

# **Salmonella Türlerinin Hızlı Tanısında Kromojenik Besiyeri İle Birlikte "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry" Yönteminin Phoenix Otomatize Sistemi ile Kıyaslanması**

Işın AKYAR \*  Simgе CAN \*\*

\* Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Üsküdar, İstanbul - TÜRKİYE

\*\* Acıbadem Labmed Klinik Laboratuvarları, Fahrettin Kerim Gökay Cad. No: 49 Altunizade/Üsküdar, İstanbul - TÜRKİYE

**Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-7822**

## **Özet**

İnsan ve hayvanlarda gıda ile bulaşan hastalıklara yol açan etkenlerin en başta gelenlerinden biri olan *Salmonella* identifikasyonu genellikle 2-3 günden fazla sürmektedir. Kütle spektrometrisi esasına dayanan bir yöntem olan MALDI-TOF ile rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan otomatize sistemlere göre daha kısa sürede, güvenilir ve maliyet etkin sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) yönteminin Phoenix otomatize identifikasyon sistemi ile karşılaştırmasını yaparak bu patojen organizmaların yol açtığı gastrointestinal enfeksiyonlarda kısa sürede sonuç veren, pratik, maliyet etkin ve güvenilir bir yöntem olduğunun değerlendirilmesidir. Ağustos 2007 ve Ağustos 2011 tarihleri arasında toplanan 11186 hasta örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta örnekleri rutin olarak CHROMagar *Salmonella* plus ve Mac Conkey agar besiyerlerine ekilmiştir. 347 *Salmonella* türü hem Phoenix otomatize sisteminde hem de MALDI-TOF cihazında çalışılmıştır. 2 yöntemin sonuçları birbirine %100 uyumludur. Her iki cihazda da tür düzeyinde tanımlama yapılabilmekte, alttür tanımlamaları için konvansiyonel olarak *Salmonella* antiserumları ile serolojik tiplendirmeye gereksinim duyulmaktadır. CHROMagar *Salmonella* plus besiyerinin MALDI-TOF ile birlikte kullanımı identifikasyon için gereken zamanı azaltmış, *Salmonella* türlerinin kolaylıkla isimlendirilmelerini sağlamıştır. MALDI-TOF'un rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kullanımı *Salmonella* türlerinin tek bir besiyeri ile ve 48 saat içerisinde antibiyotik duyarlılıkları ile birlikte maliyet-etkin ve güvenilir bir şekilde saptanabilmesini sağlamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** *Salmonella*, Kültür ortamları, Matris yardımcı-lazer salmalı-iyonizasyon kütle spektrometrisi

## **Comparison of "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry" Plus Chromogenic Media with Phoenix Automated System in the Rapid Diagnosis of *Salmonella* Species**

### **Summary**

The identification of *Salmonella* which is a major food-borne pathogen generally takes more than 2-3 days. More reliable, rapid and cost effective results can be achieved with MALDI-TOF which is based on mass spectrometry principles in comparison with the automated systems in routine microbiology laboratories. The aim of this study is to evaluate the use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) in gastrointestinal infections caused by those pathogen microorganisms by using practical cost-effective and reliable methods within a less time period. Between August 2007 and August 2011, 11186 stool specimens of patients were included to the study. Patient samples were routinely inoculated onto CHROMagar *Salmonella* plus and Mac Conkey agar media. 347 *Salmonella* species were run with both Phoenix automated system and MALDI-TOF. The results of both of the methods are 100% concordant with each other. Using Chromogagar *Salmonella* plus media together with MALDI-TOF identification shortened the time, helped to detect *Salmonella* species easily. Species identifications are being performed in both of the systems, but identification of subspecies still require conventionally serological typing with *Salmonella* antiserums. MALDI-TOF will help the routine clinical microbiology laboratory to detect *Salmonella* rapidly with only one media and in 48 h together with their antibiotic susceptibility testings in a cost-effective and reliable manner.

