

Kütle Spektrometrisinin Mikrobiyolojide Kullanımı

Işın Akyar

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Tüm dünyada kütle spektrometri yöntemleri ekonomik olarak daha uygun ve günlük kullanılan ticari yöntemlerden daha hızlı olmaları nedeniyle daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Kütle spektrometrisinin gelecekte rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında çok önemli bir rolünün olması beklenmektedir. Bugün biyomedikal kütle spektrometrisi ile ilişkili olan protein belirteçleri ve proteomikler en önemli odak noktalarıdır. Burada bakteri tür saptamalarında tartışılan yöntemlerin, aynı şekilde virüsler, mantar ve parazitler için de kullanımı uygundur. Kütle spektrometrisinin mikrobiyolojide kullanımı, şu anda yapabilecekleri ve gelecekte neler beklenebileceğinin anlaşılması önemlidir.

Anahtar sözcükler: Kütle spektrometrisi, bakteri enfeksiyonları, tanı, MALDI-TOF

USAGE OF MASS SPECTROMETRY IN MICROBIOLOGY

ABSTRACT

All over the world, mass spectrometry methods are being more used in clinical laboratories because of their being cost-effective and faster than the routine conventional methods. Mass spectrometry is expected to have a very important role in routine clinical microbiology laboratory in the future. The particular focus is on protein markers and proteomic, which are today fundamentally related with biomedical mass spectrometry. The methods discussed here in the statement of bacterial identification, are equally appropriate to viruses, fungi, and parasites. It is important to understand what mass spectrometry has achieved, what are its current capabilities, and what might be expected in the future.

Key words: Mass spectrometry, bacterial infections, diagnosis, MALDI-TOF

Klinik tanısal mikrobiyoloji laboratuvarında, bakteri veya mayaların türlerinin saptanması günümüzde farklı besiyerlerinde üreme, koloni morfolojileri, Gram boyama ve birçok biyokimyasal reaksiyonların sonuçları gibi fenotipik özelliklerine göre yapılmaktadır. Bunların hepsi birlikte, birçok bakterinin kesin tanısını çok büyük oranda koyabilmektedir, ancak bu yöntemlerin maliyetleri çok yüksektir ve zaman kaybettiricidir (1).

Bu yazıda kütle spektrometrisinin biyobelirteç ile birlikte kullanımı, bu marker'(belirteç) lerin kültür sonrası bakterilerin tür ve cins tayinlerinin yapılmasındaki güncel kullanımı, ve potansiyel olarak enfeksiyon hastalıklarının

tanısında kültür –dışı kullanımı ele alınacaktır. Bu düşüncenin temelinde birbirinden bağımsız olarak moleküler biyoloji, ve analitik kimyada devrim niteliğinde olan gelişmelerle genomik, proteomik ve biyoinformatik konularında ilerlemeler gözlenmesi yatmaktadır.

Şu anda en önemli odak noktaları protein belirteçleri ve proteomik çalışmalarıdır ve günümüzde biyomedikal kütle spektrometrisi ile eşanlı olarak anılmaktadır. Bakterilerin tanımlanmasında yazıda tartışılacak yöntemler, aynı zamanda virüsler, mantar ve parazitlerde de kullanılabilir. Şu anda ulaşılmış olan en üst noktayı kavrayabilmek için, kütle spektrometrisinin neler kazandığını, şu anda neler yapabildiğini, ve yakın gelecekte neler yapabileceğinin anlaşılması yardımcı olacaktır.

Moleküler biyolojideki ilerlemeler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'nin gelişmesi ve restriksiyon enzimlerinin kullanımı ve "bilinen" genetik belirleyicilerin yardımı ile organizmalar arasındaki dizi farklılıklarının gösterilmesini kapsamaktadır. Son yıllarda yapılan tüm- genom dizi incelemeleri belirteçlerin keşfine ışık tutmuştur. Bunun sonucu olarak da kütle spektrometrisinde ilerlemeler gözlenmiş ve bu genomların ifade edilen protein ürünlerinin dizi incelemeleri (proteomiks) oluşturulmuştur. Bu gelişmelerin sağlanmasında "Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF)" ve "Electrospray ionization"(ESI) kütle spektrometrisi, "Mass spectrometry"(MS) ve "tandem mass spectrometry"(MS-MS) gibi farklı kütle spektrometri aygıtları kullanılmıştır.

