

MOLEKÜLER VE GELENEKSEL YÖNTEMLERLE TANIMLANARAK UZUN SÜRE SAKLANMIŞ STOK CANDIDA KÖKENLERİNİN MALDI-TOF MS İLE ANALİZİ

MALDI-TOF MS ANALYSIS OF LONG-TERM STORED STOCK CANDIDA STRAINS IDENTIFIED BY MOLECULAR AND CONVENTIONAL METHODS

Tuğrul HOŞBUL¹ , Fatih ŞAHİNER¹ , Ramazan GÜMRAL¹ , Sinem KAYA² , Bayhan BEKTÖRE³ ,
Kemal TEKİN² , Şinasi Taner YILDIRAN¹ 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

³Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Alanya, Türkiye

ORCID IDs of the authors: T.H. 0000-0002-0150-4417; F.Ş. 0000-0002-3488-0339; R.G. 0000-0002-2303-8234; S.K. 0000-0003-3911-5342; B.B. 0000-0002-1225-7693; K.T. 0000-0002-6610-6540; Ş.T.Y. 0000-0003-3897-4401

Cite this article as: Hoşbul T, Sahiner F, Gumral R, Kaya S, Bektore B, Tekin K, et. al. MALDI-TOF MS analysis of long-term stored stock *Candida* strains identified by molecular and conventional methods. J Ist Faculty Med 2021;84(1):113-9. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0009

ÖZET

Amaç: Son yıllarda *Candida* türlerine bağlı enfeksiyon oranlarında artış gözlenmesi ve antifungal duyarlılık sonuçlarının türlere göre farklılıklar sergilemesi gibi nedenlerle, *Candida* izolatlarının hızlı ve doğru bir şekilde tür düzeyinde tanımlanması gerekli hale gelmiştir. Bu çalışmada, MALDI-TOF MS yönteminin, geleneksel ve moleküler yöntemler ile tür düzeyinde tanımlanmış ve uzun süre -20°C'de saklanmış *Candida* klinik izolatlarını tanımlamadaki etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 10 yıldan daha uzun süredir -20°C'de saklanan, canlandırma işlemi yapılmamış ve API® ID 32C, CHROMagar *Candida* ile PCR-RFLP gibi çeşitli yöntemlerle tanımlanmış 28 *Candida* izolatı dahil edildi. İzolatlar yeniden pasajlandı ve MALDI-TOF MS ile analiz edildi. Daha önce tür düzeyinde tanımlanamayan bir izolat ile MALDI-TOF MS skoru düşük olan diğer bir izolat ITS dizileme ile analiz edildi. Ayrıca çalışma izolatlarımız ile rutin kültürlerden izole edilmiş 57 *Candida* suşuna ait MALDI-TOF MS skorları karşılaştırıldı.

Bulgular: MALDI-TOF MS analizinde 11 (%39,3) izolat için tür düzeyinde ve 15 (%53,6) izolat için cins düzeyinde güvenilir tanımlama elde edilirken, iki izolat güvenilir tanımlama sınırlarının dışında kalmıştır. Çeşitli yöntemlerle ile tanımlanan 28 izolatın tamamında, MALDI-TOF MS yöntemi ile farklı skorlar elde edilse de tür düzeyinde doğru tanımlama yapılmıştır.

Sonuç: MALDI-TOF MS uzun süre saklanmış stok *Candida* izo-

ABSTRACT

Objective: In recent years, the rapid and accurate identification of *Candida* isolates at species level has been of great importance for reasons such as increased incidence of infections due to *Candida* species and differing antifungal susceptibilities by species. Herein, we aimed to investigate the efficacy of the MALDI-TOF MS method in the identification of *Candida* clinical isolates stored at -20°C for years.

Material and Method: Twenty eight *Candida* strains stored at -20°C for more than 10 years without any recultivation and identified by various methods such as API® ID 32C, CHROMagar *Candida* and PCR-RFLP were included in the study. Isolates were subcultured and analysed by MALDI-TOF MS. An unidentified isolate at the species level previously and another isolate with low MALDI-TOF MS score were analyzed by ITS sequencing. Additionally, MALDI-TOF MS scores of 57 *Candida* strains isolated from routine cultures were compared with study isolates.

Results: Of them, 11 (39.3%) isolates were identified at the species level and 15 (53.6%) were identified at the genus level, while two isolates were outside the reliable identification limits by MALDI-TOF MS. MALDI-TOF MS yielded an accurate identification at the species level in all 28 isolates identified by various methods even though different scores were obtained.

Conclusion: MALDI-TOF MS is a cost effective, easy to use, fast and reliable method compared with the conventional and

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: tugrulhosbul@gmail.com

Başvuru/Submitted: 28.01.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 08.07.2020 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 09.07.2020 • **Kabul/Accepted:** 20.07.2020 • **Online Yayın/Published Online:** 28.01.2021

©Telif Hakkı 2021 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2021 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

latlarının tanımlanmasında geleneksel ve RFLP gibi moleküler yöntemler ile kıyaslandığında kolaylıkla kullanılabilir, düşük maliyetli, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Çalışmaya alınan izolatlar sınırlı sayıda olmakla birlikte, MALDI-TOF MS ile yapılan analizlerde *Candida* türleri için alınan düşük skor değerlerinin tanımlamada yararlı olabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: *Candida*, MALDI-TOF MS, tanımlama

molecular methods for identification of stock *Candida* isolates preserved for many years. In conclusion, although a limited number of stock *Candida* isolates were included in the study, low identification scores for *Candida* isolates may be valuable in the MALDI-TOF MS analysis.

