

MİKROBİYOLOJİK TANIMLAMADA MALDI-TOF MS

Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanımlanması, mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleri ile gerçekleşmektedir. Kültür yönteminde elde edilen mikroorganizmaların ayırımı ise, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini gösterdikleri fenotipik testlerle yapılmaktadır. Sıklıkla mikroorganizmaların tanısı ve antibiyotik duyarlılık testleri, üreme olduktan 24-48 saat sonra çeşitli otomatize sistemler kullanılarak yapılmaktadır (1).



MİKROBİYOLOJİK TANIMLAMADA MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (Matriks assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan hızlı, ucuz, doğru sonuç veren yeni bir sistemdir (2,3). Bu yöntemde mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmaktadır. Bu profil spektrallarına ait grafiksel görüntüler, sistemin veritabanındaki referans mikroorganizmaların uyumuna göre cins ve tür bazında tanımlayabilmektedir (4).

Günümüzde ayrıca klinik örneklerden, acil tanı ve tedavi gerektiren veya zor ve geç üreyen bakterinin saptanması, tanımlanması ve fenotipik direnci kodlayan genlerin belirlenmesi amacıyla polimeraz zincirleme reaksiyon (PCR) temelli testlerde kullanılmaya başlanmıştır.

MALDI-TOF MS

Kütle spektrometrisi uzun yıllardır özellikle kimya alanında kullanılmakla birlikte mikrobiyoloji alanında kullanımı 1970'lerden itibaren başlamıştır. Anhalt ve Fenselau'nun 1975'te yaptıkları analizlerde, bakterilerin tür ve cins bazında kendilerine has bir kütle spektrallarının olduğu ortaya koyulmuştur (4). Örneklerin hazırlanmasındaki uzun süreç bu uygulamaların rutin mikrobiyoloji alanında kullanılmasına engel olmuştur.

1980 yılların sonu ve 1990'lı yılların başında gelişen soft iyonizasyon tekniklerinin [MALDI ya da elektro spray iyonizasyon (ESI)] sisteme entegre edilmesi ile beraber protein gibi büyük moleküllerin incelenmesine olanak sağlanmıştır (5,6). MALDI-TOF MS, her organizma için özgül olan proteinlerden parmak izi oluşturmakta, bu sayede bakteri ve mantar tanımlaması yapılabilmektedir.

MS CİHAZ VE YÖNTEME GENEL BAKIŞ

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

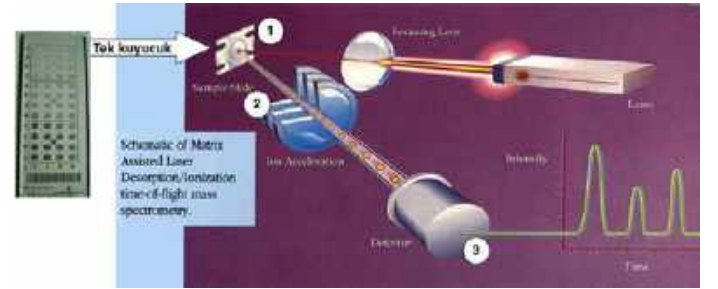
(i) İyonizasyon kaynağı: MALDI ve ESI soft iyonizasyon kaynaklarıdır.

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

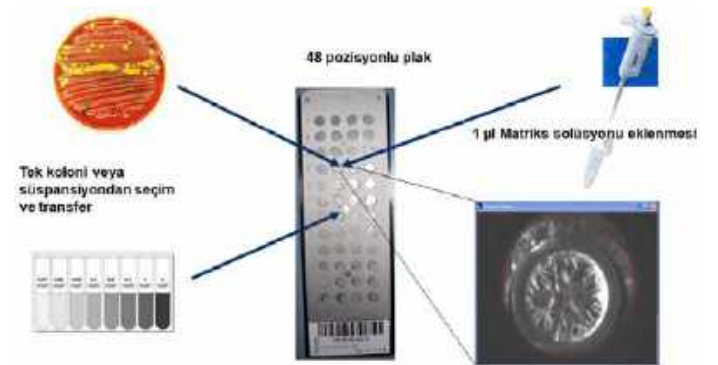
(iii) Algılama bölümü: İyonların kütesinin yüküne bağlı olarak bir analiz yapılmakta, biyomoleküler yoğunluklarına ve bu orana göre sınıflandırmaktadır. (2)