**Keywords:** *Salmonella*, Culture media, Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry



**İletişim (Correspondence)**



+90 216 5443727



isinakyar@gmail.com

## GİRİŞ

*Salmonella*, insan ve hayvanlarda gıda ile bulaşan hastalıklara yol açan ve tüm dünyada sporadik olgulara ve gastroenterit salgınlarına neden olan mikroorganizmaların başında gelmektedir. Her yıl 16 milyar olgu görülmekte ve bunların 600.000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır. *Salmonella* türleri gram-negatif fakültatif hücre içi anaerob bakteriler olup çok geniş bir hastalık spektrumuna sahip bakterilerdir. Bu spektrum gastroenteritten, enterik ateşe, bakteriyemiye, fokal enfeksiyonlara, konvalesan yaşam boyu taşıyıcı konumuna dek değişebilmektedir. Enfeksiyonun türü *Salmonella*'nın serotipine ve konak faktörlerine göre değişiklik göstermektedir. *Salmonella* enfeksiyonlarının yüzde doksan beşi gıda kökenlidir<sup>1</sup>. *Salmonella* türleri birçok hayvanın gastrointestinal sisteminde bulunmaktadır. Bu nedenle hayvanlarla ya da hayvan kaynaklı gıdalarla temas sıklıkla insanlarda salmonellozise yol açmaktadır. *Salmonella* enfeksiyonlarının önlenmesi kümeslerde ve endüstriyel üretim alanlarında iyi bir örneklem planı ile birlikte hızlı, duyarlı ve güvenilir izleme ve tarama programları ile elde edilebilir<sup>2</sup>. Bir kez enfeksiyon geliştikten sonra salmonellozis belirgin bir morbidite ve mortaliteye yol açar. Tedavi edilmeyen hastaların üçte birinde komplikasyonlar gelişir ve bu olgular salmonellozise bağlı ölümlerin dörtte üçünden sorumludurlar. Tüm dünyada 2.500 serotip tanımlanmıştır. İnsanlar en fazla *Salmonella enterica*, *typhi* ve *choleraesuis* alttürleri ile enfekte olmaktadır<sup>3</sup>. *Salmonella* türleri çevrede çok fazla miktarlarda bulunmakta ve belli bazı konak faktörleri insanları enfeksiyona karşı duyarlı kılmaktadır. Tüm dünyada prevalansı, virülansı ve çevreye uyum sağlayabilirliği ile birlikte antibiyotiklere karşı direnci de artış göstermektedir<sup>4</sup>.

Klinik örneklerden koliform gram negatif bakterilerin ve diğer enterik patojenlerin izolasyonu ve ayırıcı tanısında en fazla kullanılan besiyerlerinin başında Mac Conkey ve Drigalski agar gelmektedir. Ancak bu besiyerlerinin *Salmonella* açısından ayırıcı olma özelliği pek fazla yoktur, bunun nedeni yalnızca laktöz kullanımının saptanmasına bağlı olmasıdır<sup>5</sup>. *Salmonella* da dahil patojenik mikroorganizmaların hızlı ve güvenilir identifikasyonları gıda kökenli hastalıkların sürveyans, korunma ve kontrolünde çok önem kazanmaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bakterilerin identifikasyonunda kullanılan yöntemler sıklıkla zahmetli ve zaman kaybettirici olabilmektedir. Bakterinin saflaştırılması için zaman gerekmekte, patojenik bakterilerin biyokimyasal tiplendirilme prosedürleri için de uzun inkübasyon sürelerine gereksinim duyulmakta ve bu nedenle de bakterinin isimlendirilmesinde gecikmeler yaşanmaktadır. Uygulanan işlemlerin sonuçlarının değerlendirilmesi de deneyim gerektirmekte, böylelikle bu yöntemler sübjektiflik ve kullanılan yöntemin özgüllüğünün düşük olması ile sınırlanmaktadır. Mikroorganizmaların hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlarına olan gereksinim gittikçe artmaktadır<sup>4</sup>. *Salmonella* taramasında kullanılmak üzere *Salmonella*'ya özgü enzimleri saptayabilecek kromojenik substratlar içeren besiyerleri geliştirilmiştir<sup>6</sup>. Bu besiyerleri ile yapılan çalışmalarda diğer

konvansiyonel besiyerleri ile kıyaslandığında doğrulama için gereken biyokimyasal ve serolojik testlerle birlikte gereken sürenin yaklaşık olarak 24 saat kıaldığı gösterilmiştir<sup>7</sup>. Bu besiyerleri kullanılarak *Salmonella* türlerinin tanısında yüksek oranda duyarlılık ve özgüllük sağlandığı, ayrıca tanının konması için gereken sürenin azalmasının yanısıra yapılan maliyet analizinde de kullanılan besiyerleri ve teknisyen zamanı hesaplandığında maliyetin de %26 azaldığı gösterilmiştir<sup>8</sup>.

Biz de laboratuvarımızda rutin olarak dışkı kültürlerinin incelenmesi sırasında *Salmonella* CHROMagar plus (CHROMagar Microbiology, Fransa) besiyerinden yukarıda belirtilen tüm nitelikleri nedeniyle yaklaşık 5 yıldır yararlanmaktayız.

