

Candida Cinsi Mayaların Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Analizi[§]

Hatice ERDEM*, Sidre ERGANİŞ*, Ebru EVREN**, Fatma Nur AKSAKAL***, Kayhan ÇAĞLAR*, Ayşe KALKANCI*

*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

**Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

***Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara

ÖZ

Amaç: İnsanlarda en sık hastalık etkeni olan *Candida* cinsi mayaların tür düzeyinde tanımlanmaları tedavi seçeneklerini değiştirdiği için büyük önem taşımaktadır. Klasik tanı yöntemlerini kullanmak açısından yetersiz olan laboratuvarların birçoğu ticari tanımlama sistemlerine başvurmuştur. Ancak, ticari sistemlerin "doğrulukları" çeşitli karşılaştırmalı çalışmalarda değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 2015 Haziran - 2016 Haziran tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda tür düzeyinde tanımlanan 276 *Candida* cinsi mayanın dağılımları incelenmiş, bir yıllık dağılımı doğru temsil edecek şekilde tabakalı örnekleme yöntemine göre 72 köken seçilmiştir. Klasik tanımlama yöntemleri olan mısır unu-tween 80 agarda morfoloji ve ID32C maya tanımlama yöntemine ek olarak MALDI-TOF yöntemi sonuçları karşılaştırılmıştır. Kökenlerin 27'si için altın standart yöntem olarak rRNA gen bölgesi ITS genleri dizi analizi ve PhoenixTM yöntemi uygulanarak ikinci bir karşılaştırma yapılmıştır.

Bulgular: Tür tanımlamasında altın standart yöntem olarak ID32C yöntemi kabul edildiğinde, 41 kökenin (%56) her üç yöntemle de doğru olarak tanımlandığı görülmüştür. Kalan 31 kökenin ise (%44) en az bir yöntem ile hatalı tanımlandığı anlaşılmıştır. Dizi analizi ve PhoenixTM ile yeniden tanımlanan 27 kökenin 14 tanesinin (%52) PhoenixTM sistemi ile, 16 tanesinin (%59) mısır unu-tween 80 agarda morfoloji yöntemi ile, 22 tanesinin (%81) MALDI-TOF ile, 21 tanesinin (%78) ID32C yöntemi ile doğru tanımlandığı hesaplanmıştır.

Sonuç: Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında MALDI-TOF yönteminin hızlı ve güvenilir sonuç verdiği, maliyeti göz önüne alındığında ise, *Candida* cinsi mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında en güvenilir yöntemin karbonhidrat asimilasyonuna dayalı ID32C yöntemi olduğu, diğer tanımlama yöntemlerinin ise %52 ve %59 doğrulukta tanımlama yapabildiği hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Candida*, ID32C, dizi analizi, MALDI-TOF, mısır unu-tween 80 agar, PhoenixTM, tür tanımı

ABSTRACT

Comparative Analysis of Different Methods Used for the Identification of *Candida* on Species Level

Objective: Since it changes treatment alternatives, identification of *Candida* yeast which is the most frequent infectious agent in human beings on species level. Many laboratories deficient in the use of classical diagnostic methods resort to commercially available automated identification methods. But, diagnostic "accuracy" of commercial identification systems have demonstrated variable results in various comparative studies. The aim of the present work is to compare different identification methods used for *Candida* species.

Material and Methods: Distribution of 276 *Candida* species was analyzed in Gazi University Hospital Microbiology Laboratory during the period between June 2015 and June 2016, and 72 isolates of *Candida* spp. were selected according to 'stratified random sampling' analysis method so as to accurately represent distribution related to this one year period *Candida* species. Identification results obtained from morphological evaluation on corn meal-tween 80 agar as a conventional method and ID32C yeast identification system in addition to MALDI-TOF identification patterns were compared. A second comparative analysis was performed for 27 isolates in 72 selected samples using rRNA region ITS gene sequencing and PhoenixTM system.

Results: When ID32C method was considered as the gold standard in species identification in this study, a total of 41 isolates (56%) were identified accurately by all three methods. The remaining 31 isolates (44%) were misidentified by at least one of the three methods. Among 27 isolates that were reidentified by DNA sequencing method, PhoenixTM identification system (n=14: 52%), morphology on corn meal-tween 80 agar (n=16: 59%), MALDI-TOF (n=22: 81%), and ID32C identification method (n=21: 78%) accurately identified indicated number of *Candida* isolates.