MALDI-TOF MS cihazının çalışma prensibi:

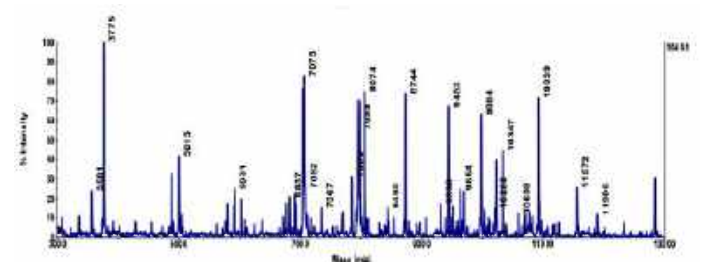
Analiz için kristalize hale gelen örnekler lazer bombardımanına maruz kalır ve lazerden alınan bu enerji, karışımdan iyonların buharlaşmasına ve gaz fazına geçilmesini sağlar. Serbestleşen iyonlar elektromanyetik alanda hızlandırıldıktan sonra uçuş tüpüne geçerler ve uçuş tüpünde geçirdikleri zamana göre kütle ağırlıkları tespit edilir. MALDI ile yapılan dezorbsiyon sonucunda açığa çıkan iyonlar tek yüklü iyonlar olduğundan elde edilen pikler esas olarak kütleyle bağlıdır (Şekil 1).



Şekil:1 MALDI-TOF cihazında elde edilen protein profili ve cihaz kütüphanesinde o mikroorganizmaya ait olan profilin karşılaştırılarak isminin konması



Şekil:2 MALDI-TOF MS'in numune hazırlığı





Şekil:4 MALDI-TOF MS'in analiz ve tanımlaması

Her mikroorganizma için özgün bir spektrum elde edilmesinin sebebi, hücre içinde bol miktarda bulunan orta hidrofobik özelliğe sahip temel protein olan **ribozomal proteinlerden** kaynaklanmaktadır. Ribozomal proteinler mikrobiyal üreme koşullarından, çevresel koşullardan en az etkilenen ve bu yüzden rutin tanımlama için en uygun olan proteinlerdir. (7).

BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

Bakteriyel tanımlama işlemi, örnekten elde edilen bilgilerin veritabanındaki bilgilerle karşılaştırılması sonucu yapılabilmektedir. **VITEK MS V3.2 de IVD veri tabanında onaylı 1095 bakteri ve 221 mantar toplam 1316 mikroorganizma türü bulunmaktadır. Ayrıca araştırma amaçlı RUO veritabanında ise 1445 mikroorganizma yer almaktadır.** MALDI-TOF MS yöntemi daha önceden 16S rRNA gen sekansı ile ayrılabilen yakın türlerin ayrımını bile başarıyla yapabilmektedir (3). Rutin bakteri izolatlarında MALDI-TOF MS'in tür bazında doğru tanımlama oranı %84,1 ile %95,2 arasında değişmektedir (8,9).

Günümüzde rutin mikrobiyoloji laboratuvarında, kültürde üremiş bakterilerin konvansiyonel biyokimyasal yöntemler ya da otomatize yöntemler kullanıldığında; **MALDI-TOF MS'in üstünlükleri:**

- Diğer yöntemlerle tanımlanma, **1-2 gün** sürebilmekte iken, MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlama süresi **1 saate** kadar inebilmektedir.
- Üreyen tek bir koloni bile olsa, MS yöntemiyle koloniyi kaybetmeden çalışma olanağı bulunmaktadır.
- Analizin basitliği ve çabukluğu yöntemin önemine katkıda bulunmaktadır.
- MALDI-TOF MS ile Enterobacteriaceae'lar, non-fermentatif gram negatif bakteriler, stafilokoklar, streptokoklar, diğer bakteriler ve mantarlar hızlı ve kolay bir şekilde tür düzeyinde güvenilir bir şekilde tanımlanabilmektedir(10).
- Özellikle konvansiyonel yöntemlerin çok da yeterli olmadığı gram pozitif basillerin, anaerop ve bazı non-fermentatif bakterilerin tanımlamasında MALDI-TOF MS'in üstün olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (11,12).