Kütle spektrometrisinden daha önce kullanılan yöntemler arasında "gaz kromatografi-kütle spektrometrisi"(GC-MS) bulunmaktadır. Klinik mikrobiyolojide GC'den alışılagelmiş olarak kültürde üreme sonrası elde edilen mikroorganizmalardan tüm-hücre yağ asit profilinin çıkarılmasında yararlanılmaktadır (2,3).

Genomik alanda yaşanan devrim niteliğindeki büyük ilerlemeler moleküler biyoloji araçlarının çok iyi bilinen patojenlerin ayırımında kullanımı olanağı vermiştir, bununla birlikte yeni önem kazanan enfeksiyonların genlerin varlığı ya da yokluğu ile gösterilebilmesini, ya da birbirine çok benzerlik gösteren organizmaların ayırımında DNA dizilerindeki küçük değişikliklerin kullanılabilmesini olası kılmıştır.

Küçük moleküllerle bakterilerde tür saptanması (Geçmişteki çalışmalar)

Yukarıda belirtildiği gibi, MS teknolojisi iki farklı alanı ilgilendirmektedir ve klinik mikrobiyoloji açısından incelenecek molekülün tipi ile ilişkilidir. 1970 -1980'lerde ortaya çıkan eski GC-MS teknolojisinde polimerler veya oligomerler (ör:fosfolipidler) öncelikle saponifikasyon(sabunlaşma) veya hidroliz ile kendilerini oluşturan monomerlerine (ör:yağ asitleri) parçalanmaktadırlar. Monomerler daha sonra iyonik veya hidrojen-bağlayan etkileşimleri baskılayan ve gaz kromatografisinde uçucu olmaya yol açarak kimyasal olarak (ör:metilasyon ile türevlerine ayrılırlar) dönüşüm gösterirler. Bileşen monomerler (ör; metilenmiş yağ asitlerinin karışımı) GC'de geçiş sırasında bileşenlerine ayrıldıktan sonra detektör içinden geçerler.

Sık kullanılan GC detektörlerinin tüm yağ asitlerini saptayabilme özelliği vardır. Burada tek sağlanan bilgi bir yağ asidinin saptandığıdır; tanımlanması yağ asidinin GC

kolonunda kalış zamanı yani kolondan geçtiği sırada detektöre ne kadar zamanda ulaştığına bağlıdır. Ek olarak, profildeki her bir yağ asidinin tam yapısı kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılarak saptanabilmektedir.

MS mikrobiyal bileşimlerin (ör: yağ asitleri) kimliğinin doğrulanması amacı ile kullanıldığında molekülleri gaz fazındaki elektronlarla (elektron etkisi) veya kimyasallarla (kimyasal iyonizasyon) bombalanır. Bu da kütle spektrometrisi içinde moleküle kütle ile ayırimda kullanılacak pozitif veya negatif iyon olacak şekilde tek bir yük ekler. GC adından da anlaşılacağı üzere, peptidler ya da oligonükleotidler gibi daha büyük moleküller GC'den geçemeyecekleri ve MS işlemi sırasında elektron etkisi veya kimyasal iyonizasyon ile yeteri kadar iyonize olamayacakları için molekül uçucu olmalıdır. Yapısal monomerler(her ikisi de mikrobiyal profil araştırmasında kullanılan yağ asitleri ya da şekerler) bu incelemelerde kullanılırlar. Yağ asit profilinin çıkarılması taksonomi ve sınıflandırmada hala altın standart olarak kabul edilen ve referans laboratuvarlarda kullanılan bir yöntemdir. Yağ asidi analizi için örneklerin hazırlanması saatler sürmekte, ve her bir GC genellikle 20 -30 dakika almaktadır. Şekerlerin analizi biraz daha fazla işlem gerektirmektedir ve daha zordur. Örneğin, *Bacillus anthracis* sporları *B.cereus*'un sporlarından ancak karbonhidrat profilleri ile ayrılabilirlerdir. Her iki türde de ramnoz, 3-O-metil ramnoz, ve galaktozamin bulunmakla birlikte *B.cereus*'ta ek olarak 2-O-metil ramnoz ve fukoz da bulunmaktadır. Bu çok basamaklı işlemlerin gerçekleşmesi başından sonuna kadar yaklaşık 50 saat almaktadır. Oysa yeni yöntemlerle benzer ayırım işlemlerinin gerçekleşmesi yaklaşık 10 dakika sürmektedir. Her iki incelemenin süreleri karşılaştırıldığında saatlerin yerini dakikaların aldığı kolaylıkla görülmekte bu durum da her şeyin ne kadar değiştiğini göstermektedir (4).