Son yıllarda, "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)—Time of Flight (TOF) mass spectrometry (MS) yöntemi ile mikroorganizmaların tanımlanmaları uygunluğu açısından gittikçe daha fazla uygulanan bir yöntem olmaya başlamıştır<sup>9,10</sup>. MALDI-TOF MS yönteminde tipik "parmak izi" görüntüsü tüm hücre kullanımı ile gerçekleşmekte ve önceden biyobelirteç ile ayırım, parçalama, farklı şekillerde ayırma ya da temizlik gerektirmeksizin elde edilebilmektedir. Yöntem çok hızlı sonuç vermesi, çok az biyolojik malzemeye gereksinim göstermesi (alınan koloni miktarı) ve çok fazla örneği bulunan rutin laboratuvarlarda kullanıma uygun olması nedeniyle klinik mikrobiyoloji ve gıda ve laboratuvarları uygulamaları için büyük bir potansiyele sahiptir. Gözlenen protein biyobelirteçleri tipik olarak incelenen mikroorganizmaya özgü proteinlere aittir, bunlar arasında ribozomal ya da nükleik asit bağlayan proteinler bulunmaktadır<sup>11</sup>.

Çalışmamızda *Salmonella* türlerinin saptanmasında birçok laboratuvarında kullanılan otomatize sistemlerden biri olan Phoenix (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) ile MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) yönteminin kıyaslanarak rutin laboratuvar uygulamalarında hız, uygulama kolaylığı, doğru saptama ve maliyet-etkinlik açısından yararlılığının değerlendirilmesini amaçladık. Ayrıca birlikte kullandığımız *Salmonella* Plus CHROMagar besiyeri ile de klasik besiyerlerine göre yaklaşık olarak 24 saat gibi bir süre kazanımını hedefledik.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Ağustos 2007 ve Ağustos 2011 tarihleri arasında kurumumuza bağlı 16 hastaneden karın ağrısı, bulantı, kusma ve diyare bulguları ve genel olarak orta şiddette rahatsızlıkları bulunan 11186 hastadan toplanan dışkı örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada iki besiyeri kullanılmıştır. Bunlardan bir tanesi dışkıda *Salmonella* ve *Shigella* varlığını araştırmada rutin olarak kullanılan klasik besiyerlerinden bir tanesi olan Mac Conkey agardır. Bu besiyerinde laktöz negatif koloniler şeffaf olarak görülmekte ve değerlendirmeye alınarak ileri işlemler uygulanmaktadır. Bir diğeri ise son yıllarda birçok çalışma yapılarak güvenilirliği kanıtlanmış kromojenik

bir besiyeri olan CHROMagar *Salmonella* plus besiyeridir. Besiyerinde üremiş pembe koloniler *Salmonella* şüphesi ile ileri işleme alınmaktadır. Bu besiyeri *Salmonella* üretebilmek için kullanılmaktadır, klasik olarak dışkı kültüründe araştırılması gereken *Shigella* türlerini üretememektedir. *Shigella* üretebilmek amacıyla yukarıda belirtilen Mac Conkey besiyeri kullanılmıştır. Bu çalışmada örneklerle birlikte referans suş *Salmonella Enterica subsp. enterica* ATCC 13076 da aynı şekilde tüm işlemlerden geçirilmiştir.

### Metot

Çalışma iki kısımda gerçekleştirilmiştir: Bunlardan birincisinde örnekler 2007-2011 yılları arasında *Salmonella* CHROMagar plus ile birlikte Mac Conkey agar besiyerleri ve Phoenix otomatize cihazı ile çalışılmıştır. Bu örneklerden izole edilmiş ve *Salmonella* olarak tanımlanmış mikroorganizmalar -80°C'de saklanmıştır. 2011 yılında daha önce *Salmonella* olarak tanımlanmış ve saklanmış olan bu suşlar tekrar *Salmonella* CHROMagar plus ve Mac Conkey besiyerlerine ekilerek canlandırılmış ve MALDI-TOF yöntemi ile tekrar çalışmaya alınarak Phoenix otomatize sistemi ile MALDI-TOF yöntemi karşılaştırılmıştır. Çalışma için Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Araştırmaları Değerlendirme Komisyonundan 04.01.2010 tarihinde 2010/132 karar numarası ile Etik Kurul onayı alınmıştır.

### I. Phoenix Otomatize Sistemi ile Çalışma

Çalışmanın birinci kısmında *Salmonella* türleri *Salmonella* CHROMagar plus ile birlikte Mac Conkey agara ekim yapılarak, *Salmonella* CHROMagar plusda pembe koloniler ve Mac Conkey agarda laktoz negatif şeffaf koloniler değerlendirilerek Phoenix otomatize cihazında NMIC paneli (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) kullanılarak çalışılmıştır. *Salmonella* olarak tanımlanan ve biyokimyasal reaksiyonlar ile doğrulanan mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları da yine Phoenix otomatize sistemine göre Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)'a uygun olarak rapor edilmiştir<sup>12</sup>.

