Derleme / Review *TAF Prev Med Bull 2014;13(5):421-426*

Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları

[Applications of MALDI-TOF MS in Microbiological İdentification]

ÖZET

MALDI-TOF MS (Matriks assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) günümüzde mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan yeni bir yöntemdir. Bu yöntem, mikroorganizmaların protein yapılarını iyonize ettikten sonra elektrik alandan geçirerek protein profillerinin çıkarılması esasına dayanır. Elde edilen profiller sistemin kütüphanesindeki verilerle karşılaştırılarak tanımlama yapılır. Tanımlama için temel alınan mikroorganizma proteinleri ise esasen çevresel koşullardan az etkilenen ribozomal proteinlerden oluşmaktadır. MALDI-TOF MS ile yapılacak tanımlama çalışmaları tercihen taze kültürlerden yapılmalıdır. Eski kültürlerde ribozomal proteinlerde bozulmalar meydana gelmektedir. Rutin bakteri izolatlarında %84,1 ile %95,2 arasında değişen oranda doğru tanımlama yapmaktadır. Maya tanımlamasında da başarı oranı %85 ile %100 arasında değişmektedir. Pozitif kan kültür şişelerinden, subkültüre gerek olmadan tanımlama yapabilmektedir. İdrar örneklerinde mikrolitrede 10^5 ve üzeri bakteri olduğunda da direkt örnekten tanımlama yapabilmektedir. Konvansiyonel ve moleküler tanımlama yöntemleri ile kıyaslanacak olursa MALDI-TOF MS örnek başı maliyeti ve tanımlama için geçen süre yönünden çok daha etkin görülmektedir.

SUMMARY

MALDI-TOF MS (Matriks assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) is a new metohod for identification of microorganisms nowadays. This method is based revealing of microorganisms protein profile with ionization of protein structure and these ionized mass pass through the electrical field. Profiles which were obtained from microorganisms compare with database of system thus identification is made by this way. Ribosomal proteins are used in identification which are less affected by enviromental conditions. Fresh culture should preferably use in MALDI-TOF MS identification. Ribosomal proteins can be deteriorate in old cultures. The correct identification rates are changing between 84,1% to 95,2% in routine bacterial isolates. The correct identification rates in yeasts are changing between 85% to 100%. It makes identification in positive blood culture bottles without the need of subculture, also makes identification on urine samples without the need of culture which has greater than 10^5 microorganisms in a microliter. When it compared with conventional and molecular identification methods, it is more effective on per sample costs and elapsed time on working.

Soner Yılmaz[1], Serhat Duyan[2], Cumhur Artuk[3], Hüsrev Diktaş[4].

[1]Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Kan Eğt. Mrk. ve Kan Bankası Müdürlüğü
[2]GATA, Tıbbi Mikrobiyoloji AD Başkanlığı
[3] GATA, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD.
[4]Girne Asker Hastanesi

Anahtar Kelimeler:
MALDI-TOF MS, Bakteri Tanımlanması, Mikrobiyolojik Tanı

Key Words:
MALDI-TOF MS, Bacterial Identification, Microbiological Diagnostic

Sorumlu yazar/ Corresponding author:
Soner Yılmaz, GATF Kan Bankası ve Kan Eğitim Merkezi, Etlik-Ankara.06010.
soyilmaz@gata.edu.tr

Gönderme Tarihi/Date of Submission: 13.06.2013 , **Kabul Tarihi/Date of Acceptance:**29.08.2013 **DOI:** 10.5455/pmb 1-1371041898

GİRİŞ

MALDI-TOF MS (Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight mass spectrometry) günümüzde mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan hızlı, ucuz, doğru sonuç veren, yeni bir yöntemdir (1,2). Bu yöntemde mikroorganizmalara ait biyomeküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmaktadır. Bu profil spektralarına ait grafiksel görüntülerin sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür bazında tanımlanabilmektedir (3).

