coli* (%72,2) en sık izole edilen mikroorganizmadır.

Üriner sistem enfeksiyonlarında etken mikroorganizmanın kan dolaşımına geçme ve sepsise neden olma riski nedeniyle etkenin erken tespiti önemlidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geleneksel yöntemlerle enfeksiyon etkenlerinin tanımlaması için 24- 72 saate gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda klinik tanı laboratuvarlarında kullanıma giren MALDİ-TOF MS cihazı, kültürde üreyen mikroorganizma kolonilerinden dakikalar içinde büyük oranda tanımlama yapabilmektedir. Bakterilerin

tanımlanması amacıyla ilk kez 1975 yılında Anhalt ve Fenselau (89) tarafından kullanılan MALDI-TOF MS cihazının rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanıma girmesi henüz çok yenidir. Bu fenotipik mikroorganizma tanımlama sistemin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanması, uygulama kolaylığının yanında maliyeti azaltmakta ve zamandan tasarruf sağlamaktadır (10). Bu sistemlerin kurulum maliyetleri yüksek ancak örnek başına test maliyetleri oldukça düşüktür. MALDI-TOF MS'in gram pozitif ve gram negatif bakterilerin cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir (90). Güncel çalışmalarda, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tanısı oldukça zor olan filamentöz mantarlar ve dermatofitlerde de umut verici sonuçlar alındığı belirtilmektedir (91). MALDI-TOF MS ile antimikrobiyal duyarlılığın henüz belirlenememesiyle birlikte, antibiyotik direncinin hızlı saptanmasıyla ilgili çalışmalar da devam etmektedir (92).

Son yıllarda, MALDI-TOF MS'in sunduğu hızlı tanı imkanıyla kan ve idrar gibi klinik örneklerden direkt etken mikroorganizmanın tanımlaması yapılarak uygun tedaviye katkıda bulunmak mümkün olmuştur. Klinik örneğin direkt test edilmesi için henüz standart bir protokol bulunmasa da yapılan çalışmalar bu alanda önemli ölçüde yol alınmasını sağlamıştır (5-9, 11, 79, 81, 82, 93).

Tıbbi teknolojiadaki gelişmeler, altta yatan hastalığı olanlarda yaşam süresini uzatırken artan invaziv girişimler nedeniyle de enfeksiyon riskini ve böylece sepsis gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonların görülme sıklığında artışına neden olmuştur. Sepsis etyolojisini saptamak için kan kültürü ve primer odaktan kültürlerle erken tanı, tedavi başarısını artırmaktadır (94). Kan kültüründe pozitif sinyal alınmadan itibaren subkültür ve antimikrobiyal duyarlılık testleri için 48-72 saat ek süre gerekmektedir MALDI-TOF MS sistemiyle pozitif sinyal alınan kan kültürü şişelerinden subkültüre gerek kalmadan direkt olarak hızlı ve güvenilir mikroorganizma tanımlaması yapılabilmektedir (79). Direkt kan kültür şişesinden gram negatif bakterilerin %93.5'i, gram pozitif bakterilerin %78.5'inin doğru bir şekilde tanımlandığını bildiren çalışmalar mevcuttur (76).

Üriner sistem enfeksiyonlarının tanısında altın standart yöntem olan idrar kültürü, sıklıkla 24-72 saatten önce sonuçlanmamaktadır. Son yıllarda, laboratuvarlarda kullanılmaya başlanan MALDI-TOF MS sistemi ile direkt olarak idrardan bakteri tanımlanması ile ilgili yapılmış çalışmalarda kültür temelli yöntemler ile uyumlu

sonuçlar alındığı bildirilmiştir (5, 6, 8-10, 79, 82). Ancak, literatürde bu konuyla ilgili çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır (5).

Çalışmamız farklı değişkenlerle yöntem optimizasyonu ve optimize yöntemle idrar örneğinin direkt olarak test edilmesi aşamalarından oluşmuştur. Çalışmanın ilk aşamasında literatürde mevcut çalışmalardan yola çıkılarak optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Yöntem optimizasyonu için; 3 ml idrar örneğinin çeşitli santrifüj basamakları ve %0.1 SDS ile muamelesi sonrası ekstraksiyon yapılmadan MALDI-TOF MS ile test edilmesine dayanan Kim ve arkadaşlarının (5) yöntemi esas alınmış olup literatürdeki diğer çalışmaların yöntemlerinden de faydalanılmıştır (6, 81).