MANTARLARIN TANIMLANMASI

Normal konvansiyonel yöntemlerle mantarların tanımlanması günler almakta iken, MALDI-TOF MS ile kısa süre içinde tür bazında tanımlama yapmak mümkün olmaktadır. Yapılan çalışmalar mayaların tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in başarı oranını %85-%100 arasında göstermektedir. Özellikle Candida cinsi mantarların tür bazında doğru olarak tanımlayabilme oranı yüksektir ve yeni versiyonda 55 yeni maya türü ilave olmuştur.(13)

Son yapılan çalışmalarda filamentöz mantarlar ve dermatofitlerde de yüz güldürücü sonuçlar alınmış olup, yeni örnek hazırlama protokolleri oluşturulmaktadır (2).

Ayrıca Mikobakteri türlerinin MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanabileceği gösterilmiştir.

MALDI-TOF MS'in gelecekteki uygulamaları

Son yıllarda MALDI-TOF MS kullanarak;

- Kan ve idrar gibi örneklerden direkt olarak bakterinin saptanması
- Tanımlanması
- Antibiyotiklere karşı direncin hızlı saptanması ile ilgili bir çok çalışma yapılmaktadır. (14, 15).

Bu çalışmalar yakın bir gelecekte standardizasyon sonrası mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin uygulamaya geçecektir.

SONUÇ

MALDI-TOF MS mikrobiyolojide rutinde sık olarak karşılaştığımız mikroorganizmaların hızlı ve kolay bir şekilde tanımlanmasını sağlayan yeni bir yöntem olup, mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

MALDI-TOF basit, otomatize, kütle spektrofotometresinde özel deneyim gerektirmeyen, hızlı sonuç veren, yüksek işlem hacimli bir sistemdir. Çalışma için tek koloni yeterli olmaktadır. Sistem alındıktan sonra maliyet etkin ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği yüksektir. Bu sistemin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin, mayaların cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında duyarlılık ve özgüllüğü yüksektir. Analizin basitliği ve çabukluğu yöntemin önemine katkıda bulunmaktadır.

Moleküler yöntemlerle MALDI-TOF yöntemi kıyaslandığında , MALDI-TOF kısa sürede tanımlama yapmakla birlikte kültürde üreme gerekmektedir. PCR gibi moleküler tanı yöntemlerinde ise doğrudan örnekten çalışabilmekte ve aynı gün sonuç alınabilmektedir. Ancak pahalı oluşu, tek bir teste bakılabilmesi ,sınırlı sayıda mikroorganizma çalışılabilmesi rutin laboratuvar için uygun değildir. Moleküler tanı teknikleri in-vitro olarak üretilmeyen organizmaları belirlemede, mevcut kültür tekniklerinin çok pahalı olduğu veya çok karmaşık veya uzun inkübasyon sürelerini gerektiği durumlarda endikedir.

MALDI-TOF MS; besiyerine ekilmiş kültürlerden hızlı tanımlama yapılmasına imkân veren, yeni gelişmekte olan ve yakın bir gelecekte cihazın yaygınlaşması ile konvansiyonel ve otomatize bakteri tanımlama yöntemlerinin yerini alabilecek bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kaynaklar:

1. Beekman SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges, *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3119-25
2. 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.
3. 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.
4. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975;47: 219-25.
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. 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 MassSpectrom (Chichester, Eng).* 2004;10: 89-99
8. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Performance of a matrixassisted 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.
9. 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.
10. 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
11. 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
12. Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-offlight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1946-54.
13. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. Highthroughput 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.
14. 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.
15. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, et.al Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol.* 2015;53(7): 2163-71.

Gürsel Mahallesi Kağıthane Caddesi 14/2 34400 Kağıthane - İstanbul
T. 0212 320 64 00 F. 0212 320 64 17