Kütle spektrometrisi uzun yıllardır özellikle kimya alanında kullanılmakla birlikte mikrobiyoloji alanında kullanımı 1970'lerden itibaren başlamaktadır. Anhalt ve Fenselau'nun 1975'te yaptıkları analizlerde bakterilerin tür ve cins bazında kendilerine has bir kütle spektralarının olduğu ortaya konmuştur (3). Bin dokuz yüz seksenlerde dezorpsiyon/iyonizasyon teknolojisinin gelişmesiyle beraber mikroorganizmalardan iyonik karakterde biyomarkırların oluşması sağlanmıştır (4). Bununla beraber örneklerin hazırlanmasındaki uzun süreç bu uygulamaların rutin mikrobiyoloji alanında kullanılmasına engel olmuştur. Bin dokuz yüz seksenli yılların sonu ve 1990'lı yılların başında gelişen soft iyonizasyon tekniklerinin [(MALDI ya da elektrospray iyonizasyon (ESI)] sisteme entegre olması ile beraber protein gibi büyük moleküllerin incelenebilmesi olanağına kavuşulmuştur (5,6). MALDI-TOF MS bu sayede her organizma için özgül olan proteinlerden kütle spektrometresine dayalı o

mikroorganizma için özgün bir çeşit parmak izini çıkarmakta, bu sayede bakteri, mantar ve virüs tanımlaması yapılabilmektedir.

MALDI-TOF ucuz olması, hızlı tanımlama yapabilmesi ile günümüz konvansiyonel ve moleküler tanımlama yöntemlerine bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Tıp alanında MALDI-TOF MS'in kullanımı mikrobiyoloji ile sınırlı olmayıp çeşitli kanser türleri, romatoid artirit, Alzheimer ve bazı alerjik hastalıkların tanısında da kullanılmaktadır (7).

YÖNTEME GENEL BAKIŞ:

MALDI-TOF MS cihazı ana hatlarıyla üç bölümden oluşmaktadır. Bunlar;

(i) İyonizasyon kaynağı: MALDI ve ESI soft iyonizasyon kaynaklarıdır.

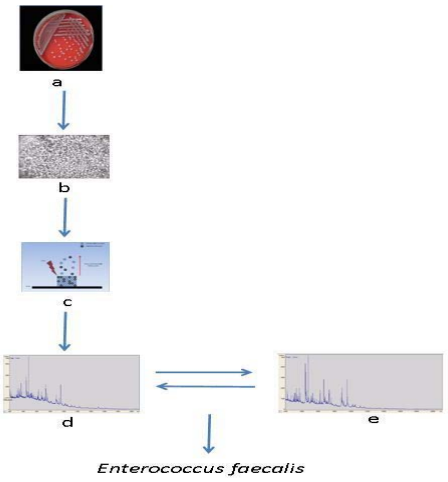
(ii) Kütle analizörü: lazer dezorbsiyon sistemleri çeşitli kütle analizörleri ile kombine edilebilir. MALDI ile birlikte genellikle kütle spektrometresi olarak TOF (time of flight) kullanılır.

(iii) Algılama bölümü: iyonların kütlesinin yüküne (m/z) oranının karekköüne bağlı olarak bir analiz yapılmakta, biyomoleküller yoğunluklarına ve bu orana göre tasniflenmektedir (1)

MALDI-TOF MS analizinde örnek hazırlamak için mikroorganizmanın matriks solüsyonu ile karıştırılarak kristalize hale getirilmesi gerekmektedir. Çok az miktardaki (10^4 ila 10^6 CFU) mikrobiyal biyokütle analiz için yeterlidir (2). Matriks solüsyonu, kullanılan lazer dalga boyunda optimal absorbsiyonu sağlamak için küçük miktarda asit molekülü ihtiva eder. Protein yapıda biyomarkırların tespiti için 2,5-dihidroksibenzoik asit, ferulik asit, sinapinik asit ve α-siyano-4-hidroksisinamik asitler tavsiye edilmektedir. Analiz sırasında elde edilen piklerin yoğunluğu kullanılan matriksin çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. 2,5-dihidroksibenzoik asit ve α-siyano-4-hidroksisinamik sıklıkla 10kDa'dan daha küçük, sinapinik asit ve ferulik asit ise 15kDa'dan daha yüksek kütlelerin tespiti için daha uygun olan asit formlarıdır (1).