Optimizasyon çalışması için; kullanılan idrar miktarı (1.5, 3 ve 5 ml), SDS konsantrasyonu (%0.1 ve %1), deterjan etkili madde (SDS ve Tween-80), MALDI-TOF MS ile değerlendirme öncesi ekstraksiyon işlemi (ekstraksiyon yapılmadan, formik asit ekstraksiyonu ve etanol-formik asit ekstraksiyonu ile) ve çalışma öncesinde idrar örneğinin inkübe edilmesinin sonuca etkisi araştırılmıştır.

İdrar örneğinin MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanması sırasında kullanılacak idrar miktarı, mevcut çalışmalarda farklılık göstermektedir (5-9, 81, 82). Burillo ve arkadaşlarının (81) 15 ml idrar kullanarak, 1000 idrar örneğini değerlendirdikleri çalışmada, örneklerin 207'sinde tek morfolojide mikroorganizma tespit edilmiş ve bu 207 örneğin 137'si MALDI-TOF MS ile tanımlanabilmiştir. Ancak araştırmacılar en az 15 ml idrar örneğine gereksinim duyulmasını uygulanabilirlik açısından bir dezavantaj olarak belirtilmiştir. Ferreira ve arkadaşlarının (7) 260 idrar örneği ile yapmış oldukları çalışmada, 4 ml idrar örneği kullanılmış ve 100.000 CFU/ml üzerinde üremesi olan 220 örneğin, 204'ünde direkt idrar örneğinden etkeni tanımlanmıştır. Rosello ve arkadaşlarının (82) yapmış oldukları çalışmada 5 ml idrar örneği kullanılmış, akım sitometre cihazıyla mikroorganizma tespit ettikleri 48 idrar örneğinin 44'ünde etken MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanabilmiştir. Wang ve arkadaşlarının (8) yapmış oldukları çalışmada 1456 hastanın idrar örneği incelenmiş, akım sitometre cihazıyla 430 örnekte mikroorganizma tespit edilmiş ve bunların 387'sinde MALDI-TOF MS ile direkt tanımlama yapılabilmektedir. Bu çalışmada, direkt tanımlama için 1 ml idrar örneği kullanılmıştır. Kim ve arkadaşlarının (5) çalışmasında 3 ml idrar örneği kullanılmış olup, 100.000 CFU/ml üzeri sayıdaki 71 gram negatif enterik basilin 70'i, 5

nonfermenter gram negatif basilin 3'ü, 9 gram pozitif kokun 4'ü ve 25 mayanın 5'i MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada; 1,5 ml idrar kullandığında mikroorganizmaların %52'si, 3 ml idrar kullanıldığında %80'i, 5 ml idrar kullanıldığında %83'ü MALDI-TOF MS ile örnekten direkt olarak tespit edilebilmiştir. Örnek miktarlarına göre mikroorganizma tespit oranları incelendiğinde, 1,5 ml ile 3 ml ve 5 ml arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ancak, 3 ml ve 5 ml arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Bu nedenle, kolay uygulanabilirliği nedeniyle 3 ml idrar örneğinin kullanımı uygun bulunmuştur.

Sanchez-Juanes ve arkadaşları (9) test duyarlılığının artırılması amacıyla, idrarda epitel hücreler içindeki mikroorganizmaların da serbest kalabileceği bir metot geliştirmişlerdir. Araştırmacılar geliştirdikleri metotla daha önce MALDI-TOF MS ile direkt olarak test edilip güvenilir tanımlama yapılamayan 71 idrar örneğini santrifüj aşamasından önce %10'luk oranda deterjan özelliği olan sodyum dodesil sülfat (SDS) muamele ederek, testi tekrar etmişlerdir. Daha önce tespit edilemeyen *E. coli*'lerin %55.9'u, *E. faecalis*'lerin %37.6'sı, *P. aeruginosa*'ların %100'ü, *K. pneumoniae*'ların ve *S. aureus*'ların %50'si SDS'in dahil edildiği modifiye yöntemle tanımlanabilmiştir. Bununla birlikte *S. agalactiae* tanımlamasında herhangi bir değişiklik olmamıştır. Kim ve arkadaşlarının (5) çalışmasında ise mikroorganizmaların çökmesi için yapılan 10 dakikalık santrifüj aşamasından sonra idrar pelleti üzerine %0.1'lik SDS ile eklenmiş ve örnekler 37°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Bu yöntemle, 100.000 CFU/ml üzeri sayıdaki mikroorganizma içeren 110 örneğin 82'si, (gram negatif enterik basilin 70'i, 5 nonfermenter gram negatif basilin 3'ü, 9 gram pozitif kokun 4'ü ve 25 mayanın beşi) MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanmıştır. Bu çalışmada, sadece güvenilir tanımlama yapılamayan örnekler değil, tüm testlerde SDS ile ekstraksiyon yapıldığı için, SDS'nin tanımlama üzerine etkisi tartışılmamıştır. Ayrıca her iki çalışmada kullanılan SDS oranı ve uygulama sırası değişiklik göstermektedir ve böylece bu iki çalışma arasında karşılaştırma yapmak mümkün olmamaktadır. Burillo ve arkadaşları (81) ise yaptıkları çalışmada diğerlerinden farklı olarak deterjan etkili madde olarak Tween-80 kullanmışlardır. Bu çalışmada, pellet oluşumundan sonra örnekler beş dakika Tween-80 ile bekletildikten sonrası deterjanı uzaklaştırmak için yıkama işlemi uygulamış ve ardından santrifüj ederek MALDI-TOF MS ile test etmişlerdir. Çalışmada, tek