Büyük moleküllerle mikroorganizmalarda tür saptanması (Günümüzde yapılan çalışmalar)

1980 ve 1990'larda "Soft ionization MS technology" nin devreye girmesiyle biyomoleküller bileşenlerine ayrılmasızın, "high performance liquid chromatography " (HPLC) ya da elektroforez ile işleme tabi tutulmaksızın incelenebilir hale gelmiştir. Bu yöntemin önemi büyük moleküllerin (ör, oligonükleotidler, PZR ürünleri, peptid ve proteinler) kimyasal bir ön işlem gerektirmeksizin incelenebilecek olmasıdır.

Günümüzde bu büyük moleküllerin analizi öncelikle "MALDI-TOF MS" veya "ESI MS"e dayanmaktadır.

MALDI-TOF MS'de örnek metal bir plak üzerine damlatılır, üzerine bir matriks solüsyonu konur ve havada kurutulur. MS aygıtı içine yerleştirilip lazer ışınları ile vuruşlar yapıldıktan sonra, matriks ışığı emerek ilgilenilen molekül(ör; DNA veya proteinler) haline dönüştürür. Genellikle, tek yükü olan yalnızca tek bir iyonize tür oluşur. Bunun tersine, ESI MS solüsyonla çalışılmaktadır. Örnek MS içerisine bir şırınga pompası ile püskürtülmektedir. Damlacıklar buharlaştıkça, yükler damlacıkların içinde bulunan moleküllere transfer olur. Çoklu yükü olan iyonlar oluşur. Kütle analizinde ayırım genellikle kütle-yük oranı ile yapılmaktadır. Tek bir yükü olanlar için basit spektrum MALDI-TOF cihazı için oluşturulmuştur, oysa ESI spektrumu (bir, birkaç ya da birçok yüklü molekül karışımlarını yansıtır) daha karmaşıktır. Bu nedenle, spektrum kolaylığı açısından MALDI-TOF mikrobiyolojide daha fazla kullanılır olmuştur. Bununla birlikte, ESI MS ile sıklıkla daha büyük moleküllerin analizi yapılabilmektedir. Kimyasal bir işlem olmaksızın molekül kendi asıl hali ile incelendiği için MALDI-TOF veya ESI MS kullanımı için ileri düzey kimya bilgisine gerek yoktur. Aslında, yukarıda da belirtildiği gibi bazı uygulamalarda bir ayırım basamağına (ör:LC ya da elektroforez ile) gerek yoktur, ve örnek kısa bir işlemten geçmesi sonrasında doğrudan MS içerisine konulup incelenebilmektedir.

“Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) yöntemi tüm bakteri hücrelerinden protein profillerinin çıkarılmasında kullanılacak bir yöntemdir. Bu profillerin referans bir spektra ile karşılaştırılması sonucu ile bakteriler kolaylıkla tanımlanabilmektedirler (5). Bakterilerin tanımlanmasında MALDI-TOF MS cihazı ilk kez 1975 yılında Anhalt ve Fenselau tarafından kullanılmakla birlikte, rutin kullanıma girmesi çok yenidir (6).

Son yıllarda, bu yöntem ile *Escherichia coli* ve Enterobacteriaceae ailesinin diğer üyeleri gibi Gram negatif basiller, *Staphylococcus aureus* ve streptokoklar gibi Gram-pozitif koklar; ve *Bacillus cereus* ve *Listeria* türleri gibi bazı Gram-pozitif basiller üzerinde çalışılarak farklı bakteri türlerini tanımlama nitelikleri araştırılmıştır. 2009 yılında da Seng ve ark. tarafından klinik örneklerden izole edilen bakteriler üzerinde yapılmış ilk çalışma yayınlanmıştır(7, 8,9, 10,11,12,13).