Çoğu vejatatif bakterinin matriks solüsyonu ile karşılaşması lize olmasına ve bu sayede protein içeriğinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Virüs, mantar, bakteri sporları ve *Actinomyces* gibi bazı özel bakterilerin matriks solüsyonu ile karşılaşmaları lize olmaları için yeterli olmamaktadır. Bu organizmaların matriks solüsyonundan önce güçlü organik asitlerle ya da alkol ile muamele edilmesi ya da protein ekstraksiyonlarının yapılması gerekmektedir (8). Esas önemli olan ise sonuçlar hangi veri tabanı ile karşılaştırılacaksa o veritabanına sahip olan üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak örneklerin hazırlanmasıdır.

Matriks ile karıştırılarak kristalize hale gelen örnekler kuruduktan sonra analiz için hazır hale gelmektedir Bir örnek plağında firmalara göre değişiklik göstermekle birlikte 16 ila 384 örnekle çalışılabilmektedir. Hazırlanan plaklar cihaza yüklenmesi esnasında sisteme hava girişi olur ve cihaz içi vakumu bozulur. İnceleme öncesinde vakum tekrar sağlandıktan sonra örnekler lazer bombardımanına maruz kalır. Bu bombardımandan sonra örnek karışımı lazerden enerji alır. Alınan bu enerji, karışımdan iyonların buharlaşmasına ve gaz fazına geçmesini sağlar. Serbestleşen iyonlar elektromanyetik alanda hızlandırıldıktan sonra uçuş tüpüne geçerler ve uçuş tüpünde geçirdikleri zamana göre kütle ağırlıkları tespit edilir. MALDI ile yapılan dezorbsiyon sonucunda açığa çıkan iyonlar tek yüklü iyonlar olduğundan elde edilen pikler esas olarak kütleye bağlıdır (Şekil 1).



a: plakta üremiş koloni
b: matriks solüsyonu ile kristalize olmuş bakterilerin kamera görüntüsü
c: yapılan analizin şematize edilmiş hali
d: bakteriden elde edilen protein profili
e: cihaz kütüphanesinde o bakteriye ait olan profil ile karşılaştırma

Şekil 1. MALDI TOF-MS çalışma yöntemi

Her mikroorganizma için özgün bir spektrum elde edilmesinin sebebi hücre içinde bol miktarda bulunan orta hidrofobik özelliğe sahip temel proteinlerin tespit edilmesidir. Bu temel proteinler çoğunlukla ribozomal proteinlerden kaynaklanmakta olup sıklıkla 4 ila 15 kDa aralığındadırlar. Ribozomal proteinler mikrobiyal üreme koşullarından, çevresel koşullardan en az etkilenen ve bu yüzden rutin tanımlama için en uygun olan proteinlerdir. Matriks solüsyonu seçilirken de özellikle bu temel proteinlerin iyonizasyonunu sağlayacak olanlar tercih edilmelidir (9).

Aynı bakteriyle aynı koşullarda analiz tekrarlansa bile birebir aynı yoğunlukta spektrumlar elde

edilemeyebilmektedir. MALDI-TOF cihazından kaynaklanan farklılıklar, kullanılan matriks solüsyonu, incelenen koloninin yaşı, kullanılan besiyerinin cinsi, inkübasyon koşulları gibi birçok parametre elde edilen spektrumların birebir aynı olmasını etkilemektedir (10). Özellikle ribozomal proteinlerden kaynaklanan piklerin varlığı korunmakta fakat yoğunlukları farklılıklar göstermektedir. Çeşitli koşullar altında kaybı görülen piklerin ise yapısal olmayan proteinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (1).

Analiz bittikten sonra tek kullanımlık plaklar normal laboratuvar atık kutularına atılırken tekrar kullanılabilecek olanlar etanol gibi çeşitli kimyasallarla temizlendikten sonra sonraki kullanımlara hazır hale getirilir.

BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

Kültürde üremiş bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanma işlemi 1-2 gün sürebilmektedir. MALDI-TOF MS yöntemi ile doğru şekilde tanımlayabilme oranında bir değişiklik olmadan bu süre 1 saate kadar inmektedir. Ayrıca MALDI-TOF MS yöntemi daha önceden 16S rRNA gen sekansı ile ayrılabilen yakın türlerin bile ayrımını başarıyla yapabilmektedir (2). Günümüzde kullanılan MALDI-TOF MS teknikleri kültür için kullanılan besiyerlerinden ve üreme koşullarından etkilenmeden çalışmaktadır fakat analiz için alınacak koloninin 48 saatten daha yaşlı olmaması tercih edilmektedir. Eskiyen kültürlerde ayırt edici pik sayısı ve bu piklerin yoğunluğu düşmektedir. Buna neden olarak ise eskiyen kültürlerde meydana gelen ribozomal proteinlerin parçalanması gösterilmektedir (2).

Bakteriyel tanımlama işlemi örnekten elde edilen bilgilerin veritabanındaki bilgilerle karşılaştırılması sonucunda yapılmaktadır. Direkt olarak koloniden yapılan çalışmada tanımlama yapılamadıysa mikroorganizmaya protein ekstraksiyon protokolleri uygulanarak yöntem tekrarlanmalıdır. MALDI-TOF MS yöntemi mikrobiyolojik tanımlama için nispeten yeni bir yöntem olduğundan yanlış tanımlama yapılan ya da tanımlama yapılamayan mikroorganizmaların nedeni genellikle veritabanında o mikroorganizma için yeterli referans spektrumlarının olmamasıdır. Bu eksikliğin veritabanının gün geçtikçe gelişmesi ile beraber yakın bir gelecekte aşılacağı düşünülmektedir. Rutin bakteri izoatlarında MALDI-TOF MS'in tür bazında doğru tanımlama oranının %84,1 ile %95,2 arasında değiştiği bildirilmiştir (11,12).

MALDI-TOF MS ile *Enterobacteriaceae*'lar, non-fermentatif gram negatif bakteriler, stafilokoklar ve streptokoklar hızlı ve kolay bir şekilde tür düzeyinde güvenilir bir şekilde tanımlanabilmektedir (13). Özellikle de konvansiyonel yöntemlerin çok da yeterli olmadığı gram pozitif basillerin, anaerop ve bazı non-fermentatif bakterilerin tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in üstün olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (14,15).

Olumlu yönlerine rağmen bazı organizmaların doğru olarak tanımlanmasında sıkıntılar yaşanmaktadır. Örnek olarak *S. pneumoniae, S. mitis ve S. parasanguinis* gibi aynı cins içerisinde birbirine yakın türler doğru olarak tanımlanamayabilmektedir (16,17). Bunun nedeni veri tabanında bu iki suşu ayırabilecek derecede yeterli bilgi olmaması ve bu iki bakterinin ribozomal protein sekanslarında yeterli farklılık ihtiva etmemesidir. Benzer sorun *Shigella* spp. ile bazı *E.coli* suşlarının ayrımında da yaşanmaktadır (11,12,18). Pnömokokların tanımlanmasını etkileyen başka bir neden de bakterilerin hücre duvar yapılarında kapsül bulundurmalarıdır (16). Anaerop bakterilerde veri tabanı yetersizliğinden dolayı başarılı tanımlama oranları %50'nin altında olmaktadır (19). Bu yöntemin mikobakterilerin tanımlanmasında yüksek oranda tekrarlanabilirliğe ve hassasiyete sahip olduğu bildirilmiştir. Mikobakteri tanımlanması için katı besi yerinde üreyen bakterilerdeki başarı oranı sıvı besiyerinde üreyenlerden daha yüksektir (20).

Bakteriyel tanımlamayı olumsuz olarak etkileyen en önemli faktörler; incelenen bakterinin yeterli miktarda olmaması (güvenilir bir tanımlama için her kuyucukta en az 10^6 bakteri olması gerekmektedir), bakterinin lizise dayanıklı yapıda olması ve bakteriden elde edilen spektrumu kıyaslayabilecek yeterli bilginin veri tabanında bulunmamasıdır.