Conclusion: Among the techniques analysed, we estimated that the MALDI-TOF system presents valuable and fast results; however if we consider the costs of the methods, the most reliable method is ID32C method based on carbohydrate assimilation in identifying *Candida* species. Other methods presented accuracy between 52% and 79%.

Keywords: *Candida*, ID32C, DNA sequencing, MALDI-TOF, corn meal-tween 80 agar, PhoenixTM, species identification

Alındığı tarih: 08.04.2017

Kabul tarihi: 02.06.2017

Yazışma adresi: Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dekanlık binası 2. Kat Beşevler 06500 Ankara

e-posta: kalkanci@gazi.edu.tr

[§] Bu çalışma 16-20 Kasım 2016 tarihleri arasında Antalya'da düzenlenen 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mantarların cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmesi için deneyim gerektiren klasik mikolojik yöntemler kullanılmaktadır^(1,2). Küf mantarlarının tanımlanmaları için başlı başına bir yetkinlik gerektiren morfolojik değerlendirme zorunlu iken, mayalar ticari sistemler kullanılarak tanımlanabilir⁽³⁻⁵⁾. Klasik mikolojik yöntemler uzun sürebilir ve teknik olarak zordur. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarından, rutin örneklerin en hızlı şekilde işlenmesi ve en doğru sonucun iletilmesi beklenmektedir. Bu nedenle, günümüzde hastalık etkeni mayaların cins veya tür düzeyinde tanımlanmalarını gerçekleştiren çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir. Bazı ticari sistemler antifungal duyarlılık testi de yapabilmektedir⁽⁶⁾.

İnsanlarda en sık hastalık etkeni olan mayalar *Candida* cinsi mayalardır. *Candida albicans* en sık izole edilen türdür. *C. albicans* tanısında en yaygın kullanılan klasik yöntem çimlenme borusu testi ve mısır unu-tween 80 agarda klamidopor oluşturma özelliğidir⁽²⁾. Laboratuvarlar *C. albicans* türünü kolaylıkla tanımlamaktadır. Laboratuvarlarda *C. albicans* dışındaki türlerin tanımlanması için klasik olarak mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri kullanılabilir. Ancak, bütün *Candida* türlerinin tanımlayıcı özellikleri bulunmaması tanıda zorluk oluşturmaktadır. *Candida* dışındaki *Trichosporon* gibi mayalar ise tanımlayıcı morfolojik özellikleri çok belirgin olmasına karşın, deneyimsizlik nedeniyle tanımlanamadan kalabilmektedir⁽⁷⁾. Cins ve tür düzeyinde tedavi seçenekleri değiştiğinden, mantarların tanımlanmaları büyük önem taşımaktadır. Klasik tanı yöntemlerini kullanmak açısından yetersiz olan laboratuvarların birçoğu ticari tanımlama sistemlerine başvurmaktadır. Ancak, ticari sistemlerin “doğrulukları” çeşitli karşılaştırmalı çalışmalarda değişiklik göstermiştir⁽⁸⁻¹¹⁾.

Bu çalışmada, çeşitli *Candida* kökenlerinin tür tanımlamalarında sıklıkla kullanılan farklı yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Mikrobiyoloji rutin laboratuvarımızda kullanmakta olduğumuz maya tanımlama yöntemlerinden mısır unu-tween 80 agarda morfoloji ve karbonhidrat asimilasyonu esasına dayalı ID32C (bioMérieux, Fransa) maya tanımlama sistemi sonuçları, “Matrix-assisted laser desorption/ionization” (MALDI-TOF) tanımlaması sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Örneklerin bir bölümü için ITS bölgesi dizi analizine göre yapılan kesin tür tanımlama sonuçları, mantarların tür düzeyinde tanımlanmaları için rutin olarak kullanmadığımız, ancak bakteri tanımlanmasında bir dönem kullanmış olduğumuz “Becton Dickinson Phoenix™ Automated Microbiology System” kullanılarak yinelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin seçilmesi