Keywords: *Candida*, MALDI-TOF MS, identification

GİRİŞ

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı, bu enfeksiyonlar için risk altındaki bireylerin sayısındaki artış nedeniyle önemli ölçüde artmıştır (1). *Candida* türleri tüm hastane kaynaklı invaziv mantar enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir ve yaklaşık %75-88'inden sorumludurlar. Risk altındaki hastalarda neden oldukları fırsatçı enfeksiyonlar nedeniyle önemli morbidite ve mortalite sebebidirler (2, 3). *Candida* türleri özellikle geniş spektrumlu antimikrobiyal ilaçlarla tedavi edilen, kalıcı vasküler kateteri bulanan, parenteral nutrisyon ile beslenen, abdominal cerrahi uygulanmış ve immünoşüpresif tedavi altındaki yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalarda kan dolaşımı enfeksiyonlarının önde gelen nedenleri arasındadır (4). Nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında, en sık karşılaşılan tür *Candida albicans* (*C. albicans*) olmak üzere, *Candida* türleri dördüncü veya beşinci sırada yer almaktadır (3, 5). *C. albicans* hala kandidemiye neden olan en yaygın *Candida* türü olmasına rağmen, son yıllarda, farklı antibiyotik duyarlılık profillerine sahip *albicans* dışı *Candida* türlerinin görülme sıklıkları artma eğilimindedir (1, 6, 7). Kandidemiyle ilişkili mortalite oranlarının yüksekliği (%34-40) ve atfedilebilir ölüm oranlarındaki yüksekliğin uygun antifungal tedavinin gecikmesiyle ilişkilendirilmiş olması, tür düzeyinde tanının hızlı ve doğru olarak yapılmasını kritik derecede önemli kılmaktadır (5, 8).

MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*) yöntemi, son zamanlarda klinik laboratuvarlarda mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla kullanımı gittikçe yaygınlaşan bir analitik yöntemdir (9). Protein profillerini analiz ederek bakteri ve mantarları da içeren çeşitli mikroorganizmaları tanımlamak için kullanılan hızlı bir yöntem olan MALDI-TOF MS 1980'lerin ortalarında geliştirilmiş ve 1990'ların ortalarında ise mikrobiyolojik tanımlamalar için kullanılmaya başlanmıştır (8, 9). Bu yöntem ile bakteri veya mayaların tanımlanması, kütle spektrumlarının ölçülmesini ve elde edilen verilerle mevcut veri tabanı (*referans kütüphanesi*) üzerindeki veriler arasında bir karşılaştırma yapılması ve kütle spektrumları arasındaki en yakın eşleşmeye göre tür veya cins düzeyinde sonuç alınması prensibi ile yapılmaktadır (9, 10). Moleküler ağırlıkları 2000 ila 20000 Da arasında değişen ribozomal proteinlerin biyo-belirteçler olarak kullanıldığı proteomik profil analiz temelli bu sistemle, birbirine yakın ilişkili olan ve

sadece moleküler yöntemlerle birbirlerinden ayırt edilebilen *Candida* türlerinin bu fizikokimyasal metotla da hızlı ve güvenilir bir şekilde ayırt edilebildiği bildirilmiştir (8). Yöntem, kullanılan referans kütüphanesinin genişliği ve derinliği ile doğrudan ilişkili olarak bazı izolatları düşük skorla tanımlayabilmekte veya kabul edilebilir düzeyde tanımlayamamaktadır ve bu durum yöntemin önemli bir kısıtlılığı olarak karşımıza çıkmaktadır (10).

Bu çalışmanın amacı, laboratuvarımız stok kültür koleksiyonunda bulunan, 10 yılı aşkın bir süredir çözdürme işlemi yapılmamış, klasik fenotipik ve moleküler yaklaşımlarla tür düzeyinde tanımlamaları ayrıntılı olarak yapılmış olan klinik *Candida* izolatlarında MALDI-TOF MS analizinin etkinliğini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen ve geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanımlandıktan sonra 10 yıldan daha uzun bir süredir laboratuvarımızda -20°C'lik derin dondurucuda stoklanan 28 *Candida* izolatı dahil edilmiştir. Çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul onayı alınmıştır (Etik kurul onay numarası: 19/271). İzolatların önce steril Sabouraud dekstroz sıvı besiyerine ekimleri yapılmış ve 37°C'lik etüvde, 48-72 saat inkübasyonu takiben Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerine tek koloni pasajları yapılmıştır. Çalışma izolatlarının geçmiş dönem tanımlanmasında germ tüp testi, klamidospor oluşturma, API® ID 32C (BioMerieux, Fransa) ve CHROMagar *Candida* (CAC; BBL, Fransa) besiyeri kullanımı gibi yöntemlerin yanı sıra, moleküler yaklaşım olarak PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) metodu kullanılmıştır. PCR-RFLP yönteminde ITS gen bölge ürünleri Msp I (SibEnzyme®, Rusya) ve Bln I (Roche Diagnostics®, Almanya) enzimleri ile kesilerek agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