morfolojide mikroorganizma saptanan 207 örneğin 137'si tanımlanabilmiştir. Bizim çalışmamızın optimizasyon aşamasında ise SDS'nin %0.1 ve %1 oranları karşılaştırılmıştır. Yapılan denemelerde, %0,1'lik SDS kullanıldığında idrar örneklerinin %77'si, %1'lik SDS kullanıldığında ise %70'i MALDI-TOF MS ile direkt olarak tanımlanmıştır. İki farklı konsantrasyonda SDS kullanılarak yaptığımız testlerin sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Çalışmamızın sonraki aşamalarında daha fazla tanımlama yapılan %0,1'lik SDS kullanılmıştır. Çalışmamızın bir sonraki basamağında deterjan madde olarak Tween 80 ve %0,1 SDS karşılaştırılmış, birbirleriyle örtüşen sonuçlar alınmış, %0,1 SDS kullanımına karar verilmiştir.

Kim ve arkadaşlarının (5) yaptığı çalışmada %0,1 SDS kullanılmış olup, toplamda 110 örneğin 82'si tanımlanmıştır.

MALDI TOF MS yöntemi ile tanımlama yapılırken örnekten elde edilen pellet cihazın çelik plağına sürmeden önce farklı ekstraksiyon işlemleri uygulanabilmektedir (7-9, 81). Ferreira ve arkadaşları (7), çalışmalarında kültürde üremiş 204 ve üreme olmamış 20 idrar örneğinin santrifüj aşamalarından sonra elde ettikleri pelleti direkt transfer yöntemi ve ekstraksiyon işlemi uyguladıktan sonra test etmişlerdir. Kültürde üremesi olmayan 20 örnek MALDI-TOF MS yöntemi ile de negatif bulunurken, . kültürde üreme olan 204 örneğin 193'ü her iki metotla aynı tanımlanmış, 11 örnekte farklılık saptanmıştır. Bu 11 örneğin beşi (üç *E. coli*, bir *P. mirabilis* ve bir *Raoultella ornithinolytica*) direk transfer metoduyla, altısı (üç *E. coli*, iki *E. faecalis* ve bir *E. cloacae*) ekstraksiyonlu metotla tanımlanabilmiştir. Araştırmacılar, ekstraksiyonlu metotla tanımlama oranının artışı, ekstraksiyon basamağının bakteri hücre duvarı lizisine yol açarak proteinlerin daha güçlü sinyal vermesi sonucunda oluşabileceğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızın optimizasyon aşamasında; idrar örneği direkt transfer edilerek (ekstraksiyon yapılmadan), formik asit ekstraksiyonu ve etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak üç farklı şekilde test edilmiştir. Ekstraksiyon yapılmadığında idrar örneklerinin %77'si, formik asit ekstraksiyonu yapıldığında %86'sı, etanol-formik asit ekstraksiyonu yapıldığında %83'ü tanımlanmış; formik asit ve etanol formik asit ekstraksiyonu ile ekstraksiyon yapılmadığı durumdan anlamlı olarak daha iyi sonuç alındığı görülmüştür. Sonraki aşamada formik asit ekstraksiyonu kullanımı kararlaştırılmıştır.

Bakteri ve mantarların kültürde üretilmeleri için optimum ısı 35-37°C arasında olmalıdır (95). İdrar örneği içindeki bakteri sayısını potansiyel olarak artırmak amacıyla çalışmamızın optimizasyon aşamasında idrar, 30 dakika süreyle etüvde inkübe edildikten sonra MALDI-TOF MS ile test edilmiştir. Aynı örnekten alınarak bekletilmeden test edilen idrarlarla etüvde inkübe edilen idrarların test sonuçları tamamen örtüşmüştür. Sonraki aşamada idrar, etüvde bekletilmeden MALDI-TOF MS ile test edilmiştir.