2015 Haziran - 2016 Haziran tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen kan, idrar, endotrakeal aspirat ve yara örneklerinden izole edilen 276 *Candida* cinsi mayanın tür tanımlama sonuçlarına göre dağılımları incelenmiştir. Tür tanımlaması için çimlenme borusu oluşturma, mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri ve karbonhidrat asimilasyonu temelli ID32C® (bioMérieux, Fransa) yöntemleri kullanılmıştır. Örneklerin bir yıllık tür dağılımı %50 *C. albicans*, %17 *Candida glabrata*, %8 *Candida tropicalis*, %5 *Candida krusei*, %4 *Candida kefyr*, %2 *Candida parapsilosis*, %2 *Candida sake* ve %12 diğer türler şeklindedir. Çalışmamızda, bu sıklıkları temsil edecek şekilde 72 izolat tabakalı örnekleme yöntemi ile seçilmiştir. Tür dağılımı için benzer oranlar gözetilmiştir. Örneklerin 35 tanesi *C. albicans*, 12 tanesi *C. glabrata*, 6 tanesi *C. tropicalis*, 4 tanesi *C. krusei*, 3 tanesi *C. kefyr*, 2 tanesi *Candida guilliermondii*,

2 tanesi *C. parapsilosis*, 2 tanesi *C. sake*, 2 tanesi *Schwanniomyces etchellsii/Priceomyces carsonii* (Mısır unu ile *Candida*), birer tanesi ise *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae*, *Candida norvegensis*, *Candida sphaerica* olarak seçilmiştir. Seçilen örnekler önceki tanımlamalardan bağımsız ve “kör” olarak mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri ve karbonhidrat asimilasyonu temelli ID32C® yöntemleri ile yeniden tanımlanmıştır. Bu örnekler ayrıca MALDI-TOFF yöntemi uygulanmıştır. Böylece 72 izolat için mısır unu ve ID32C® yöntemleri ile MALDI-TOF yöntemi sonuçları karşılaştırılmıştır. Grubun içinden 27 örnek için bu üç yöntem ek olarak, DNA dizi analizi yöntemi ve Phoenix™ otomatik mikrobiyoloji tanımlama sistemleri ile ikinci bir tanımlama yapılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır.

Mısır unu-tween 80 agarda morfolojinin değerlendirilmesi

Mısır unu besiyeri (Oxoid, Thermo Scientific, Birleşik Krallık) ticari olarak satın alınmış, üretici firma önerilerine uygun olarak 17 g toz 1 lt distile su içinde çözülmüş ve bir süre kaynatılarak süspansiyon hâline getirilmiştir. Karışım 121°C’de 15 dk. otoklavlanmıştır. Besiyeri sıcaklığı 50°C civarına gelince, %1 oranında steril tween 80 eklenmiştir. Steril plaklara dökülerek hazırlanmıştır. Her bir köken bu besiyerine çizgi şeklinde ekilmiş, 48-72 saat süre ile oda ısısında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda besiyerleri 10x’luk ve 40x’luk büyütmede incelenmiştir⁽²⁾.

Karbonhidrat asimilasyonuna dayalı maya tanımlama sistemi

API ID 32C (bioMérieux, Fransa), kısaca ID32C sistemi kullanılmıştır. Toz hâline getirilmiş karbonhidrat içeren kuyucukların bulunduğu plastik plakada her bir kuyucuk üzerine 135 µl besiyeri ve inokulum eklenmiştir. Plakalar 24 saat, gere-

kirse 48 saat 30°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreme olan ve olmayan kuyucuklardan elde edilen sekiz basamaklı kodun “web” sayfası üzerinden karşılığı okunmuştur.

Phoenix™ otomatik mikrobiyoloji tanımlama sistemi

Phoenix™ Automated Microbiology System Yeast ID Panel (BD Biosciences, Sparks, MD, ABD) üretici firma önerilerine uygun olarak kullanılmıştır. Standardize edilmiş inokulum “Phoenix AST Broth” içinde hazırlanmıştır. Bir damla “Phoenix AST Indicator” eklenmiştir. Son konsantrasyon 5x10⁵ CFU/ml olarak düzenlenmiştir. İnokulum Phoenix paneline eklenmiş ve panel Phoenix cihazına yüklenmiştir. Sonuçlar 16-24 saat sonunda değerlendirilmiştir.

DNA dizi analizi

Sabouraud dekstroz agarda üremiş *Candida* kolonilerinin genomik DNA’ları proteinaz K içeren bir sıvı içinde 65°C’de iki saat süre ile sindirilerek, ardından fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi ile temizlenmiştir. DNA’lar nano spektrofotometrede ölçülmüştür (Nanodrop, ABD). Fungal rDNA’nın 5.8S bölümdeki ITS geninin çoğaltılması için ITS1 5’-CTT GGT CAT TTA GAG GAAGTA-3’ ve ITS4 5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’ primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer) kullanılarak boyandıktan sonra, ddNTP ile işaretli örnekler ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında kapiller elektroforez uygulanmıştır. Hem ITS1 hem de ITS4 primerleri ile iki kez dizileme yapılmıştır. Elde edilen DNA dizileri “National Center for Biotechnology Information” BLAST sistemi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak tanımlanmıştır.