MALDI-TOF MS analizi

MALDI-TOF MS analizi izolatların doğrudan Sabouraud agar plakalarından elde edilen taze kültürlerinden yapılmıştır. *Candida* izolatlarının bir günlük ve iki günlük kültürlerinden alınan koloniler 96 noktalı paslanmaz çelik plaka üzerine sürüldü. Plaka üzerinde ekstraksiyon, her noktanın 1 µl %70'lik formik asit çözeltisi ile kaplanması ve numunelerin 5 dakika boyunca kurumaya bırakılması

siyla gerçekleştirildi. Daha sonra her bir numuneye 1 µl CHCA matrisi (α-siyano-4-hidroksisünamik asit) pipetlen- di ve MALDI-TOF MS ile analiz öncesi havada kurutuldu. Kuruma sonrası plaka MALDI-TOF kütle spektrometrisi cihazına (Bruker, Almanya) yüklendi. Spektrum analizi için Bruker Biotyper 3.1 yazılım programı ve kütüphanesi (versiyon 4613) kullanıldı. Üretici firma talimatlarına göre skoru ≥2,0 olan örnekler tür düzeyinde kabul edilebilir tanımlama, ≥1,7 ile 2,0 arasında olanlar cins düzeyinde başarılı tanımlamalar olarak yorumlanırken, skoru <1,7 olan örnekler ise tür veya cins düzeyinde başarısız identifikasyon olarak kabul edilmektedir.

Dizi analizi

PCR-RFLP ve geleneksel yöntemlerle tür düzeyinde kesin tanımlaması yapılamayan bir izolat ile MALDI-TOF MS ile yapılan ilk tanımlamada başarısız olunan bir izolat için sekans analizi yapıldı. ITS1 (F) 5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3' ve ITS4 (R) 5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3' primerleri kullanılarak her iki izolatın *intergenic spacer* gen bölgeleri termal döngü cihazı kullanılarak çoğaltıldı ve çoğaltılan PCR ürünleri sekanslandı. Her bir izolat için *Bioedit* yazılım programı ile düzenlenen DNA dizileri GenBank BLAST, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) veri tabanı üzerinde yapılan sekans analizi ile değerlendirildi.

Veri analizi

MALDI-TOF MS ile farklı tarihlerde yapılan analizlerde elde edilen sonuçların yanı sıra, başarısız tanımlama ile sonuçlanan okumalarda cihazın belirttiği olası tür ve cinslere ait skorlar da incelenerek bu sonuçlar stoklama öncesi yapılan moleküler ve geleneksel yöntem sonuçları ile karşılaştırıldı. Temel istatistiksel hesaplamalar yapılarak sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık ise $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan ve stoklanmadan önce geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanımlaması yapılan 28 stok *Candida* izolatın tür dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Tablo 1'de 28 numarada belirtilen izolat, geçmiş yıllarda tanımlaması tam olarak yapılamadığı için stoklarda *C. lusitanae* veya *C. intermedia* şeklinde inkomplet olarak tanımlanan bir izolat şeklinde yer almış ve MALDI-TOF MS yöntemi ve dizi analizi sonucunda bu türün *C. haemulonii* olduğu saptanmıştır.

MALDI-TOF MS yöntemi ile bazı izolatlar için en az iki ek tanımlama yapılmasına gerek duyulmasına rağmen en son değerlendirme sonuçlarına göre, iki izolat (Tablo 1; 4 ve 20 numaralı) hariç izolatların 26'sı için 1.7 skor değerinin üzerinde sonuç elde edilirken, iki izolat için tanımlama skorları bu değer altında kalmıştır. Bu izolatlardan biri (Tablo 1; 4 numaralı izolat) ilk okuma sırasında tanımlanamazken, ikinci okumada 1.644 skoru ile *C. albicans* olarak