Yapılmış çalışmalarda, idrar örneği içerisindeki mikroorganizma yoğunluğunun MALDI-TOF MS ile direkt tanımlamada test sonucunu etkileyen önemli kriterlerden biri olduğu belirtilmiştir (5-7). Kim ve arkadaşlarının (5) yapmış oldukları çalışmada, 202 idrar örneği değerlendirilmiş ve bunların 189'unda kültürde üreme saptanmıştır. Üreme olan örneklerin 145'inde tek mikroorganizma ürerken, 31'inde 10.000-100.000 CFU/ml, 110'nun da ise 100.000 CFU/ml ve üzerine mikroorganizma üremiştir. Bu çalışmada, mikroorganizma sayısı 100.000 CFU/ml ve üzeri olan idrar örneklerinde doğru tanımlama oranı (%76.4), 10.000-100.000 CFU/mlarası organizma içeren idrar örneklerine (%29) göre daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte 10.000 CFU/ml'nin altında organizma içeren idrar örneklerinde ise tanımlama yapılamamıştır.

Çalışmamızın optimizasyon aşamasında, literatürdeki bu veriler doğrultusunda, 100.000 CFU/ml ve üzeri sayıda koloni üremesi olan örnekler çalışma kapsamına alınmıştır. 100.000 CFU/ml koloniden fazla mikroorganizma üreyen plaklar 1.000.000 ve >1.000.000 CFU/ml olarak kategorize edilmiştir. Çalışmamızın tüm basamaklarında test edilen bütün değişkenler için idrar örneklerinde, koloni sayısı arttıkça mikroorganizmaların tanımlanma oranının da arttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızın optimize edilen yöntemle klinik örneklerin çalışıldığı ikinci aşamasında; 10.000 ve 100.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinde tanımlama yapılamazken, 1.000.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinde 21 *E. coli*'nin 19'u, 1 *K. pneumoniae*'nin tamamı, ve 1 *E. aerogenes*'in tamamı tanımlanmıştır. Bunun yanında, birer adet *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *P. mirabilis* ve iki adet *E. faecalis* kültürde üremesine rağmen ilk gün MALDI-TOF MS ile tanımlanamamıştır. tanımlanamamıştır. İdrar örnekleri >1.000.000 CFU/ml mikroorganizma içerdiğinde 35 *E. coli*'nin 34'ü, 13 *K. pneumoniae*'nin 11'i ve toplamda 3 *E. aerogenes*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *E. cloacae* ve 1 *P. mirabilis*'in tamamı tanımlanabilmiştir.

Literatürdeki çalışmalar, mikroorganizma türünün de MALDI-TOF ile direkt örnekten mikroorganizma tanımlamasını etkilediğini göstermektedir. Kim ve arkadaşları (5), 10.000 ve 100.000 CFU/ml mikroorganizma içeren idrar örneklerinde gram pozitif kokları %14,3, gram negatif basilleri ise %54,5 oranında direkt olarak tanımlamışlardır. Aynı çalışmada, bu hücre sayısında mayaların tespit edilme oranı %8,3 olarak bulunmuştur. İdrar örneklerinde 100.000 CFU/ml mikroorganizma olduğunda ise gram pozitif koklar %44,4 oranında, gram negatif basiller %96,1 oranında tanımlanabilmiştir. Bu oran, Ferreira ve arkadaşları (7) ile Wang ve arkadaşlarının (8) çalışmalarındaki gram negatif basillerin tanımlama oranları ile paraleldir. Wang ve arkadaşlarının (8) 1456 hasta örneğinde yaptıkları çalışmada örneklerin, hem geleneksel metotla değerlendirilmek üzere ekimleri yapılmış hem de idrar içindeki partikülleri analiz eden UF-1000i akım sitometre cihazı ile test edilmiştir. Bu örneklerden 100.000 CFU/ml üzerinde bakteri içeren örneklerden MALDI-TOF MS ile test etmişler ve gram negatif bakterileri %81,5-100 arası değişen oranlarda tespit edebilmişlerdir. Bu çalışmada, toplamda bir tane olan *Enterococcus avium* doğru bir şekilde tanımlanmakla birlikte altı *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, *Corynebacterium afermentans* ve *Streptococcus agalactiae* için güvenilir tanımlama yapılamamıştır. Diğer tüm gram pozitif bakterileri de %75-100 arası değişen oranlarda tanımlayabilmişlerdir. Araştırmacılar, formik asit ve asetonitril kullanımı ile gram pozitif bakterileri daha yüksek oranda tanımlayabildiklerini vurgulamışlardır. Kim ve arkadaşları (5) ise bu kimyasalları çalışmalarında kullanmamışlardır. Bizim çalışmamızda benzer olarak, ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı optimizasyon çalışmamız sonucunda dört *E. faecalis*'in ikisi formik asit, üçü etanol-formik asit ekstraksiyon yöntemi uygulanması sonucu tanımlanmıştır.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, gram negatif bakterilerin %79'u MALDI-TOF MS ile doğru olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda gram pozitif beş bakterinin ikisi doğru olarak tanımlanmıştır. Toplam üç örneğin Gram boyamasında bakteri görülmesine rağmen MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılamamış ve kültürde de üreme saptanmamıştır. Böylece üreme gözlenen 97 örneğin 75'i (%77,3) tanımlanmıştır.