Günümüzde MALDI-TOF yöntemi ile mikroorganizmalarda tür tayini (günümüzde ileri düzey çalışmalar)

MALDI-TOF ile yapılan ilk çalışmalar bakterilerle yapılmıştır. Bakterilerde tür saptanması başarılı olduktan sonra

mayalarla da çalışılmaya başlanmış ve tür saptamaları yapılabilmektedir. Van Veen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada aralarında 61 adet maya türünün de bulunduğu 980 mikroorganizma çalışılmış ve isimlendirilebilmiştir (14). MALDI-TOF yöntemi ile çalışılan ve MALDITOF Bruker Microflex ile tanımlanan bakteri ve mayalar aynı zamanda karşılaştırma amacı ile Biomerieux'a ait VITEK II ve API sistemleri ile de çalışılmış ve %86,8 oranında bir uyum gözlenmiştir(15). Günümüzde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarına giren bu yöntem gittikçe daha fazla yarar sağlamaktadır. Örneğin idrar kültürlerinde yapılan çalışmalarda kültür işlemini yapmaksızın 4 ml idrar örneği alarak santrifüj işlemlerinden geçirek kültür işlemi uygulanmaksızın hızlı ve güvenilir bir şekilde bakteri tür tayini yapılması denenmiş ve başarılı olmuştur (16).

Yine benzer şekilde kan kültürü şişesi pozitif sinyal verdikten sonra katı besiyerlerine kültür ekimi yapılmaksızın doğrudan şişeden etkeni izole etmeye ve tanımlamaya yönelik değişik çalışmalar yapılmaktadır. Pozitif sinyal sonrası şişe içinden alınan 5 ml örnek birkaç kez santrifüj işleminden geçirilerek elde edilen çökeltiden MALDI-TOF çalışması başarılı olarak sonuçlanmış, bu da kan kültürlerinde sonuç süresini oldukça kısaltmıştır (17). Kan kültürlerinden mikroorganizma saptanmasında bir başka ve daha kolay bir yöntem ise MALDI-TOF uygulaması öncesinde kan hücrelerini çözünür hale getiren ancak, mikrobiyolojik membranlara etki etmeyen bir deterjan kullanımındır (18).

Bunlardan başka 1990'lı yıllarda ortaya çıkan yukarıda söz edilen yöntemlerden bağımsız ancak, eşit derecede önemli olan başka bir yöntem de “**tandem mass spectrometry**”dir. Bu yöntem ile peptidlerin alışılagelinen dizi incelemeleri yapılmaktadır. Bir MS-MS aygıtı aygıtı içinde uçucu halde parçalanmamış sağlam moleküller olarak bulunan oligonükleotidleri veya peptidleri almakta ve onları bileşenlerine ayırmaktadır. Pratikte peptidler uzun dizilere sahiptir ve bu dizilerin ne anlama geldiğini yani çevirilerini otomatik olarak yapan bazı programlar bulunmaktadır. Bu peptidlerin dizileri daha sonra genomik dizilerinden oluşturulmuş protein veri tabanları ile karşılaştırılmakta ve protein ile genellikle daha büyük olan geride kalan kısım böylece tanımlanmaktadır. Uygulama kolaylığı ve spektrumun kolayca anlaşılabilmesi nedeniyle bakteriyel vejetatif hücrelerin veya sporların doğrudan saflaştırılmasını takiben MALDI-TOF MS incelemesi popüler hale gelmiştir. Bununla birlikte, bu yöntemle yalnızca 2,000-10,000 Da kütle aralığında düşük kütleli ve kolay iyonize olabilen miktarı fazla olan peptidler saptanabilmektedir. Genellikle spektrum bulunan her bir proteinin moleküler ağırlığı (MA)ile tanımlanan miktarı olarak

işaretlenmektedir. Ne yazık ki MA tek başına özgün bir biyobelirteci tanımlamak için yeterli değildir ve geride kalan spektruma da güvenilebilmelidir, bu da genellikle kütle profillemeye ya da fingerprinting çalışmaları ile sağlanabilmektedir. Genellikle kalıpları tanıyan bilgisayar programları kullanılmaktadır; fakat ne yazık ki çalışmadan çalışmaya ya da örnekten örneğe farklılıklar olabilmekte bu da sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır (19.20.21.22). Farklı bir yaklaşım, her bir protein dizisinin MS-MS kullanılarak saptanmasıdır (23).