tanımlanmış, ikinci okumada MALDI-TOF MS sisteminin yaptığı eşleştirmeler ile sunduğu ardışık ilk 9 olasılığının tümü *C. albicans* olarak bulunmuştur. Diğer izolat (Tablo 1; 20 numaralı izolat) ise geçmiş yıllarda API® ID sistemi ve PCR-RFLP ile daha önce *C. parapsilosis* olarak tanımlanmış olmasına rağmen, MALDI-TOF MS ile 1.697 tanımlama skoru alınmış ve MALDI-TOF MS sisteminin bu izolat için sunduğu olasılıkların ardışık ilk 17'si *C. parapsilosis* olarak bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen iki izolat haricinde daha önce geleneksel ve moleküler yöntemler ile tam olarak tanımlanamayan bir tür için (Tablo 1; 28 numaralı izolat) MALDI-TOF MS yöntemi ile de ilk okumada başarısız sonuç elde edilmiştir. İlk iki skor 1.604 ve 1.594 olarak bulunmuş ve ilk 10 olasılıktan sekizi *C. haemulonii* olarak elde edilmiştir. Bu izolat için önceki API® ID 32C ile elde edilen iki ayrı okuma sonuçlarında 24. saatteki okumada "*unacceptable profile*" olmak üzere olası tür tanımlamaları *C. sake*, *C. globosa* ve *C. melibiosica*, 48. saatteki okumada yine "*unacceptable profile*" olarak olası tür tanımlamaları *C. intermedia*, *C. lusitanae*, *C. sake*, *C. melibiosica* olarak belirlenmişti. PCR-RFLP ile elde edilen bant büyüklüklerinin *C. intermedia* ve *C. lusitanae* için olanlara yakın olması nedeni ile bu tür daha önce kesin olmayacak biçimde *C. intermedia* veya *C. lusitanae* olarak tanımlanmıştı. Elde edilen sonuçların kesin olmaması nedeniyle bu izolat için dizi analizi yöntemi uygulanmış ve ITS1 - ITS4 gen bölgesi sekans dizisinin GenBank BLAST değerlendirmesi sonucunda bu izolat *C. haemulonii* olarak tanımlanmıştır (GenBank: KU896954.1). Bu izolatın ilk değerlendirmeden 15 gün sonra yapılan yeni pasajlarının MALDI-TOF MS analizinde ise skor 1.990 olarak bulunmuş ve ilk on ardışık olasılığın *C. haemulonii* olduğu görülmüştür.

MALDI-TOF MS analizinde sorun yaşanan bir diğer tür bir *C. albicans* izolatı (Tablo 1; 1 numaralı izolat) olmuştur. Bu izolat geleneksel ve moleküler yöntemlerle daha önce *C. albicans* olarak tanımlanmıştı. İzolat ilk okuma sırasında tanımlanamazken ikinci okumada 1.635 skor ile sistemin sunduğu ardışık ilk altı olasılığın beşi *C. albicans* olarak verilmiştir. MALDI-TOF MS analizinin kriterleri karşılamaması nedeni ile bu izolat için de dizi analizi yöntemine başvuruldu ve izolatın ITS1 - ITS4 gen bölgesi sekans dizisinin GenBank BLAST ile değerlendirilmesi sonucunda *C. albicans* için uyumlu olarak bulundu (GenBank JN606277.1). Bu izolatın ilk okumalardan 15 gün sonra ve yeni pasajları kullanılarak yapılan MALDI-TOF MS analizlerinde ise tanımlama skoru 1.708 olan ve ilk 10 ardışık olasılığın *C. albicans* olduğu tanımlama sonucu elde edilmiştir.

Çalışmamız suşları ile rutin labortuvar kültürlerinden izole edilmiş çeşitli türde 57 *Candida* izolatına ait MALDI-TOF MS tanımlama skorları karşılaştırdığımızda, çalışma izolatlarının tanımlama skorları genel olarak rutin laboratuvar izolatlarımızın tanımlama skorlarına göre daha yüksek

Tablo 1: Moleküler ve geleneksel yöntemlerle tiplendirme sonuçları ve MALDI-TOF MS verileri.

Nu.	Tüm yöntemlere göre tanımlama	Klinik örnek	Germ tüp	CAC	API ID 32C	PCR RFLP (bln-1) ⁺	PCR RFLP (msp-1)	MALDI-TOF MS	Dizi analizi
1	<i>C. albicans</i>	idrar	A	A	A	A	A	1.708 (A)**	A
2	<i>C. albicans</i>	kan	A	A	A	A	A	1.937 (A)	-
3	<i>C. albicans</i>	kan	A	A	A	A	A	2.077 (A)	-
4	<i>C. albicans</i>	kan	A	A	A	A	A	1.644 (A)*	-
5	<i>C. glabrata</i>	idrar	non-A	G	G	-	G	1.99 (G)	-
6	<i>C. glabrata</i>	idrar	non-A	G	G	-	G	2.096 (G)	-
7	<i>C. glabrata</i>	idrar	non-A	G	G	-	G	2.287 (G)	-
8	<i>C. glabrata</i>	idrar	non-A	G	G	-	G	2.057 (G)	-
9	<i>C. glabrata</i>	yara	non-A	G	G	-	G	2.06 (G)	-
10	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	2.072 (P)	-
11	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	1.917 (P)	-
12	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	1.929 (P)	-
13	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	2.134 (P)	-
14	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	1.816 (P)	-
15	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	1.782 (P)	-
16	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	2.065 (P)	-
17	<i>C. parapsilosis</i>	v.kat.	non-A	diğer***	P	-	P	1.983 (P)	-
18	<i>C. parapsilosis</i>	v.kat.	non-A	diğer***	P	-	P	1.768 (P)	-
19	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	1.995 (P)	-
20	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	1.697 (P)	-
21	<i>C. parapsilosis</i>	kan	non-A	diğer***	P	-	P	1.807 (P)	-
22	<i>C. parapsilosis</i>	yara	non-A	diğer***	P	-	P	1.858 (P)	-
23	<i>C. tropicalis</i>	idrar	non-A	T	T	-	T	1.776 (T)	-
24	<i>C. tropicalis</i>	kan	non-A	T	T	-	T	1.781 (T)*	-
25	<i>C. tropicalis</i>	kan	non-A	T	T	-	T	2.026 (T)	-
26	<i>C. tropicalis</i>	v.kat.	non-A	T	T	-	T	2.033 (T)	-
27	<i>C. krusei</i>	balgam	non-A	K	K	-	K	2.052 (K)*	-
28	<i>C. haemulonii</i>	kan	non-A	diğer***	?	-	?	1.990 (H)**	H