Wang ve arkadaşlarının (8) üreme saptadığı 430 idrar örneğiyle yapmış oldukları çalışmada 387 örnekte etken MALDI-TOF MS ile tanımlanabilmiştir. Güvenilir tanımlama yapılamayan 35 örneğin 26'sında lökosit yoğunluğunun yüksek olduğu

gözlenmiştir. Araştırmacılar tarafından yüksek lökosit sayılarının protein piklerini etkileyerek tanımlama oranlarını düşürdüğü bildirilmiştir. Kim ve arkadaşlarının (5) çalışmasında ise lökosit yoğunluğuyla tanımlama oranları arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda, kullanılacak idrar miktarının test edildiği basamakta 1,5 ml idrar örneği kullanıldığında, örneğin lökosit yoğunluğundaki artışın MALDI-TOF MS ile direkt tanımlanma oranlarını azalttığı saptanmıştır. Bu durumun 3 ve 5 ml gibi daha fazla hacimde örnek kullanımında söz konusu olmayıp 1.5 ml gibi görece daha az miktarda örnek kullanımında saptanması, Wang ve arkadaşlarının (8) 1 ml idrar örneği kullandıkları çalışmalarında güvenilir tanımlama yapılamayan örneklerin çoğunda lökosit yoğunluğunun fazla olması bulgusuyla örtüşmektedir. Çalışmamız göstermiştir ki kullanılan idrar hacmi arttığında lökositlerin tanımlamaya olumsuz etkileri ortadan kalkmaktadır.

Klinik örnekten direkt mikroorganizma tanımlanması konusunda çalışmalar devam etmekle birlikte bu konuda henüz standart bir protokol bulunmamaktadır. MALDI-TOF MS sisteminin yakın zamanda mikrobiyolojide kullanıma girdiği göz önüne alındığında yakın gelecekte bu çalışmalar ışığında yenilikler gerçekleşmesi muhtemeldir (10).

Sonuç olarak;

- Bu çalışma ile direkt idrar örneğinde Gram boyama ve MALDI-TOF-MS'in birlikte kullanımıyla kültürde ≥ 100.000 CFU/ml üreme olan örneklerin %75'inden fazlasında örneğin laboratuvara ulaşmasından sonraki iki saat içerisinde etken bakteri tanımlaması yapmak mümkün olmuştur.
- MALDI-TOF-MS'in direkt idrar örneğinden mikroorganizma tanımlanması için kullanımı ÜSE tanısına yeni bir perspektif kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

1. McCarter, Y., et al., *Cumitech 2C: Laboratory diagnosis of urinary tract infections*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 2009.
2. Nicolle LE, B.S., Colgan R et al., *Infectious diseases society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults.*, in *Clinical Infectious Diseases*. 2005. p. 643–54.
3. Garcia, L., *Urine Cultures*, in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2007.
4. Pasternak, J., *New methods of microbial identification using MALDI-TOF*. Einstein (Sao Paulo) 2012. **10(1)**: p. 118-9.
5. Kim, Y., et al., *Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the Vitek MS system based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*. Annals of laboratory medicine, 2015. **35(4)**: p. 416-422.
6. Köhling, H.L., et al., *Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors*. Journal of medical microbiology, 2012. **61(3)**: p. 339-344.
7. Ferreira, L., et al., *Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method*. Clinical Microbiology and Infection, 2011. **17(7)**: p. 1007-1012.
8. Wang, X.-H., et al., *Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry*. Journal of microbiological methods, 2013. **92(3)**: p. 231-235.
9. Sanchez-Juanes, F., et al., *Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry*. Journal of clinical microbiology, 2014. **52(1)**: p. 335-338.