Tek başına bir belirtecin varlığı zaman zaman sorun yaşayabilen kütle profilinin tutarlılığına bakılmasına gerek kalmaksızın çok büyük güvenilirlik ile saptanabilmektedir. Örneğin, MA küçük ve asitte eriyebilen proteinler (KAEP) MALDI-TOF MS ile ölçülebilmekte ve ESI-MS ile doğrulanabilmektedir. ESI MS-MS incelemeleri diziyeye-özgü bilgi üretimi için yapılabilir. İnceleme basitçe örneklerin saflaştırılması ve bu saflaştırılmış örneğin daha başka bir işlem yapılmaksızın doğrudan MS-MS cihazına konulmasından oluşmaktadır (24). Protein-profilinin çıkarılmasının çok fazla zaman ve örnek işlenmesini gerektiren klasik proteomik-zeminli yaklaşımlardan farklı olduğunun vurgulanması gerekir. Proteomiks çalışmalarında genellikle ayrı protein noktalarını gösterebilmek için iki yönlü jel elektroforezi işlemine gerek duyulmaktadır, daha sonra özgün kütlelerdeki peptidleri oluşturmak için genellikle tripsin ile birlikte *in situ* olarak sindirilmekte ve bunu izleyerek de MALDI-TOF MS (VEYA TOF-TOF MS-MS) ile incelenmektedir. Farklı bir seçenek ise, tüm hücrelerin triptik sindiriminden sonra, peptidlerin karışımı sıvı LC-ESI MS-MS incelenmesine tabi tutulmasıdır. Her iki durumda da, kütle spektrometrisi ile incelemelerde karışımların kompleks durumunu azaltmak için elektroforez veya kromatografi ile ayırım önemlidir, ancak MS teknolojisinin günlük işlem uygulamalarında kullanımı ile bu konularda daha fazla bilgi edinilmektedir (25). LC ayırımının MS veya MS-MS incelemesi veya elektroforeze göre daha zor olması dikkat çekicidir. Proteomiks çalışmaları oldukça fazla zaman gerektirmektedir ve tekniğe dayanmaktadır ve en iyi sonuç verdiği konular iki suş ya da türün bağlantısını araştırmada kullanılmasıdır (26).

Biyoinformatik tanımlanmış peptidlerin tüm genom tarafından kodlanmış proteinlerde olduğu düşünülen peptidlerle ilişkilendirilmesinde kullanılmaktadır. Kuramsal olarak yeni bir suş bu şekilde sınıflandırılabilir. Bu da ayrılması gereken her bir çift ya da grup mikroorganizmanın biyoinformatik incelemesini içerir ki, bu da karışık ve yoğun bir çalışma gerektirmektedir. Farklı bir seçenek de, LC-MS-MS ya da iki yönlü jel elektroforezinin-MS-MS belirteç keşfinde

kullanılmasıdır. Belirteçler keşfedildikten sonra, basit MS ya da MS-MS değerlendirmeleri günlük incelemelerde kullanılabilir. Bunun tanı koydurucu uygulamalar için bir benzeri de tüm genomik kıyaslama ile DNA belirteçlerinin keşfini izleyen "gerçek zamanlı PZR" kullanımıdır(1).

Kütle spektrometrisi rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanıma giren MALDI-TOF yönteminin diğer tür saptama yöntemleri ile karşılaştırdığımızda en çok kullanılan kültür yöntemleri ve daha sonra kullanılan biyokimyasal yöntemler ya da otomatize cihazlar ve moleküler yöntemlerle karşılaştırmak gerekmektedir. Rutin laboratuvar incelemelerinde hâlihazırda yine kültür yapmak gerekmekte ancak bundan sonraki işlemler ve süreler MALDI-TOF kütle spektrometrisi yöntemi ile çok kısalmaktadır. Çünkü çok az koloni hatta tek koloni bile olsa bu yöntemle koloniyi kaybetmeden çalışma olanağı bulunmaktadır. Otomatize sistemler ya da yardımcı biyokimyasal yöntemler kullanıldığında süre uzamaktadır. MALDI-TOF ile bu aşamada dakikalar içerisinde sonuç alınırken, diğer yöntemlerle ya üreyen koloniden pasaj alınıp çoğaltılması ya da üremenin artışı için beklenmesi gerektiği için yaklaşık 18-24 saatlik bir gecikme olabilmektedir. Moleküler yöntemlerle MALDI-TOF yöntemi kıyaslandığında ise süre açısından yine MALDI-TOF dakikalar içerisinde kısa sürede sonuçlanmakta sürmekte ancak çoğu zaman kültürde üreme gerektirmekte, PCR gibi moleküler yöntemlerde ise doğrudan örnekten çalışılabilmekte ve çoğu zaman aynı gün içerisinde sonuçlanabilmektedir. Ancak, rutin laboratuvarında çok önemli olan maliyet açısından incelendiğinde MALDI-TOF'un maliyet açısından diğer yöntemlere göre çok uygun olduğu gözlenmektedir. Günümüzde mikroorganizma tür saptamasında en çok kullanılan yöntemler olan otomatize cihazlar ile MALDI-TOF kütle spektrometrisinin karşılaştırılması Tablo 1'de belirtilmiştir.