Kısaltmalar: A: *C. albicans*. non-A: *C. albicans* dışı, *C. dubliniensis* ve *C. africana* dışı (germ tüp oluşturmayan) türler. G: *C. glabrata*. H: *C. haemulonii* K: *C. krusei*. P: *C. parapsilosis*. T: *C. tropicalis*. CAC: CHROMagar *Candida*. v.kat.: Vasküler kateter.

*Katı besiyerine ikinci pasaj sonrası elde edilen okuma sonucu. **İlk iki pasaj sonrası yapılan okumalar başarısız olunca, izolatlar ikinci kez sıvı besiyerine ve sonrasında katı besiyerine pasajlanarak okutuldu.

****C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. kefyr* dışındaki bir tür. + bln-1 restriksiyon enzim analizi yalnızca *C. albicans* ve *C. dubliniensis* ayrımı için kullanılmıştır.

değerlerde bulundu. Ayrıca rutin laboratuvar izolatları ile karşılaştırıldığında çalışma izolatlarının tanımlama skorlarının ATCC standart suşların tanımlama skorlarına daha yakın değerlerde olduğu görüldü (Tablo 2).

TARTIŞMA

Sayıları 200'e ulaşan ve yirmiden fazla türü insan enfeksiyonları ile ilişkili olan *Candida* türlerinin tür düzeyinde tanımlanmasında duyarlılıkları, tanımlama spektrumları,

maliyetleri, tanımlama süreleri, iş gücü ve özel cihaz ve yetmişmiş personel gereksinimleri önemli ölçüde değişkenlik gösteren çok sayıda farklı yöntem kullanılmaktadır (7, 8, 12, 13). *Albicans* dışı *Candida* türlerinin görülme sıklığındaki artış ve antifungal direnç profilinin türlere göre değişkenlik göstermesi, mortalite oranlarında azalma ile ilişkili olduğu gösterilen antifungal tedaviye erken başlanması açısından, tür düzeyinde tanımlamanın hızlı ve doğru olarak yapılmasının önemini artırmıştır (14, 15).

Tablo 2: MALDI-TOF MS tanımlama skorlarının türlere göre ortalama değerleri.

Çalışma izolatları	MALDI-TOF MS Skoru	Rutin laboratuvar izolatları*	MALDI-TOF MS Skoru	Standart suşlar***	MALDI-TOF MS Skoru
<i>C. albicans</i>	1.842 [4]	<i>C. albicans</i>	1.738 [29]	<i>C. albicans</i> ATCC**	1.867 [3]
<i>C. glabrata</i>	2.098 [5]	<i>C. glabrata</i>	1.917 [7]	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	1.633 [1]
<i>C. parapsilosis</i>	1.909 [13]	<i>C. parapsilosis</i>	1.772 [7]	<i>C. parapsilosis</i> ATCC**	2.051 [2]
<i>C. tropicalis</i>	1.904 [4]	<i>C. tropicalis</i>	1.922 [8]	<i>C. tropicalis</i> NRRL Y-12968	1.963 [1]
<i>C. krusei</i>	2.052 [1]	<i>C. krusei</i>	1.819 [4]	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2.075 [1]
<i>C. haemulonii</i>	1.990 [1]	-	-	-	-

*30 günlük sıralı olarak seçilmiş rutin laboratuvar izolatlarımıza ait veriler.

***C. albicans* ATCC 10231, 24433 ve 90028. *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve 90018.

Not: Köşeli parantez içindeki rakamlar ortalama skor değeri hesaplanan izolat sayısını göstermektedir.