10. Wieser, A., et al., *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review)*. Applied microbiology and biotechnology, 2012. **93**(3): p. 965-974.
11. Segawa, S., et al., *Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis*. Clinica Chimica Acta, 2014. **435**: p. 59-61.
12. Lee, T.-F., et al., *Comparison of the accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry with that of other commercial identification systems for identifying Staphylococcus saprophyticus in urine*. Journal of clinical microbiology, 2013. **51**(5): p. 1563-1566.
13. Mamikoğlu L., İ.D., *İdrar Yolu Enfeksiyonları*, in *Enfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi*, S.G. Willke Topçu A. , Doğanay M., Editor. 2008, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul. p. 1487-99.
14. Sobel J. D., K.D., *Urinary Tract Infections*, in *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.*, B.J.E. Mandell G. L., Dolin R., Editor. 2010, Elsevier: Philadelphia. p. 957-85.
15. Riccabona, M., *Urinary tract infections in children*. Current opinion in urology, 2003. **13.1**: p. 59-62.
16. Foxman, B.a.B., Robin and D'Arcy, Hannah and Gillespie, Brenda and Sobel, Jack D, et al. , *Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs*. Annals of epidemiology, 2000. **10.8**: p. 509-515.
17. Hooton, T., *Urinary Tract Infections in Adults*, in *Comprehensive Clinical Nephrology*, J.R.J. Floege J, Feehally J., Editor. 2010, Elsevier: Missouri. p. 629-40.
18. İpekçi, T., et al., *Üriner Sistem Enfeksiyonlarına Güncel Yaklaşım*.
19. Schnarr, J. and F. Smaill, *Asymptomatic bacteriuria and symptomatic urinary tract infections in pregnancy*. European journal of clinical investigation, 2008. **38**(s2): p. 50-57.
20. Tambyah, P.A., *Catheter-associated urinary tract infections: diagnosis and prophylaxis*. International journal of antimicrobial agents, 2004. **24**: p. 44-48.
21. Stamm, W.E., Stapleton A.E. , *Approach to the patient with urinary tract infection*. Infectious Diseases, 1998. **2**: p. 1270-2.

22. Ronald, A., *The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens*. Disease-a-Month, 2003. **49**(2): p. 71-82.
23. Nataro J. P., B.C.A., Fields P. I., and S.N.A. Kaper J. B., *Escherichia, Shigella, and Salmonella*, in *Manual of Clinical Microbiology*, V. J., Editor. 2011, ASM Press. p. 603-26.
24. Bilgehan, H., *Escherichia*, in *Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 2000, Baris yayınları. p. 3-17.
25. Özkuyumcu, C., *Escherichia*, in *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi - 1, Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*. 2009, Güneş Tıp Kitapevi.
26. B, E., *Enterobacteriaceae*, in *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, M.G. Ustaçelebi Ş, İmir T, Editor. 1999, Güneş Kitabevi. p. 471-515.
27. Tille, P.M., *Enterobacteriaceae*, in *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 2014, Elsevier. p. 307-28.
28. Bilgehan, H., *İdrar Yolları Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojik İncelenmesi*, in *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 2009, Fakülteler Kitabevi: İzmir. p. 375–84.
29. L., A.S., *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*, in *Manual of Clinical Microbiology*, V. J., Editor. 2011, ASM Press. p. 639-57.
30. Çakar, A., *Klebsiellae, Proteae, Citrobactereae Kabileleri ve Diğer Enterobactericae*, in *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi -1, Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*, Ö. C, Editor. 2009, Güneş Kitabevi.
31. Çakar, A., *Pseudomonas*, in *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi - 1, Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*, C. Özkuyumcu, Editor. 2009, Güneş Kitabevi.
32. Henry D. A., S.D.P., *Pseudomonas*, in *Manual of Clinical Microbiology*, V. J., Editor. 2011, ASM Press. p. 677-91.
33. Sancak, B., *Staphylococcus*, in *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1, Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*, Ö. C, Editor. 2009, Güneş Kitabevi.
34. Becker K., V.E.C., *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*, in *Manual of Clinical Microbiology*, V. J., Editor. 2011, ASM Press. p. 308-30.
35. Sancak, B., *Enterococcus*, in *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1, Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*, Ö. C, Editor. 2009, Güneş Kitabevi.