### II. Biyokimyasal Reaksiyonlar ile Doğrulama

*Salmonella* şüpheli olan bu koloniler aynı zamanda triple şeker iron (TSI) agar ve üreaz besiyerine de ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon sonrasında TSI'de dip kısmının sarı olması glikozun kullanımı; siyah olması hidrojen sülfür oluşumu; yüzeyin kırmızı olması laktoz ve sakkarozun kullanılmaması; besiyerinde gaz delikleri ve yarıklarının olması veya dip kısmından sonra yukarı doğru itilmesi glikozdan gaz oluşması *Salmonella*'yı doğrulamıştır. *Salmonella* analizinde tipik reaksiyonlardan birisi olan "hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) oluşumu" reaksiyonu *Salmonella*'da pozitif, *Escherichia coli*'de negatiftir. *Shigella* besiyerinin eğri yüzeyinde alkali, dip kısmında asit reaksiyon oluşturur. Tüpün dip kısmında değişiklik yapmaz, H<sub>2</sub>S ve gaz üretmez. *E. coli* ise tüpün eğri yüzeyinde ve dip kısmında asit reaksiyona neden olur. H<sub>2</sub>S negatif ve gaz pozitifdir. TSI agarda *Proteus Salmonella*'ya benzer reaksiyon verdiği için kesin ayırım için üreaz besiyerine de ekilmişlerdir. Üreaz testi negatif olanlar *Salmonella*, pozitif olanlar ise *Proteus* olarak kabul edilmişlerdir. Saptanan *Salmonella*'la-

rın alttür tanımlamaları ise antiserumlar (Denka-Seiken, Tokio, Japan) yardımı ile Kaufmann-White şemasına göre yapılmıştır<sup>13</sup>.

Çalışma sonucunda CHROMagar *Salmonella* besiyerinin duyarlılığının %100, özgüllüğünün ise %85 olduğu saptanmıştır. Mac Conkey besiyerinin duyarlılığı ise %70 ve özgüllüğü de %60 olarak saptanmıştır. CHROMagar *Salmonella* besiyeri ile yalancı pozitif olarak saptanan suşlar hem Phoenix otomatize sistemi hem de MALDI-TOF ile çalışılmış ve *Salmonella* olmadıkları gösterilmiştir. Mac Conkey besiyerinde şeffaf koloni oluşturan, ancak *Salmonella* olarak tanımlanmayan koloniler ise *Shigella* varlığı açısından araştırılmış, TSI ve üre besiyerlerindeki görüntüleri incelenmiş ve *Shigella* antiserumları (BD Difco *Shigella* Antiserum, Sparks, ABD) ile tiplendirmeleri yapılmıştır.

### III. MALDI-TOF Yöntemi ile Çalışma

Çalışmanın ikinci kısmında daha önce yukarıda anlatıldığı gibi çalışıldıktan sonra -80°C'de dondurularak saklanan bu suşlar tekrar canlandırılarak MALDI-TOF ile incelenmişlerdir.

MALDI-TOF MS yöntemi rutin laboratuvarlarda kullanılan biyokimyasal reaksiyonların incelenmesi esasına dayanan otomatize sistemlerden farklı olarak çalışmaktadır. Otomatize sistemlerde mikroorganizmaya ait çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar değerlendirilerek tanımlama yapılmaktadır. Oysa ki bir kütle spektrometrisi yöntemi olan MALDI-TOF yönteminde mikroorganizmaya ait protein profili incelenmektedir. Bu sistem çalışması sırasında kendisine ait kalibrasyon kontrolü (myoglobin), pozitif kontroller: bir gram negatif (örn. *E. coli*), bir gram pozitif (örn. *S. aureus*) referans suş ve bir de negatif kontrol (örn. distile su) kullanılmaktadır.

**MALDI-TOF Çalışma Prensipleri:** MALDI-TOF MS yönteminde *Salmonella* şüpheli koloniden alınan az bir miktar "target" adı verilen cihaza ait metal bir tepsi üzerinde belirlenmiş alanlara yerleştirilip kuruması beklenir. 1'er µL matris daha sonra örnekler üzerine eklenir, tekrar havada kurutmaya bırakılır. Matris solüsyonu içerisinde %50 "asetonitril" ve %2.5 "trifluoroasetik asit" içinde doymuş "α-cyano-4-hidroksisinnamik asit" bulunmaktadır. Örnekler hazırlandıktan sonra target olarak isimlendirilen plak "Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)" cihazına yüklenir ve işlem başlatılır. 4.000-10.000 Da kütle aralığında 20 Hz'lik bir lazer vuruş sıklığı ile lineer pozitif iyon modeli olarak elde edilen spektrum otomatik olarak kaydedilir. Her bir spektrum için örnek alanına yapılan 100 kısa aşamada 600 uygun vuruş elde edilir. Kullanılan programa özel ayarlanmış lazer atışları yardımı ile matris ışığı emer ve örneğin molekülleri iyonize hale geçip cihazın tüpü içerisinde molekül ağırlığına göre uçmaya başlar. Dijital hale çevrilen veriler TOF (time of flight- uçuş zamanı) oluşturmak üzere biriktirilir ve cihaz içerisinde bulunan bir detektör yardımı ile saptanır. Çalışmamızda "Autoflex II Smartbeam MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya)" kullanılmıştır. Mikroorganizmalara ait protein moleküllerinin pik-