***Standart suşlara ait skorlar laboratuvarımızda gerçekleştirilen başka bir çalışmaya ait verilerdir (11).

Bu çalışmada geleneksel yöntemler, API® ID 32C gibi yarı otomatize bir sistem ve PCR-RFLP gibi moleküler yöntemler ile önceden tanımlanarak stoklanan 28 *Candida* izolatının daha sonra canlandırılarak MALDI-TOF MS ile analizi değerlendirilmiştir. Daha önceki çalışmalarla tür düzeyinde tanımlanamamış veya MALDI-TOF MS tanımlama skoru güvenilir aralıkta olmayan izolatların ITS gen bölgesi dizi analizi de yapılarak MALDI-TOF MS sonuçlarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın sonuçlarına genel olarak baktığımızda germ tüp testi, klamidospore oluşturma, API® ID 32C ve CHROMagar *Candida* besiyerindeki koloni görünümü gibi geleneksel yöntemler ve 3 farklı primer ve iki farklı enzimin kullanıldığı PCR-RFLP yöntemlerinin tümü ile karşılaştırıldığında MALDI-TOF MS tanımlama sisteminin maliyet-etkinliği ve tür spektrumunun genişliği ile bu yöntemlerin bir adım önünde olduğunu görüyoruz. Bahsedilen diğer yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanamayan ve MALDI-TOF MS ile *C. haemulonii* olarak tanımlanan izolatın dizi analizi verileri MALDI-TOF MS analiziyle alınan sonucu doğrulamıştır. Ribozomal proteinlerin biyo-belirteç olarak kullanıldığı proteomik temelli bir yöntem olan MALDI-TOF MS'in birbirine genetik olarak çok yakın olan *Candida* türlerini dahi ayırt etmede oldukça güvenilir olduğu literatürde bildirilmektedir (8, 16, 17) Sahip olduğu dirençli profil nedeniyle son yıllarda dünya genelinde tür düzeyinde tanımlanmasının önem kazandığı *C. auris*'in MALDI-TOF MS ile tanımlanmasının araştırıldığı bir çalışmada, MALDI-TOF MS, daha önce Vitek 2 otomatize sistemi ile *C. haemulonii* veya *C. famata* olarak tanımlanmış 102 izolatın tamamını tür düzeyinde doğru olarak (*C. auris*: 90, *C. haemulonii*: 6, *C. haemulonii* var. *vulnera*: 1, *C. duobushaemulonii*: 5) tanımlamıştır (16).

Yatan hastalarda etkenin tanımlanması için gerekli olan zaman, enfeksiyon nedeniyle mortalite oranlarını etkileyen önemli bir belirleyicidir. Ölüm oranları ve hasta başı mali-

yet hızlı tanı yöntemlerinin kullanılmasıyla belirgin olarak azaltılabilir (8). ITS gen bölgelerinin büyüklük farklılıklarına göre veya PCR-RFLP temelli testler ile, tür tanımlaması belirli türlerin birbirinden ayırt edilmesi için yararlı olsa da bu yaklaşımlar insan enfeksiyonları ile ilişkili *Candida* türlerinin geneli için maliyet-etkin yöntemler olmaktan uzak kalmaktadır (7, 18). Kullanılan restriksiyon enzimine göre değişmek üzere, RFLP yöntemi ile bazı türler birbirinden kolayca ayırt edilebilirken, sık karşılaşılan bazı türler de dahil olmak üzere PCR ürünlerinin enzim kesimi sonrası yürütülmeleri ile elde edilen jel görüntüleri ile tür ayırımı yapmak güç olabilmektedir (19, 20).

Rutin tanı laboratuvarlarında germ tüp testi ve CAC koloni görünümü ile tanımlanamayan izolatların tür tayininde kullanılan karbonhidrat asimilasyon temeline dayalı API® ID 32C yöntemi yerini, karbonhidrat asimilasyonunun yanı sıra enzimatik reaksiyonları da kullanan BD Phoenix™ Yeast ID (Becton Dickinson, Amerika Birleşik Devletleri) veya VITEK®2 YST ID (bioMérieux, Fransa) gibi panellere sahip otomatize sistemlere bırakmıştır (2, 14, 22). Bahsedilen yöntemlerle kıyaslandığında maliyet, tanımlama süresi ve iş gücü gereksinimi yönleriyle üstünlük sağlayan MALDI-TOF MS yöntemi ayrıca nadir görülen izolatları tanımlayabilmesi ile de öne çıkmaktadır. MALDI-TOF MS yöntemi örneklerin bulunduğu plakaların sisteme yüklenmesi sonrası tanımlamanın örnek başına 30 saniye kadar kısa bir süre içerisinde yapılabildiği hızlı bir yöntem olması yanında, *Candida* türlerinin tanımlanmasında altın standart yöntem olarak kabul edilen dizi analizi tekniği ile kıyaslandığında çok daha düşük maliyetlidir. Yakın zamanda ülkemizde yapılan bir çalışmada SDA besiyerinde saf maya kolonileri elde edildikten sonra MALDI-TOF MS, Phoenix™ Yeast ID ve dizi analizi tanımlama sistemlerinin test başına maliyetleri sırasıyla 15, 18 ve 100 TL olarak hesaplanırken, tanımlama süreleri sırasıyla 3 dakika, 16-18 saat ve 12 saat olarak bildirilmiştir (14). Farklı MALDI-TOF

MS yönteminin özellikle yüksek iş yükünün olduğu birimlerde konvansiyonel yöntemlere kıyasla daha maliyet etkin olduğu ve daha güvenilir sonuçların elde edildiğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (17, 23, 24).