MANTARLARIN TANIMLANMASI

Normal konvansiyonel yöntemlerle mantarların tanımlanması günler almakta iken MALDI-TOF MS ile kısa süre içinde tür bazında tanımlama yapmak mümkün olabilmektedir. Yapılan çalışmalar mayaların tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in başarı oranını %85-%100 arasında göstermektedir (18,21). Özellikle *Candida* cinsi mantarlar tür bazında doğru olarak tanımlanabilmekteyken, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. ve dermatofitler yetersiz referans spektrum nedeniyle daha az oranda tanımlanabilmektedir. Küf yapılarındaki protein değişikliğinden dolayı bu organizmaların tanımlanması sadece kültürlerden yapılabilmektedir. Filamentöz mantarların tanımlanmasında da başarılı bir analiz için öncesinde protein ekstraksiyonu yapılması gerekmektedir (22).

Mantarların tanımlanmasında karşılaşılan problemler;

(i) Veritabanındaki referans spektrumlarının yetersizliği,

(ii) Mantarların yapılarında bulunan hücre duvarının onları lizise karşı dirençli kılması,

(iii) Örnek hazırlama protokollerinin henüz standardize edilmiş olmaması (özellikle filamentöz mantarlar için),

(iv) Filamentöz mantarların çeşitli gelişim evrelerinde farklı spektrumların elde edilmesinin, aynı izolatla yapılan çalışmalarda farklı spektrumlar elde edilmesine neden olmasıdır.

DİREKT ÖRNEKTEN YAPILAN TANIMLAMA İŞLEMİ

Direkt örnekten yapılacak tanımlamalar için en önemli engel örnekteki bakteri miktarının analiz için yeterli olmamasıdır. Özellikle beyin omurilik sıvısı (BOS) örnekleri hem az mikroorganizma ihtiva etmesi hem de alınan örnek miktarının sınırlı olmasından dolayı direkt tanısı zor olan örneklerdir.

Kan kültürleri otomatize sistemde pozitif sinyal verdiğinde genellikle MALDI-TOF analizi için yeterli miktarda bakteriyi mikrolitresinde barındırmaktadır. Fakat gerek kan kültür şişesinin içeriği gerekse de hasta serumu içerisinde bulunan proteinler, protein temelli bir inceleme yapan MALDI-TOF analizini bozmaktadır. Direkt pozitif şişelerden analiz yapmak için bir çok protokol geliştirilmiştir ama bunların içinde "hücre lizis protokolü" öne çıkmakta ve yarım saatten daha kısa bir sürede tanımlama yapılmasına imkân vermektedir. Bunun için ayırt edici santrifüj ile kan hücreleri ayrıştırılmasını takiben eritrositler lizise uğratılır ve sonrasında örnek yıkanarak bakteriyel olmayan komponentlerin uzaklaştırılması sağlanır. Direkt pozitif şişelerden yapılan inceleme protokollerine protein ekstraksiyon basamağı da eklendiğinde başarı oranı daha da artmaktadır (23). Subkültürün üremesi ve sonraki tanımlama işlemleri göz önüne alındığında minumum 36-48 saat süren bu tanımlama süreci bu yöntemin kullanılmasıyla 1 saatten daha az sürede yapılabilmektedir. Bu sayede izole edilen mikroorganizmalardaki başarı oranı uygulanan protokole ve bakterinin cinsine (lizise dayanıklı olması, kapsül ihtiva etmesi vs.) göre değişiklikler göstermektedir. Kan kültür şişelerinin bazıları hasta kanında olabilecek antibiyotikleri inaktive etmek için kömür ihtiva eder. Kömür bulunan şişelerde MALDI-TOF MS analizinin başarı şansı kömür ihtiva etmeyenlere oranla daha düşük bulunmuştur (24).

Pozitif kan kültürü şişelerinden mantarlar da tanımlanabilmektedir. Spanu ve ark.nın yaptığı çalışmada konvansiyonel kültür yöntemleriyle kıyaslandığında MALDI-TOF MS *Candida albicans* izolatlarını %95.9, *C. albicans* dışı *Candida*'ları ise %86,5 oranında saptayabilmektedir. Bu yöntemin kan kültüründen mayaları doğru olarak izole edebilmesinin önündeki en büyük engel polifungal üreme olarak gösterilmektedir (25). Kan akım yolu enfeksiyonlarında etken tanımlamasının hızlı yapılması, hastanın doğru antibiyotik tedavisi alması konusunda çok önemli bir yol gösterici olacak ve mortalite oranlarında bir azalma sağlayacaktır.