leri "Biotyper" (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile tanımlanmıştır. Skor değerleri güvenli okuma sınırı olan 2.00'nin üzerinde olan sonuçlar doğru olarak kabul edilmişlerdir. Bu skor değerine ulaşmamış sonuçlar daha hassas bir sonuç elde etmek amacıyla formik asit asetonitril ekstraksiyonu yapılarak tekrar çalışmaya alınmışlar ve 2.00'nin üzerinde bir skor değeri elde edilmiştir. Kütle spektrometrisi "FlexAnalysis software version 3.0" (Bruker Daltonik, Bremen, Almanya) programı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin analizi "MALDI Biotyper software version 3.0" (Bruker Daltonik GmbH, Almanya) ile analiz edilerek çalışılan mikroorganizmalar isimlendirilmiştir.

## BULGULAR

*Salmonella* CHROMagar Plus besiyerinde saptanan pembe/leylek rengi koloniler şüpheli olarak kabul edilip araştırılmıştır. Bununla birlikte kullanılan Mac Conkey agar besiyerinde de şeffaf koloni varlığı gözlenerek laktoz negatif bakteri varlığı araştırılmış, rutin dışkı kültürlerinde *Salmonella* ile birlikte mutlaka araştırılması gereken *Shigella* da araştırılmıştır.

37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında *Salmonella* CHROMagar Plus besiyerinde pembe/leylek rengi *Salmonella* kolonileri en iyi şekilde gözlenebilmiştir. Çalışmada kullanılan referans suş *Salmonella enterica subsp. enterica* ATCC 13076 da diğer *Salmonella* türleri gibi *Salmonella* CHROMagar plus besiyerinde pembe koloniler oluşturmuştur. 4 yıllık bir süre içerisinde 347 *Salmonella* türü saptanmıştır. Saptanan 347 *Salmonella* türü 7 farklı serovardan oluşmaktadır. *Salmonella* türlerinin antiserumlar ile saptanan alttürleri ve sayıları Tablo 1'de belirtildiği gibidir.

Her bir *Salmonella* için MALDI-TOF MS'de tipik olarak 2.000 ve 25.000 Da arasında ve genellikle 300 pikten daha fazla pik saptanmıştır. Bunlar arasında *Salmonella*'ya özgü pikler de bulunmaktadır. Bu nedenle de MALDI-TOF cihazıyla

**Tablo 1.** Çalışmada incelenen *Salmonella* türleri ve alt türleri  
**Table 1.** *Salmonella* species and subspecies in the study

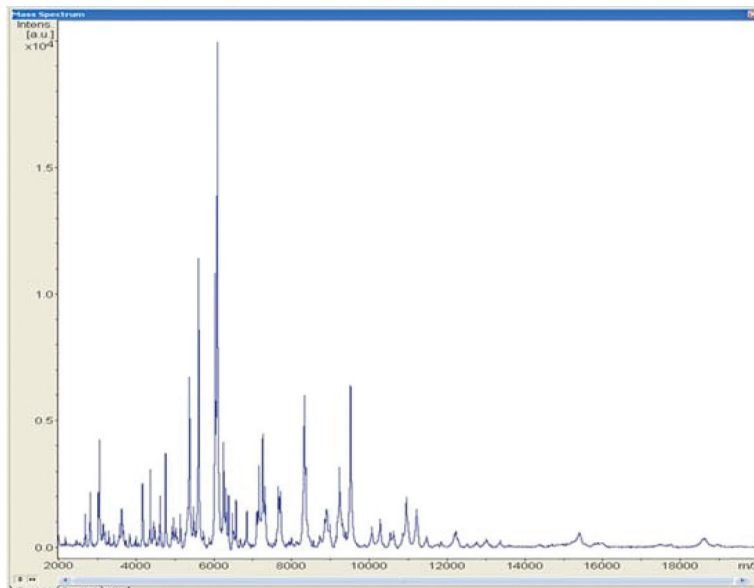
Mikroorganizma	Sayı/(%)
<i>Salmonella(S) enteritidis</i>	190/(54.8)
<i>S. gallinarum/pullorum</i>	144/(41.5)
<i>S. paratyphi B</i>	5/(1.4)
<i>S. typhimurium</i>	4/(1.2)
<i>S. paratyphi A</i>	2/(0.6)
<i>S. typhi</i>	1/(0.3)
<i>S. paratyphi C</i>	1/(0.3)