Yukarıda bahsedilen avantajları ile beraber, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlamalar yapılırken klinik örneklerin üremelerinin ilk değerlendirmelerinde birden fazla etkenin üreyebilmesi sebebiyle MALDI-TOF MS analizi her zaman saf kolonilerle yapılamaz. Birden fazla tür içeren örneklerin her birinin tanımlanması için saf koloniler ile analizin yapılması önemlidir; aksi halde laboratuvar tanısının olumsuz etkilebileceği unutulmamalıdır. Doğrudan hasta örneklerinin ekildiği besiyeri plakları üzerindeki en uygun koloniler seçilse bile bir tür için saf ve baskın bir üreme yoksa diğer bakteri veya maya türleri ile gözle görülmeyecek küçük derecelerdeki kontaminasyonlar nedeniyle okuma skorlarının değerleri olduğundan daha düşük olarak bulunabilmektedir. Genel olarak bakıldığında çalışmamızda, hem çalışma izolatlarının hem de referans suşların tanımlama skorları rutin laboratuvar izolatlarına göre daha yüksek değerlerde bulundu. Rutin laboratuvar izolatları doğrudan hasta örneklerinin ekildiği ve farklı bakteri veya maya türlerinin tanımlanan etkenle birlikte aynı plak üzerinde bulunabildiği besiyeri ortamlarındaki tek koloni üremeleri seçilerek yapılmaktadır. Rutin izolatlar, birçok kez tek koloni pasajları alınan ve saf kolonilerin elde edildiği çalışma izolatlarına göre daha yüksek kontaminasyon olasılığı taşımaktadır. Benzer şekilde, referans suşların da hem saf koloniler halinde üretilmesi hem de cihazın kütüphanesine dahil edilmiş olmaları standart suşların okuma skorlarının yüksek olmasının bir nedeni olabilir.

Tür düzeyinde daha önce çeşitli yöntemlerle tanımlanmış ve on yılı aşkın bir süredir -20°C'de saklanmış kökenlerin çalışmada kullanılmış olması, uzun yıllar saklanan ve çeşitli yapısal değişikliklerin meydana gelmiş olabileceği bu stok kültürlerin doğru tanımlanmasında MALDI-TOF MS analizinin etkinliğini değerlendirme fırsatı vermiştir. Önce sıvı besiyerlerine sonra da katı besiyerlerine pasajları yapılan izolatların MALDI-TOF MS ile ilk analizlerinde beş izolat için tanımlama yapılamazken, sonrasında hem katı hem de tekrar sıvı besiyerlerine ekim yapılarak yeni pasajlardan elde edilen kolonilerden tanımlamaya yetecek skorlar elde edilmiştir. Bu durumun uzun saklama koşullarında maya hücreleri tarafından üretilen biyolojik moleküllerin kendi profili üzerine olası olumsuz etkilerinden kaynaklanabileceğini ve ilk yapılan pasajlarda MALDI-TOF MS sonuçlarının yetersiz kalması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Uzun yıllar saklanan stok kültür kökenlerinin MALDI-TOF MS ile analizinde, tekrarlayan pasajlar sonrası elde edilen kolonilerin kullanılmasının yöntemin etkinliğini artıracağını düşünüyoruz.

Üreticilerin önerileri doğrultusunda MALDI-TOF MS analizinde alınan skorun ≥ 2.0 olması tür düzeyinde; ≥ 1.7 olması cins düzeyinde güvenilir tanımlama olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda sadece 11 (%39,3) izolat tür düzeyinde güvenilir değerler elde edilmiştir. İzolatların 15'i ise (%53,6) cins düzeyindeki tanımlama kriterine uymuştur. Bununla beraber daha önceki geleneksel ve moleküler yöntemlerle yapılan ayrıntılı tür tanımlamaları ve bu çalışmada yapılan dizi analizi sonuçları neticesinde MALDI-TOF MS tanımlama skorları $< 1,7$ 'nin altında olan iki tür de dahil olmak üzere MALDI-TOF MS yönteminin tüm izolatlar için tür düzeyindeki analizinin doğru olduğunu bulduk. *Candida* türlerinin erken tanımlanmasına imkan veren uygun maliyetli, hızlı, duyarlı ve kullanımı kolay bir araç olan bu yöntem için geniş kapsamlı çalışmalar ile tanımlama eşik değerinin değerlendirilmesinin yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca MALDI-TOF MS veritabanı tarafından yapılan eşleştirilmelerde ardışık olarak aynı tür öneriliyorsa bu sonucun tanımlama skoru düşük değerlerde olan izolatlar için anlamlı olduğunu düşünürüz. Son olarak *Candida* türleri için MALDI-TOF MS kütüphanesinin farklı profillere sahip tür ve varyantların eklenmesi ile MALDI-TOF MS sonuçlarının güvenilirliği ve tanımlama skorlarının daha da artacağını ve bu yönüyle geliştirilmeye açık bir yöntem olan bu sistemin epidemiyolojik araştırmalar ve rutin laboratuvar uygulamaları için önemli bir tanı aracı olduğu kanaatindeyiz.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 25.09.2019 No:19/271)