İdrar örneklerinden direkt tanımlama için mikrolitrede 10^5 ve üzeri bakteri varlığı gerekmektedir. Yeterli mikroorganizmanın bulunduğu örneklerde önce yavaş sonrasında hızlı santrifüj yapılmak suretiyle etken mikroorganizmaların saflaşması sağlandıktan sonra direkt örnekten inceleme yapılabilir. Günlük olarak gelen idrar örnek sayısı göze alındığında ve idrar yolu enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılık test sonuçları olmadan sadece tanımlama yapmanın yapacağı katkı ele alındığında günümüzde idrar örneklerinde direkt olarak MALDI-TOF MS kullanılması maliyet olarak etkin gözükmemektedir (22).

MALDI-TOF ANALİZİ İLE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ BELİRTEÇLERİ, VİRÜLANS FAKTÖRLERİ VE SUBTİPLERİN BELİRLENMESİ

Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkeni olan *S. aureus*'un özellikle hücre duvar ve proteom ilişkili yapısal değişiklikler kullanılarak metisiline duyarlı ve dirençli suşları MALDI-TOF MS yardımı ile birbirinden ayırt edilebilmektedir. Klinik ve enfeksiyon kontrolündeki öneminden dolayı yöntemin bu bakteriye ait duyarlılığının geliştirilmesi gerekmektedir. Bunun yapılabilmesi ile beraber konvansiyonel yöntemlerin (oksasilin ya da sefoksitin disk yöntemi) yerini MALDI-TOF MS'in alması planlanmaktadır. Bu sayede kan kültüründe üreyen MRSA suşlarının hızlı tanısının yapılabilmesi mümkün olacaktır (22, 26).

Genel olarak antibiyotik direncinin bu yöntemle ortaya konabilmesi direnç mekanizmalarının türüyle alakalıdır. Protein değişikliği (penisilin-bağlayan proteinlerde meydana gelen değişiklik sonucu değişik seviyede oluşan ß-laktam direnci gibi) ve indüklenebilir direnç mekanizmalarıyla oluşan direncin bu yöntemle tespit edilebilmesi zor görülmektedir. Bununla beraber çeşitli antimikrobiyal moleküllerde değişikliğe neden olan enzim değişikliklerine bağlı direnç mekanizmalarının (ß-laktamaz ya da efluks pompaları gibi) tespitinin bu

yöntemle yapılabileceği düşünülmektedir (27). Yöntemin rutin mikrobiyoloji laboratuarında uygulanabilmesiyle 1-3 saat gibi bir zaman aralığında bakterinin beta laktamaz enzim üretip üretmediği hakkında bilgi edinilebilecektir.

MALDI-TOS MS'in bazı virülan bakteri suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tanı sürecine önemli katkılarda bulunabileceği düşünülmektedir. Bittar ve ark.'nın çalışmasında PVL (Panton-Valentine Leukocidin) üreten ve üretmeyen *S. aureus* suşlarının ayrımının bu yöntemle yapılabileceği bildirilmiştir (28).

L. monocytogenes için yapılan bir çalışmada *Listeria* serotiplerinin belirlenmesinde MALDI-TOF MS sonuçlarının PFGE (Pulse-field gel electrophoresis) korole olduğu gösterilmiştir (14). El-ayak-ağız hastalığının etkeni olan human enterovirüsün serotip tayini bu yöntemle yapılmış ve elde edilen sonuçların dizi analizi ile %93,4 oranında uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır (29). MALDI-TOF MS, subtiplendirme yapan PFGE ve MLSA (Multilocus sequence analysis), dizi analizi gibi yöntemlere alternatif olma yolunda ilerlemektedir.

SONUÇ

MALDI-TOF MS mikrobiyolojide rutinde sık olarak karşılaştığımız mikroorganizmaların hızlı ve kolay bir şekilde tanımlanmasını sağlayan yeni bir yöntem olup, klasik olarak mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar doğruluk açısından MALDI-TOF'un konvansiyonel yöntemlerle aynı hatta bazen daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir. Maliyet açısından bakılacak olursak cihazın ilk alımındaki maliyet dışında örnek başına maliyet konvansiyonel ya da otomatize sistemlerden çok daha düşük olduğunu görülmektedir. 2009 yılında Seng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada biyokimyasal testlerin MALDI-TOF MS analizine göre dört kat daha pahalı olduğu bildirilmiştir (30).