birlikte kullanılan ve içerisinde *Salmonella* türlerinin de bulunduğu bir veritabanı içeren ve mikroorganizmalara özgü piklere dayanarak mikroorganizma tiplendirmesi yapan "Biotyper" ile isimlendirilebilmişlerdir. *Salmonella* türlerinin MALDI-TOF MS'de "parmak izi" görünümü Şekil 1'de verilmiştir. Çalışma sırasında hiç *Shigella* saptanmamıştır.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre Phoenix otomatize sistemi ile *Salmonella* spp. Olarak tanımlanan tüm suşlar MALDI-TOF'da da güvenli okuma sınırı olan 2'nin üzerinde skorlar ile *Salmonella* olarak tanımlanmışlardır.

MALDI-TOF'un başarısı Phoenix otomatize cihazı ile *Salmonella* olarak tanımlanan, biyokimyasal reaksiyonları ile kontrol edilen ve antiserumlar ile alttürleri saptanan suşlarda tür saptamada %100 iken alttür saptama açısından %54.8'de kalmıştır. Alttürlerde antiserumlarla yapılan tiplendirme esas alınmıştır. Buna göre *Salmonella* türlerinden MALDI-TOF ile ancak *Salmonella enteritidis* alttür düzeyinde tanımlanabilmiş, diğer alttürlerin tanımı yapılamamıştır. Phoenix otomatize sistemi ile alttür hiçbir şekilde saptanamaz iken avantaj olarak MALDI-TOF ile en azından klinik örneklerden



**Şekil 1.** *Salmonella* türlerinin MALDI-TOF MS'de "parmak izi" görünümü

**Figure 1.** "Fingerprinting" image of *Salmonella* species at MALDI-TOF MS

en sık izole edilen *Salmonella enteritidis* alttürü saptanabilmektedir. Süre açısından sonuçlarımız incelendiğinde CHROMagar *Salmonella* besiyerinin kullanılması ile saflaştırma işlemine gerek kalmadığı için en azından 24 saat buradan kazanılmaktadır. Çalışmanın tür saptama için gereken süresi Phoenix otomatize sisteminde yaklaşık 18-24 saat, MALDI-TOF sisteminde ise yaklaşık olarak 20 dak. civarındadır. Yani MALDI-TOF ile otomatize sisteme göre çok daha çabuk sonuç alınmakta ve yaklaşık olarak 24 saatlik bir kazanç da buradan elde edilmektedir. Bir başka dikkat çekici nokta ise de, MALDI-TOF yöntemi Phoenix otomatize sisteminin %10'u kadar bir maliyete sahip olmasıdır.

MALDI-TOF MS yöntemi ile mikroorganizmaların tanımlanmaları son yıllarda gittikçe daha fazla tercih edilen bir yöntem olmuştur. Bu yöntem ile örneğin tüm bakteri hücrelerinden protein profilleri çıkarılabilmektedir. Bu profillerin burada kullanılan "Biotyper" programı gibi referans bir spektra ile karşılaştırılmaları sonucu ile bakteriler kolaylıkla tanımlanabilmektedirler<sup>14</sup>. Son yıllarda bu yöntem ile *Escherichia coli* ve *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyeleri gibi gram negatif basiller, *Staphylococcus aureus* ve streptokoklar gibi gram-pozitif koklar; *Bacillus cereus* ve *Listeria* türleri gibi bazı gram-pozitif basiller üzerinde çalışılarak farklı bakteri türlerinin tanımlama nitelikleri üzerinde çalışılmıştır. 2009 yılında da Seng ve arkadaşları tarafından klinik örneklerden izole edilen bakteriler üzerinde yapılmış ilk çalışma yayınlanmıştır<sup>15-21</sup>. Günümüzde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarına giren bu yöntem yapılan araştırma çalışmaları ile de gittikçe daha fazla yarar sağlamaktadır. Hızlı tanı konabilmesinin yanı sıra maliyet açısından da avantaja sahiptir. Kullanılan malzemeler otomatize sistemlerin sarf malzemelerine göre yaklaşık olarak 10 kat daha ekonomiktir. Gastroenterit etkenleri arasında önemli bir yere sahip olan *Salmonella* türlerinin hızlı tanısında MALDI-TOF MS kullanımı yarar sağlayan bir yöntemdir. Bu konuda yapılmış bazı çalışmalar bulunmaktadır. Sparbier ve arkadaşları yaptıkları çalışmada öncelikle Selenit F besiyerine ardından Hektoen enterik agara ekim ile birlikte burada birinci günde üreyen *Salmonella* şüpheli bakterileri MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlamışlardır. 4847 örnek üzerinde çalışmış ve 108 örnekte *Salmonella* tanımlamışlardır<sup>22</sup>.