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Veri Toplama- T.H., F.Ş., R.G., S.K.; Veri Analizi/Yorumlama- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Yazı Taslağı- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Son Onay ve Sorumluluk- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Süpervizyon- Ş.T.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval for this study was received from the University of Health Sciences Non-Interventional Research Ethics Committee (Date: 25.09.2019 No: 19/271)

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Data Acquisition- T.H., F.Ş., R.G., S.K.; Data Analysis/Interpretation- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Drafting Manuscript- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B.; Critical Revision of Manuscript- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Fi-

nal Approval and Accountability- T.H., F.Ş., R.G., S.K., B.B., K.T., Ş.T.Y.; Supervision- Ş.T.Y.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Alp S, Arıkan-Akdaglı S, Gulmez D, Ascioğlu S, Uzun O, Akova M. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. *Mycoses* 2015;58(8):498-505. [CrossRef]
2. Mellinghoff SC, Cornely OA, Jung N. Essentials in *Candida* bloodstream infection. *Infection* 2018;46(6):897-9. [CrossRef]
3. d'Enfert C, Bournonville ME. Human Fungal Infections, Reference Module in Biomedical Sciences. In: McQueen CA (ed). *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Inc. Amsterdam, 3rd edition, 2014. p:652-64. [CrossRef]
4. Ben-Ami R, Berman J, Novikov A, Bash E, Shachor-Meyouhas Y, Zakin S, et al. Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerg Infect Dis* 2017;23(2):195-203. [CrossRef]
5. Sun M, Chen C, Xiao W, Chang Y, Liu C, XU Q. Increase in *Candida parapsilosis* Candidemia in Cancer Patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2019;11(1):e2019012. [CrossRef]
6. Mora Carpio AL, Climaco A. Fungemia Candidiasis. [Updated 2019 Jun 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436012>.
7. Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Arıç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyol Bul* 2011;45(3):478-88.
8. Lima-Neto R, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C, Neves RP. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. *Braz J Microbiol* 2014;45(2):515-22. [CrossRef]
9. Kassim A, Pflüger V, Premji Z, Daubenberger C, Revathi G. Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. *BMC Microbiol* 2017;17(1):128. [CrossRef]
10. Buchan BW, Ledebner NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51(5):1359-66. [CrossRef]
11. Yıldırım ST, Gumral R, Saraçlı MA, Şahiner F. Evaluation the performance of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of *Candida* isolates recovered from blood cultures. 6th Trends in Medical Mycology, 11-14 October 2013, Copenhagen, Denmark. *Mycoses* 2013;56(3):75(P053).
12. Özcan N, Ezin Ö, Akpolat N, Bozdağ H, Mete M, Gül K. Klinik örneklerde saptanan *Candida* türlerinin MALDI-TOF MS ile tanımlanması. *Dicle Tıp Derg* 2016;43(3):390-4.
13. Gabaldón T, Carreté L. The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2016;16(2):fov110. [CrossRef]
14. Kal Çakmaklıoğulları E, Aşgın N, Değerli K. *Candida* Tür Tayininde Rutinde Yaygın Olarak Kullanılan Yöntemlerle Yeni Kullanılmaya Başlayan MALDI TOF-MS ve Moleküler Yöntemlerin Sonuç Verme Süreleri, Maliyetleri ve Güvenilirliklerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2019;53(2):204-12. [CrossRef]
15. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, et al. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study: A 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2005;43(12):5848-59. [CrossRef]
16. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, Masih A, Kumar A, Meis JF, Chowdharya A. Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. *J Clin Microbiol* 2015;53(6):1823-30. [CrossRef]
17. Sow D, Fall B, Ndiaye M, Ba BS, Sylla K, Tine R, et al. Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a Resource-Poor setting. *Mycopathologia* 2015;180(3-4):173-9. [CrossRef]
18. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of fungi by using the internal transcribed spacer 2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* 1999;37:1846-51. [CrossRef]
19. Mirhendi H, Makimura K, Khoramzadeh M, Yamaguchi H. A One-Enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Jpn J Med Mycol* 2006;47:225-9. [CrossRef]
20. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR Using Internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3617-22. [CrossRef]
21. Gayıbova Ü, Cilo B, Ağca H, Ener B. Comparison of Phoenix™ TM Yeast ID Panel and API® ID 32C commercial systems for the identification of *Candida* species isolated from clinical samples. *Mikrobiyol Bul* 2014;48(3):438-48. [CrossRef]
22. Maruccia AP, Minervini P, Snitman GV, Sorge A, Guelfand LI, Moral LL. Comparison of the identification results of *Candida* species obtained by BD Phoenix™ and Maldi-TOF (Bruker Microflex LT Biotyper 3.1). *Rev Argent Microbiol* 2018;50(4):337-40. [CrossRef]
23. Stefaniuk E, Baraniak A, Fortuna M, Hryniewicz W. Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods-API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. *Pol J Microbiol* 2016;65(1):111-4. [CrossRef]
24. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 2013;20(2):153-8. [CrossRef]