MALDI-TOF

Tanımlama MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) cihazı ile yapılmıştır. Mayaların tür düzeyinde tanımlanması üretici firmanın önerdiği işlemler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. MALDI Biotyper skoru ≥ 2 olanlar güvenli tanımlama sınırları içinde, skoru ≥ 1.7 ve < 2.0 olası tanımlama sınırları içinde değerlendirilmiştir. Çalışılan tüm mayaların skoru ≥ 2 olarak belirlenmiştir.

Yöntemlerin karşılaştırılması

Çalışmada, 72 örneğin tanımlanmasında altın standart yöntem olarak ID32C yöntemi, 27 örneğin tanımlanmasında altın standart yöntem olarak DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Altın standart yöntemin sonucu "doğru" kabul edilerek, her bir türün tanımlanması için ayrı ayrı olmak üzere, her bir testin doğruluğu ve yanlışlığı hesaplanmıştır.

BULGULAR

Çalışma için seçilen 72 örneğin tür düzeyinde tanımlanmasında mısır unu-tween 80 agarda morfolojik özellikleri, ID32C maya tanımlama sistemi sonuçları ve MALDI-TOF sonuçları karşılaştırılmıştır. Bütün tanımlama sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Koyu renkli satırlar doğru tanımlanan 41 örneği içermektedir. Renksiz satırlar herhangi bir yöntem ile hatalı tanımlanan 31 örneği içermektedir.

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan karbonhidrat asimilasyonuna dayalı ID32C sistemi altın standart yöntem olarak kabul edildiğinde, 72 izolatın 41 tanesinde (%56) her üç yöntem ile aynı ve doğru sonuç alındığı görülmüştür. Tür düzeyinde bakıldığında, 35 *C. albicans* kökeninden 35'i de mısır unu-tween 80 agar ile doğru tanımlanırken, MALDI-TOF ile 24 tanesi *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. On iki *C. glabrata* kökeni de mısır unu-

tween 80 ile doğru tanımlanmış, MALDI-TOF ile 10 tanesi *C. glabrata* olarak tanımlanmıştır. Daha iyi anlaşılması açısından bu karşılaştırma bir tablo hâline getirilmiş ve Tablo 2'de sunulmuştur. MALDI-TOF veya mısır unu-tween 80 agardaki morfolojilerine göre yanlış tanımlanan 31 kökenin (72 izolatın %44'ü) 11 tanesi hem ID32C ile hem de mısır unu-tween 80 agar ile *C. albicans* olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF bu 11 kökeni albicans dışı kökenler olarak isimlendirmiştir. MALDI-TOF veya mısır unu ile doğru tanımlanmayan diğer 20 örnek ise ID32C ile albicans dışı türler olarak tanımlanan kökenlerdir. Seçilmiş 72 izolat için mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik özellikleri, ID32C maya tanımlama sistemi sonuçları ve MALDI-TOF tanımlama sonuçları karşılaştırıldığında MALDI-TOF yönteminin, mısır unu-tween 80 agarda morfolojik tanımlamadan daha yetersiz kaldığı değerlendirilmiştir.

Çalışmada, seçilen 72 *Candida* kökeninin 27 tanesine ayrıca dizi analizi ve Phoenix otomatik sistemleri ile ikinci bir değerlendirme uygulanmıştır. Bu 27 köken için altın standart yöntem olarak rRNA gen bölgesi ITS dizi analizi yöntemi kabul edilmiştir. Buna göre, yapılan doğruluk hesaplamasında, mısır unu-tween 80 agar ile 16 örnek (%59), Phoenix ile 14 örnek (%52), ID32C sistemi ile 21 örnek (%78), MALDI-TOF ile 22 örnek dizi analizi ile (%81) aynı tür tanımını vermiştir. Tablo 3'te altın standart yöntem olarak dizi analizi kabul edildiğinde, her beş tanımlama yönteminin doğruluk oranları sunulmaktadır. Bu 27 örnek için dizi analizinden sonra en güvenilir tanımlama yönteminin MALDI-TOF sistemi olduğu, bunu ID32C sisteminin izlediği anlaşılmıştır.