Biz çalışmamızda klasik besiyerleri ile daha önce karşılaştırma çalışmaları yapılmış, güvenilirliğini kanıtlamış bir krojenik besiyeri olan CHROMagar *Salmonella* plus besiyerini kullanmayı tercih ettik<sup>23-26</sup>. *Salmonella* türü bakterilerin bu besiyerinde yaptıkları tipik koloni görünümü ve rengi (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A* ve laktöz pozitif *Salmonella* bu besiyerinde pembe/leylek rengi olarak görülür) nedeni ile ayrıca zaman kaybettirici saflaştırma işlemlerine gerek kalmamaktadır<sup>6</sup>. Klasik olarak kullanılan konvansiyonel besiyerlerinde şüpheli olarak görülen kolonilerin saflaştırma işlemine alınması ve sonuçlarının değerlendirilmesi için yaklaşık olarak 1-2 güne gereksinim vardır. Bizim de çalışmamızda, CHROMagar *Salmonella* plus besiyerinde kolaylıkla saptanan bakteriler, saflaştırma işlemine gerek duyulmaksızın tür tayini için kullanılabilirlerdir. Mac Conkey besiyerinde laktöz negatif koloni

oluşturan suşların saflaştırma için işleme alınmaları ve isimlendirilmeleri için geçen sürenin CHROMagar *Salmonella* plus besiyerinde üremiş *Salmonella* şüpheli kolonilerin tür tayini yapılmasına kıyasla 24-48 saat daha fazla olduğu ve bu durumun daha geç raporlamaya yol açabileceği gözlenmiştir. *Salmonella* türlerinde MALDI-TOF MS ile tür saptanması son derece başarılı iken tüm alttürlerin tanısında henüz çok güvenli değildir. Bu konuda çalışmalar halen sürmektedir. Bizim de çalışmamızda benzer sonuçlar elde edilmiştir. MALDI-TOF ile tür düzeyinde %100 başarılı sonuç elde edilmesine karşın alttür düzeyinde yalnızca *Salmonella enteritidis'* de başarı sağlanmıştır. Diğerlerinin okumaları güvenli okuma sınırının altında altında olduğu ve antiserumlarla elde edilen alttür sonuçlarıyla da uyum göstermediği için başarılı okuma olarak kabul edilmemişlerdir. Dieckman ve ark. en çok rastlanan alttürlerden olan *S. enterica subsp. enterica* izolatlarının bu yöntemle güvenli bir şekilde tanımlanabileceğini göstermiş ve böylelikle antiserum kullanımına daha az başvurulabileceğini savunmuşlardır<sup>26</sup>. Bu çalışmada da en fazla saptanan *S. enteritidis*, *Salmonella enterica* grubu içerisindedir ve saptanan *Salmonella*'ların %55'lik bir kısmını oluşturmaktadır. 2012 yılında yapılan yeni bir çalışmada ise yine MALDI-TOF kullanılarak *S. Typhi*'nin ayırımının tüm diğer *Salmonella* serotiplerinden oluşturulan bir "ortalama delta skoru" ile yapılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada enfeksiyonlara yol açan *Salmonella enterica* alttürlerinin en önemli grubunun MALDI-TOF ile saptanabildiği belirtilmektedir<sup>27</sup>. Bu konuda çok daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim olmakla birlikte bu çalışmaların sevindirici olan bir yönü en fazla hastalık etkeni olan *Salmonella* türlerini saptayabilmeleri ve dolayısı ile daha hızlı *Salmonella* tanımlanmasına izin vermeleridir. Ülkemizde de *Salmonella* türlerinin gastroenterit salgınlarından çoklu ilaç dirençli hastane enfeksiyonlarına dek uzanan geniş bir yelpazede enfeksiyonlara yol açabildikleri gösterilmiştir<sup>28,29</sup>. Güvenilir ve daha hızlı yöntemler kullanılması erken tanı konmasını, erken tedaviye başlanmasını ve olası salgınların kontrol altına alınmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak, *Salmonella*'ların hızlı tanısında maliyet etkin ve güvenilir bir yöntem olarak CHROMagar *Salmonella* plus besiyeri ile birlikte MALDI-TOF MS yönteminin kullanılması önerilebilir. Klasik yöntemlere, besiyerlerine ve Phoenix otomatize sistemine göre ortalama olarak en az 24-48 saat erken sonuç alınabilecek bu yöntem ile ilk 24 saat içerisinde *Salmonella* tür tayini yapılabilir, antiserum kullanımı ile de alttür tanımı verilebilir. Antibiyotik duyarlılık testi de çalışılarak hastaya hastaneye başvurduktan sonra 48 saat içerisinde hızlı, güvenilir ve maliyet etkin bir şekilde raporlama yapılabilmesi sağlanabilir.