36. Teixeira L. M., C.M., Shewmaker P. L., Facklam R. R., *Enterococcus*, in *Manual of Clinical Microbiology*, V. J, Editor. 2011, ASM Press: . p. 350-64.
37. Spellerberg B., B.C., *Streptococcus*, in *Manual of Clinical Microbiology*, V. J., Editor. 2011, ASM Press. p. 331-49.
38. Schrag, S., et al., *Prevention of perinatal group B streptococcal disease*. MMWR Recomm Rep, 2002. **51**(11): p. 1-22.
39. Kunin, C.M., *Urinary tract infections in females*. Clinical Infectious Diseases, 1994. **18**(1): p. 1-10.
40. Hooton, T.M., *Pathogenesis of urinary tract infections: an update*. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2000. **46**(suppl 1): p. 1-7.
41. Naber, K.G., et al., *EAU Guidelines for the Management of Urinary and Male Genital Tract Infections*. European urology, 2001. **40**(5): p. 576-588.
42. Pezzlo M. , Y.M.K., Church D. L., *Urine cultures*, in *Clinical microbiology procedures handbook*, G.L.S. Isenberg H. D. , Editor. 2007.
43. Baerheim, A., A. Digraanes, and S. Hunskaar, *Evaluation of urine sampling technique: bacterial contamination of samples from women students*. Br J Gen Pract, 1992. **42**(359): p. 241-243.
44. Baerheim, A., et al., *Bacteriological findings in urine specimens from women: association with urinary tract symptoms and sampling methods*. Scandinavian journal of urology and nephrology, 1991. **25**(2): p. 125-127.
45. Burd, E.M. and K.S. Kehl, *A critical appraisal of the role of the clinical microbiology laboratory in the diagnosis of urinary tract infections*. Journal of clinical microbiology, 2011. **49**(9 Supplement): p. S34-S38.
46. Roberts, K.B., *Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2 to 24 months*. 2011, Am Acad Pediatrics.
47. Sharifian, M., et al., *Microbial sensitivity pattern in urinary tract infections in children: a single center experience of 1,177 urine cultures*. Japanese journal of infectious diseases, 2006. **59**(6): p. 380.
48. Hooton, T.M., et al., *Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America*. Clinical infectious diseases, 2010. **50**(5): p. 625-663.

49. Verani, J.R., L. McGee, and S.J. Schrag, *Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC, 2010*. 2010: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
50. Ilki, A., et al., *Rapid reporting of urine culture results: impact of the uro-quick screening system*. The new microbiologica, 2010. **33**(2): p. 147.
51. Marschal, M., et al., *Evaluation of 3 different rapid automated systems for diagnosis of urinary tract infections*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2012. **72**(2): p. 125-130.
52. L., C.D., *Aerobic Bacteriology*, in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, G. L.S., Editor. 2007, ASM Press: Washington, DC.
53. Tille, P.M., *Staphylococcus, Micrococcus and Similar Organisms*, in *Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology*. 2014, Elsevier. p. 232-46.
54. Bilgehan, H., *Enterobacteriaceae*, in *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 2009, Fakülteler Kitabevi: İzmir. p. 425-54.
55. *The Enterobacteriaceae*, in *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, C.D. Procop GW, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL., Editor. 2017, Wolters Kluwer-Lippincott Williams&Wilkins. p. 213-315.
56. Cathy A. Petti, M.P.W., Karen C. Carroll, *Systems for Detection and Identification of Bacteria and Yeasts*, in *Manual of Clinical Microbiology*, J. Versalovic, Editor. 2011, ASM Press. p. 15-26.
57. Richter Sandra S. , F.M.J., *Susceptibility Testing Instrumentation and Computerized Expert Systems for Data Analysis and Interpretation*, in *Manual of Clinical Microbiology*, J.H. Jorgensen, Editor. 2011, ASM Press. p. 1144-54.
58. Posteraro, B., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond*. Expert review of proteomics, 2013. **10**(2): p. 151-164.
59. Douglass JF. (Karabulut HG. çev.) (Tekeli A, U.Ş.ç.e., *Tanı ve Aşı Adaylarının Kütle Spektrometrisi ve Proteomik ile Aydınlatılması*. , in *Persing DH. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. 2006, Palme Yayıncılık.: Ankara. p. 307-319.

60. Biberoğlu, G., *Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı*. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri, 2003. **23**: p. 490-498.
61. Holler, J.G., et al., *Using MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid and accurate diagnostic tool in infective endocarditis: a case report of a patient with mitral valve infective endocarditis caused by Abiotrophia defectiva*. Scandinavian journal of infectious diseases, 2011. **43**(3): p. 234-237.
62. Turnidge John D. , F.M.J., Jorgensen James H., *Susceptibility Test Methods: General Considerations*, in *Manual of Clinical Microbiology*, J.J. H., Editor. 2011, ASM Press. p. 1115-21.
63. Patel Jean B. , T.F.C., Turnidge John D. , and J.J. H., *Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods*, in *Manual of Clinical Microbiology*, J.J. H., Editor. 2011, ASM Press. p. 1122-43.
64. Jorgensen, J.H., Ferraro, Mary Jane, *Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices*. Clinical Infectious Diseases, 1998: p. 973-980.
65. Barenfanger, J., C. Drake, and G. Kacich, *Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing*. Journal of clinical microbiology, 1999. **37**(5): p. 1415-1418.
66. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100–S24. 2014.
67. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters* <http://www.eucast.org>. 2015.
68. Gupta, K., et al., *International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases*. Clinical infectious diseases, 2011. **52**(5): p. e103-e120.
69. Haşçelik, G., *Mikrobiyolojik Tanıda Yeni Yöntemler*. Ankem dergi, 2013. **27**: p. 154-6.