MS-MS ile mikroorganizma tür tayini (Gelecekteki Çalışmalar)

Duyarlılık ve özgüllüğün her ikisinin de enfekte vücut sıvıları veya dokuları gibi kompleks biyolojik matrisler içinde mikrobiyal biyobelirteçlerin saptanmasında önemli bir yeri vardır. Aslında, genellikle klinik tanıda örneğin bir GC veya LC ile bir ayırım ya da hedef belirtecin PZR amplifikasyonu yer almaktadır. Her durumda bunun da matrisin diğer bileşenleri ile kıyaslandığında belirtecin konsantrasyonunu arttırmaya yol açtığı gösterilmiştir ve bu da incelemeyi kolaylaştırmaktadır.

Klinik örneklerde aslında, küçük moleküllerin GC-MS-MS kullanılarak saptanmasında belirgin bir başarı vardır(27,

Tablo 1. Mikroorganizma tür saptamasında kullanılan yöntemler ile Maldi-tof kütle spektrometrisinin karşılaştırılması

Özellikler	Maldi-tof yöntemi	Otomatize mikroorganizma tür saptama, antibiyogram yöntemleri
Mikroorganizmaları alt türlerine kadar doğru bir şekilde saptama	Genç ve saf kolonilerden çalışıldığında otomatize sistemlerle eşdeğer, hatta moleküler yöntemlerle karşılaştırılacak derecede iyidir.	Genç ve saf kolonilerden çalışıldığında çalışılan otomatize bağlı olarak okuma doğruluğu değişebilmektedir.
Çalışma kolaylığı	Çalışma için kullanılan yöntemlerin birçoğunda bakteri ve mayalarda tek koloni yeterli olmaktadır. Çalışma için dilüsyon yapılmasına ya da farklı yöntem kullanılmasına çoğu zaman gerek yoktur.	Çalışma için belli bir dilüsyon gerektiği için pasaj alınması gerekebilir, bu da süreyi uzatmaktadır.
Anaerob bakteri tür saptama	Başarılıdır.	Tüm otomatize sistemlerde anaerob tür saptaması bulunmamaktadır.
Maya tür saptama	Başarılıdır.	Otomatize sistemlerin bazılarında mayaların tür saptaması bulunmamaktadır.
Küf tür saptama	Bu konuda çalışmalar sürmektedir, bazı yöntemlerle iyi tanımlamalar yapılmıştır.	Otomatize sistemlerin hiçbirinde küflerin tür saptaması bulunmamaktadır.
Parazit tür saptama	Parazitlerin proteinlerini kullanarak bu konuda çalışmalar sürmektedir.	Otomatize sistemlerin hiçbirinde parazitlerin tür saptaması bulunmamaktadır.
Virüs tür saptama	Virüslerin proteinlerini kullanılarak bu konuda çalışmalar sürmektedir.	Otomatize sistemlerin hiçbirinde virüslerin tür saptaması bulunmamaktadır.
Antibiyogram, antifungal duyarlılık	Antibiyogram, antifungal duyarlılık gibi ilaç direnç incelemeleri henüz araştırma safhasındadır.	Rutin laboratuvar çalışmalarında otomatize cihazlarla antibiyogram çalışması yapılmakta, bazıları ile ayrıca da mayalar için antifungal duyarlılık çalışması yapılabilmektedir.