## KAYNAKLAR

1. Camara JE, Hays FA: Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 389, 1633-1638, 2007.
2. Mirhosseini SZ, Seidavi A, Shivazad M, Chamani M, Sadeghi AA, Pourseify R: Detection of *Salmonella* spp. in gastrointestinal tract of broiler chickens by polymerase chain reaction. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (6):

965-970, 2009.

- 3. Boyd EF, Li J, Ochman H, Selander RK:** Comparative genetics of the inv-pia invasion gene complex of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 179, 1985-1991, 1997.
- 4. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B:** Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 74 (24): 7767-7778, 2008.
- 5. Ohkusu K:** Cost-effective and rapid presumptive identification of Gram negative Bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: Evaluation of the use of CHROMagar orientation medium in conjunction with simple biochemical tests. *J Clin Microbiol*, 38 (12): 4586-4592, 2000.
- 6. Chromagar Salmonella plus:** [http://www.chromagar.com/produit.php?PARAM\\_NAVIGATION=clinical](http://www.chromagar.com/produit.php?PARAM_NAVIGATION=clinical), Accessed: 07.06.2012.
- 7. Eigner U, Reissbrodt R, Hammann R, Fahr AM:** Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* species from stool specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20 (8): 558-565, 2001.
- 8. Maddocks S, Olma T, Chen S:** Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and xylose-lysine-desoxycholate and Salmonella-Shigella agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *J Clin Microbiol*, 40 (8): 2999-3003, 2002.
- 9. Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE:** Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: A combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics*, 6, 6416-6425, 2006.
- 10. Friedrichs C, Rodloff AC, Chatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K:** Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol*, 45, 2392-2397, 2007.
- 11. Pineda FJ, Antoine MD, Demirev PA:** Microorganism identification by matrix assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal Chem*, 75, 3817-3822, 2003.
- 12. Enterobacteriaceae Working Group:** Zone diameter and interpretative minimum inhibitory concentration, interpretative standards for Enterobacteriaceae. In, Clinical Laboratory Standards Institute's Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first Informational Supplement. 1<sup>st</sup> ed., pp. 42-36, Dudley, Patel, Hardy, Ambrose, Pennsylvania, 2011.
- 13. Popoff MY, Bockemuhl YJ, Gheesling LL:** Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, 155, 568-570, 2004.
- 14. Fenselau C, Demirev PA:** Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 20, 157-171, 2001.
- 15. Camara JE, Hays FA:** Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 389, 1633-1638, 2007.
- 16. Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, Leopold PE:** Phyloproteomics: Species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3, 103-112, 2001.
- 17. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB:** Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*, 49, 295-300, 2000.
- 18. Kumar MP, Vairamani M, Raju RP:** Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. *Indian J Med Res*, 119, 283-288, 2004.
- 19. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann Chakraborty ET:** Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5402-5407, 2008.
- 20. Ryzhov V, Hathout Y, Fenselau C:** Rapid characterization of spores of *Bacillus cereus* group bacteria by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 66, 3828-3834, 2000.
- 21. Seng P, Drancourt M, Gouriet F:** Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49, 543-551, 2009.
- 22. Sparbier K, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M:** Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31 (5): 767-773, 2012.
- 23. Perez JM, Cavalli P, Roure C, Renac R, Gille Y, Freydiere AM:** Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *J Clin Microbiol*, 41 (3): 1130-1134, 2003.
- 24. Church DL, Emshey D, Lloyd T, Pitout J:** Clinical and economic evaluation of BBL CHROMagar *Salmonella* (CHROMSal) versus subculture after selenite broth enrichment to CHROMSal and Hektoen enteric agars to detect enteric *Salmonella* in a large regional microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 68 (1): 13-19, 2010.
- 25. van Dijk S, Bruins MJ, Ruijs GJ:** Evaluation and implementation of a chromogenic agar medium for *Salmonella* detection in stool in routine laboratory diagnostics. *J Clin Microbiol*, 47 (2): 456-458, 2009.
- 26. Dieckmann R, Malorny B:** Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 77 (12): 4136-4146, 2011.
- 27. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann, Weig M, Bader O:** Rapid discrimination of *Salmonella enterica* Serovar *Typhi* from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*, 7 (6): 2012, <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0040004>, Accessed: 05.06.2012.
- 28. Ağın H, Ayhan FY, Gülay Z, Gülfidan G, Yaşar N, Eriş B, Devrim I:** The evaluation of clusters of hospital infections due to multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in the neonatal unit: A two-year experience. *Turk J Pediatr*, 53 (5): 517-521, 2011.
- 29. Bayram Y, Gündüçoğlu H, Otlu B, Aypak C, Gürsoy NC, Uluç H, Berktaş M:** Epidemiological characteristics and molecular typing of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* during a waterborne outbreak in Eastern Anatolia. *Ann Trop Med Parasitol*, 105 (5): 359-365, 2011.