70. Barbuddhe, S.B., et al., *Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(17): p. 5402-5407.
71. Mellmann, A., et al., *Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria*. Journal of clinical microbiology, 2008. **46**(6): p. 1946-1954.
72. Prod'homme, G., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets*. Journal of clinical microbiology, 2010. **48**(4): p. 1481-1483.
73. Stevenson, L.G., S.K. Drake, and P.R. Murray, *Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. Journal of clinical microbiology, 2010. **48**(2): p. 444-447.
74. Eigener, U., et al., *Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory*. Clinical Laboratory Journal For Clinical Laboratories And Laboratories Related, 2009. **55**(7): p. 289.
75. La Scola, B. and D. Raoult, *Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry*. PloS one, 2009. **4**(11): p. e8041.
76. Barberino, M.G., et al., *Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2017.
77. Kumar, A., et al., *Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. Critical care medicine, 2006. **34**(6): p. 1589-1596.
78. Beekmann, S., et al., *Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges*. Journal of clinical microbiology, 2003. **41**(7): p. 3119-3125.
79. Machen, A., T. Drake, and Y.F.W. Wang, *Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF*

- VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87870.
80. Tadros, M. and A. Petrich, *Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper Kit™ for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian pediatric hospital*. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2013. **24**(4): p. 191-194.
 81. Burillo, A., et al., *Gram-stain plus MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86915.
 82. March Rosselló, G.A., et al., *Procedure for microbial identification based on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from screening-positive urine samples*. Apmis, 2014. **122**(9): p. 790-795.
 83. Chlabicz, S., et al., *Uncomplicated lower urinary tract infections in females--clinical aspects, aetiology and antimicrobial resistance epidemiology. Results of the ARESC (Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis) study in Poland and their implications for empiric therapy*. Przegląd epidemiologiczny, 2010. **65**(2): p. 345-351.
 84. Cullen, I.M., et al., *The changing pattern of antimicrobial resistance within 42 033 Escherichia coli isolates from nosocomial, community and urology patient-specific urinary tract infections, Dublin, 1999–2009*. BJU international, 2012. **109**(8): p. 1198-1206.
 85. Kronenberg, A., et al., *Active surveillance of antibiotic resistance prevalence in urinary tract and skin infections in the outpatient setting*. Clinical microbiology and infection, 2011. **17**(12): p. 1845-1851.
 86. Bayraktar, B., et al., *Yatan Ve Ayaktan Hastalardan İzole Edilen Üriner Sistem Enfeksiyon Etkeni Gram Negatif Çomaklarda Antibiyotiklere Direnç*. Ankem Dergi, 2004. **18**(3): p. 137-140.
 87. Arslan, H., et al., *Risk factors for ciprofloxacin resistance among Escherichia coli strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005. **56**(5): p. 914-918.
 88. Rifaioğlu, M.M., *İdrar Kültürlerinde İzole Edilen Gram Negatif Çomaklarda Yıllara Göre Bakteri Direncinin Değerlendirilmesi. TC Sağlık Bakanlığı. Tıpta Uzmanlık Tezi*. 2008.

89. Anhalt, J.P. and C. Fenselau, *Identification of bacteria using mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1975. **47**(2): p. 219-225.
90. Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS microbiology reviews, 2012. **36**(2): p. 380-407.
91. Murray, P.R., *What is new in clinical microbiology—microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2012. **14**(5): p. 419-423.
92. Sparbier, K., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics*. Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(3): p. 927-937.
93. Flores-Mireles, A.L., et al., *Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options*. Nature reviews microbiology, 2015. **13**(5): p. 269-284.
94. Doğanay, M., *Hematopoetik ve Lenforetiküler Sistem Enfeksiyonları*, in *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, G.S. Ayşe Willke Topçu, Mehmet Doğanay, Editor. 2002, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul. p. 621-36.
95. Tille, P.M., *Traditional Cultivation and Identification*, in *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 2014, Elsevier: Missouri. p. 81-105.