28,29). Bu MS-MS (GC-MS-MS) şeklinde, kütle spektrometrisi ilgilenilen moleküller üzerine odaklanmak için kullanılır ve saptama sınırı da GC-MS için hesaplanandan yaklaşık olarak 100 kat daha düşüktür. Örneğin birçok bakterinin hücre duvarında bulunan muramik asit, pnömokok menenjitli bulunan hastaların beyin omurilik sıvılarında <12 ng/ml düzeyinde kolaylıkla saptanabilmektedir(29). Gram negatiflerde bulunan hidroksi yağ asitleri periodontitis tanısında kullanılmaktadır(27). Bununla birlikte, GC-MS'de bakteri profillemesi için karşılığı olduğu için örnek işleme zaman kaybettirici ve tekniğe dayalıdır. Ayrıca, saptama DNA ya da protein dizi bilgilerini gerektiren tür düzeyinde yapılmamaktadır.

Bununla birlikte, GC-MS-MS'in klinik örneklerdeki başarısı peptid belirteçlerin daha gelişmiş ve daha hızlı olarak saptanmasında prototip bir yaklaşım sağlamaktadır. Gerçek zamanlı PZR enfeksiyonların saptanması için kültür dışı-temelli teknolojilerin başında gelmektedir. Bakteri DNA belirteçleri için daha fazla ayırt ettirici PCR-MS geliştirilmiştir(30). Otomatize ticari PCR-MS cihazı geliştirilmiştir. (7). PZR-MS'in PZR'a göre bazı ek basamakları bulunmaktadır. Bunlar arasında, PZR sonrası örnek temizliği ve PZR'dan bir MS modülüne aktarım yer almaktadır. Böylece, PZR-MS günümüzde bir referans laboratuvar tekniği ile

çalışılmaktadır. Örneğin, *Streptococcus*, *Haemophilus*, veya *Neisseria* türleri ile gelişen solunum yolu salgınlarının epidemiyolojik çalışmalarında nükleotid kompozisyonlarını saptamada başarılı olarak kullanılmaktadır. Uygun biyobelirteçleri hedefleyerek protein ve DNA düzeylerinde benzer bilgiler elde edilebilir. Aslında, MS (ya da MS-MS) incelemesi öncesi ilgilenilen belirtecin saflaştırılması amacıyla belirteç peptidlerin monoklonal antikorlar kullanarak miktarlarının saptanabilmesine izin verebilmesi için kompleks örneklerin basitleştirilmesini içeren bazı çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, bu tip yaklaşımları geniş kapsamlı saptamalara uyarlamak zordur, bunun nedeni her ilgilenilen organizma için uygun antikor bulunması gerekliliğidir.

Önemli başarılarından birisi de proteinlerin nitelendirilmesinin protein belirteçleri için tanımlamadan saptamaya alınmasıdır ve bu durum aracılığı ile fajlar devreye girmiştir. Bu fajlar bakteriyel patojenlere MS öncesi bağlanmaktadır. Amplifikasyon öncesi saptama düzeyinin altında olan faj proteinleri saptanabilmektedir (31).

Amplifikasyon PZR ile benzer sonuçlar sağlamaktadır, ancak tek ayrı faj olduğu için uygulaması daha kolaydır. Bu yöntem şu anda bilinen patojenlerin saptanmasında çok

iyi bir gelecek vaat etmektedir, ancak henüz fajların tanımlanmadığı yeni önem kazanan enfeksiyonlarda bunu uygulamak daha zor olacaktır. Farklı bir yaklaşım ise, proteinler ve DNA'ların moleküler ağırlıklarının saptamasında ticari aygıtlarda şimdiye dek başarıyla süren mikrofluidiklerin kullanımıdır.

Ticari mikrofluidik çiplerde (bir tür kapiller elektroforez) ayırım genellikle birkaç dakika sürmekte ve örnek işlenmesi çip içerisinde otomatik olarak yapılmaktadır.

Tüm bu gelişmeler mikrobiyoloji alanında daha duyarlı, ekonomik, güvenilir ve daha çabuk sonuç verilmesini hedeflemektedir. Şu anda laboratuvarlarda kullanılan en ileri inceleme yöntemleri arasında bulunan kütle spektrometrisi de mikrobiyolojide günlük işlemlerde yerini almış olup yapılan araştırmalar ile sürekli ileriye gitmektedir.