Karşılaştırılan beş tanımlama yönteminin test başına maliyet analizleri hesaplanmıştır. Tablo 4'te bu maliyetler ve tanımlama süreleri sunulmaktadır.

Tablo 2. ID32C altın standart yöntem kabul edildiğinde mısır unu-tween 80 agarda morfoloji ve MALDI-TOF yöntemlerinin doğrulukları.

	ID32 C (Altın Standart yöntem)	Doğru tanımlanan örnek sayısı (%)*	
		Mısır unu-tween 80	MALDI-TOF
<i>C. albicans</i>	35	35/35 (% 100)	24/35 (% 69)
<i>C. glabrata</i>	12	12/12 (% 100)	10/12 (% 83)
<i>C. tropicalis</i>	6	5/6 (% 83)	4/6 (% 67)
<i>C. krusei</i>	4	4/4	3/4 (<i>Issatchenkia orientalis</i>)
<i>C. kefyr</i>	3	1/3	3 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
<i>C. guilliermondii</i>	2	2/2	1/2 (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)
<i>C. parapsilosis</i>	2	1/2	2/2
<i>C. sake</i>	2	0/2	0/2
<i>Schwanniomycesetchellsii</i> / <i>Priceomycescarsonii</i>	2	1/2	0/2
<i>C. dubliniensis</i>	1	0/1	0/1
<i>C. norvegensis</i>	1	0/1	0/1
<i>C. lusitaniae</i>	1	0/1	1 (<i>Clavisporal usitaniae</i>)
<i>C. sphaerica</i>	1	0/1	0/1
TOPLAM	72	61/72 (% 85)	48/72 (% 68)

*: Örnek sayısı yüzde hesaplamaya uygun bulunmadığından 4 ve altındaki gruplarda yüzde hesaplanmamıştır.

Tablo 3. DNA dizi analizi altın standart yöntem kabul edildiğinde mısır unu-tween 80 agarda morfoloji, Phoenix™, ID32C ve MALDI-TOF yöntemlerinin doğrulukları.

	DNA dizi analizi (Altın Standart yöntem)	Mısır unu-tw80	Phoenix™	ID32C	MALDI-TOF
<i>C. parapsilosis</i>	5	1/5	5/5	2/5	5/5
<i>C. glabrata</i>	4	4/4	3/4	4/4	4/4
<i>C. krusei</i> / <i>Issatchenkia orientalis</i>	4	4/4	2/4	4/4	3/4 (<i>I. orientalis</i>)
<i>C. tropicalis</i>	3	2/3	3/3	2/3	2/3
<i>C. kefyr</i> / <i>Kluyveromyces marxianus</i>	3	2/3	0/3	3/3	3/3 (<i>K. marxianus</i>)
<i>C. guilliermondii</i> / <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2	2/2	1/2	2/2	1/2 (<i>M. guilliermondii</i>)
<i>C. dubliniensis</i>	2	1/2	0/2	1/2	1/2
<i>C. inconspicua</i>	1	0/1	0/1	0/1	1/1
<i>C. orthopsilosis</i>	1	0/1	0/1	0/1	1/1
<i>C. lusitaniae</i>	1	0/1	1/1	1/1	1/1
<i>C. sphaerica</i>	1	0/1	0/1	1/1	0/1
TOPLAM	27	16/27 (% 59)	14/27 (% 52)	21/27 (% 78)	22/27 (% 81)

*: Örnek sayısı yüzde hesaplamaya uygun bulunmadığından gruplarda yüzde hesaplanmamıştır.

Tablo 4. Test başına maliyet ve tanımlama süreleri.

Yöntem	Test Başına Maliyet (Cihaz hariç)	Tanımlama Süresi
Mısır unu – tween 80 agar	0.3 TL	48-72 saat
ID32C	25 TL	24-48 saat
Phoenix™	24 TL	16-18 saat
DNA dizi analizi	50 TL	12 saat
MALDI-TOF	6 TL	3 dakika

tanımlanmasında “doğruluk” ölçütünde karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Candida* cinsi mayaların tanımlanmasında kullanılan karbonhidrat asimilasyonu prensibine dayalı ID32C maya tanımlama sistemi sonuçları altın standart kabul edilerek karşılaştırılmalı bir analiz yapılmıştır. 2016 yılında yayımlanan Koneman'ın Mikrobiyoloji kitabının mikoloji bölümünde *Candida* cinsinin tanımlanmasında mısır unu-tween 80 agardaki morfolojinin yeterli olamayacağı ve birçok tür için