Protein ekstraksiyonu yapmadan direkt örnekten yapılan incelemelerde analiz süresi 6-9 dakika sürmektedir. Tek bir örnek için ekstraksiyon protokolü uygulanacak olursa bu da 6 dakika sürmektedir. Protein ekstraksiyonu yapılsa bile geçecek maksimum süre 15 dakikadan fazla olmamaktadır. Bu süre hem otomatize sistemlerle hem de konvansiyonel yöntemlerle yapılan tanımlama işleminden çok daha kısadır. Şu an itibariyle idrar hariç direkt örnekten çalışılamaması bugün için yöntemin bir eksikliği olarak değerlendirilmektedir. Moleküler yöntemlerle kıyaslayacak olursak; moleküler yöntemler pahalı ve rutin için uygun olmayan yöntemlerdir. Bu yöntemlerle tek bir test ile ancak sınırlı sayıda mikroorganizma için analiz yapılabilmektedir ayrıca moleküler yöntemler için gerekli olan süre de MALDI-TOF MS'den daha uzundur.

Bu cihazla çalışılan laboratuvarlarda, laboratuvarın kalite programı dâhilinde cihazın kullanımıyla ilişkili eğitim belirli aralıklarla ve çalışma yönteminde değişiklik olduğunda yapılmalı, yeni göreve başlayan personelin de bu eğitimden geçmesi sağlanmalıdır.

MALDI-TOF MS; agar ya da sıvı besiyerine ekilmiş kültürlerden hızlı tanımlama yapılmasına imkân veren, hatta pozitif kan kültürü şişelerinden pasaj yapılmadan direkt olarak tanımlama yapabilmeye imkân tanıyan, yeni gelişmekte olan ve yakın bir gelecekte cihazın yaygınlaşması ve fiyatının ucuzlaması ile konvansiyonel ve otomatize bakteri tanımlama yöntemlerinin yerini alabilecek bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2): 380-407.
2. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;93(3):965-74.
3. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem. 1975;47: 219-25.
4. Heller DN, Cotter RJ, Fenselau C, Uy OM. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. Anal Chem. 1987; 59: 2806-09.
5. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat Biotechnol. 1996;14: 1584–86.
6. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10: 1227–32.
7. Marvin LF, Roberts MA, Faya LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Clin Chim Acta. 2003;337(1-2):11–21.
8. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. J Clin Microbiol. 2011;49: 693–96.
9. Suh MJ & Limbach PA. Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/

ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng). 2004;10: 89–99.

10. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2005;71: 58–64.
11. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionizationtime- of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. Clin Lab. 2009; 55: 289–96.
12. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009; 49: 543–51.
13. Holler JG, Pedersen LK, Calum H, 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. Scand J Infect Dis. 2011;43(3):234–37.
14. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2008;74: 5402– 07.
15. Mellmann A, Cloud J, Maier T, 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. J Clin Microbiol. 2008;46: 1946–54.
16. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1481–83.
17. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010;48(2):444–47.
18. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1549–54.
19. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of two matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. J Clin Microbiol. 2010;48: 1169–75.
20. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010;48: 4481–86.
21. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010;48(3):900– 07.
22. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect. 2010;16(11): 1614-19.
23. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Munoz-Bellido JL, Gonzalez-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. Clin Microbiol Infect. 2010;17: 1007–12.
24. Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT (bioMerieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. Clin Microbiol Infect. 2011;17: 192–95.
25. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, et al. Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of Candida species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2012 ;50(1):176-79.
26. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry. J Med Microbiol. 2000; 49: 295–300.
27. Marinach C, Alanio A, Palous M et al. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of Candida albicans and fluconazole. Proteomics. 2009; 9: 4627–31.
28. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM. MALDI-TOFMS for rapid detection of staphylococcal Panton–Valentine leukocidin. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34: 467–70.
29. Peng J, Yang F, Xiong Z, Guo J, Du J, Hu Y, Jin Q. Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis. J Clin Virol.2013;56(2):170-74.
30. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009;49: 543–51.