Kaynaklar

1. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5):1549-54.
2. Prome J C, Aurelle H, Couderc F, Prome D, Savagnac A and Treilhou M. Structural determination of unsaturated long chain fatty acids from Mycobacteria by capillary GC and collision activation dissociation MS. In: *Analytical Microbiology Methods*. A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson & G. Odham eds. 1st ed., New York, Plenum Press, 1990, pp. 163-178.
3. Odham G, Larsson L, and P-A. Mardh P-A (ed.). 1984. *Gas chromatography/mass spectroscopy applications in microbiology*. Plenum Press, New York, N.Y.
4. Fox A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: Past, present, and future. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2677-80.
5. Fenselau C, and P. A. Demirev. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2001; 20:157-171.
6. Anhalt J P, and Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem* 1975; 47:219-25.
7. Camara J E, and Hays F A. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem* 2007; 389:1633-8.
8. Conway G C, Smole S C, Sarracino D A, Arbeit R D, and Leopold P E. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001; 3:103-12.
9. Edwards-Jones V, Claydon M A, Evason D J, Walker J, Fox A J, and Gordon D B. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000; 49:295-300.
10. Kumar M P, Vairamani M, Raju R P, Lobo C, Anbumani N, Kumar C P, Menon T, and Shanmugasundaram S. Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. *Indian J Med Res* 2004; 119:283-8.
11. Barbuddhe S B, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann Chakraborty E T et al. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:5402-7.
12. Ryzhov V, Hathout Y, and 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* 2000; 66:3828-34.
13. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P E, Rolain J M, and Raoult D. 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.
14. 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):900-7.
15. Risch M, Radjenovic D, Han JN, Wydler M, Nydegger U, Risch L. Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Med Wkly*. 2010;24:140.
16. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2110-5.
17. 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):1481-3.
18. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(5):1542-8.
19. Cain T, Lubman, D M and Weber W J. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994; 8:1026-30.
20. Claydon M A, Davey S N, Edwards-Jones V, and Gordon D B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 1996; 14:1584-86.
21. Hathout Y, Demirev P A, Ho Y P, Bundy J L, Ryzhov V, Sapp L et al. Identification of *Bacillus* spores by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:4313-9.
22. Lay J O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 2001; 20:172-94.

23. Demirev P A, Ramirez J, and Fenselau C. Tandem mass spectrometry of intact proteins for characterization of biomarkers from *Bacillus cereus* T spores. *Anal Chem* 2001;73:5725-31.
24. Castanha E R, Fox K F, and Fox A. Rapid discrimination of *Bacillus anthracis* from other members of the *B. cereus* group by mass and sequence of intact small acid soluble proteins (SASPs) using mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 2006;64:27-45.
25. Liu H, Bergman N H, Thomason B, S. Shallom, A. Hazen, J. Crossno et al. Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore. *J Bacteriol* 2004;186:164-78.
26. Dworzanski J P, Snyder A P, Chen R, Zhang H, Wishart D, and Li L. Identification of bacteria using tandem mass spectrometry combined with a proteome database and statistical scoring. *Anal Chem* 2004; 76:2355-66.
27. Ferrando R, Szponar B, Sánchez A, Larsson L, and Vaero-Guillén P L. 3-Hydroxy fatty acids in saliva as diagnostic markers in chronic periodontitis. *J Microbiol Methods* 2005. 62;285-91.
28. Fox A, Fox K, Christensson B, Kraemer M, and Harrelson D. Absolute identification of muramic acid at trace levels in human septic fluids in vivo and absence in aseptic fluids. *Infect Immun* 1996;64:3911-55.
29. Kozar M P, Kraemer M T, Fox A, and Gray B M. Failure to detect muramic acid in normal rat tissues but detection in cerebrospinal fluid from patients with pneumococcal meningitis. *Infect Immun* 2000;68:4688-98.
30. Johnson YA, Nagpal M, Kraemer M T, Fox K F, and Fox A. Precise molecular weight determination of PCR products of the 16S-23S rRNA interspace region using electrospray quadrupole mass spectrometry for differentiation of *B. subtilis* and *B. atrophaeus*, closely related species of bacilli. *J Microbiol Methods* 2000; 40:241-54.
31. Madonna A J, Cuyk S V, and K. J. Voorhees. Detection of *Escherichia coli* using immunomagnetic separation and bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2003; 17:257-63.