belirgin özelliklerin bulunmadığı belirtilmiştir⁽²⁾. Bu nedenle bazı türler için morfolojik değerlendirme altın standart yöntem olarak kabul edilmemelidir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında morfolojik özelliklerin değerlendirilebilmesi için gerekli olan deneyimli personel eksikliği nedeniyle biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Bu testlerin karşılaştırıldığı çok merkezli bir çalışmada, Vitek ve API 20C AUX sonuçları değerlendirilmiştir⁽¹³⁾. Toplam 473 izolatın değerlendirildiği çalışmada, *Candida* cinsi dışındaki türler de bulunmaktadır. *C. albicans* tanımlanmasında genel olarak sorun yaşanmamıştır. En çok *C. parapsilosis* yanlış tanımlanmıştır. Altın standart yöntem olarak morfolojik özelliklerin kabul edildiği bu çalışmada elde edilen sonuçların dikkatle analizi gerekir. Mısır unu morfolojisine göre *C. parapsilosis* olarak tanımlanan örnekler biyokimyasal olarak *Candida famata* olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlardan hangisinin doğru olduğu tartışılmalıdır.

Çalışmamızda olduğu gibi karbonhidrat asimilasyonu altın standart tanımlama yöntemi olarak kabul edildiğinde, MALDI-TOF ve/veya mısır unu-tween 80 agar morfolojisinin 31 köken için (%44) hatalı tanımlama yaptırdığı anlaşılmıştır. Bu kökenlerin 11 tanesi, hem ID32C ile hem de mısır unu-tween 80 agar ile *C. albicans* olarak tanımlanmış, fakat MALDI-TOF ile bu kökenler *albicans* dışında türler olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF ilginç bir şekilde *C. albicans* tanımlamasında %69 oranında doğru sonuç verebilmiştir. Beş yöntemin karşılaştırıldığı ve dizi analizinin altın standart kabul edildiği 27 kökenlik ikinci analizde ise MALDI-TOF'un doğru tanımlama yüzdesi yüksek bulunmuştur (%81). İki analiz arasındaki bu farkın nedeni *C. albicans* türünün ikinci analiz grubunda bulunmamasıdır. MALDI-TOF'un *C. albicans* türünün tanımlanmasında ID32C ile karşılaştırıldığında %31 oranında hata yapmış olması ilginçtir. Bu kökenlerin tamamı mısır unu-tween

80 agarda klamidospore oluşturmuştur. Bu nedenle ID32C'in *C. albicans* olan tür tanımı doğrudur. Bu çalışmanın en dikkat çekici sonuçlarından biri *C. albicans* için MALDI-TOF ile elde edilen bu düşük tanımlama oranlarıdır. Bu sonuçlarımızı doğrulayacak bir başka çalışmaya rastlanmamıştır.

Tanımlamalar içinde bir adet *C. dubliniensis* bulunmaktadır. Bu tür mısır unu-tween 80 agarda tipik klamidospore oluşturmamıştır. ID32C de bu kökeni *C. albicans* olarak isimlendirmiştir. Tek köken olduğu için başka analiz yapılmamakla birlikte, *C. dubliniensis* tür tanımlamasının rutin laboratuvarlarda sorun oluşturduğu bir kere daha kanıtlanmıştır.

ID32C ve mısır ununda *C. kefir* olarak tanımlanan 3 köken de, MALDI-TOF ile *Kluyveromyces marxianus* olarak isimlendirilmiştir. *K. marxianus*, *C. kefir*'in eşeyli (telemorf) ismidir. İnsan enfeksiyonlarında eşeyli form etken olamaz. MALDI-TOF sisteminde bilgi bankasının eşeyli form ile oluşturulmuş olduğu anlaşılmaktadır. Aslında bu bir hatalı tanımlama değildir. Kütüphane oluşturulurken, eşeyli formun ismi kullanıldığı için benzer proteomik profili bu tanımlama vermektedir. Klinik anlamı olan *C. kefir* türü ile bilgi kaydının düzeltilmesi uygun olacaktır. MALDI-TOF sistemi bilgi bankasında bulunan bütün tür kayıtlarının eşeysiz isimleri içerecek şekilde güncellenmesi gerekmektedir. Benzer bir uygunsuzluk *C. krusei* - *Issatchenkia orientalis* tanımlaması için de geçerlidir. MALDI-TOF *C. guilliermondii* yerine *Meyerozyma guilliermondii* tanımını, *C. lusitaniae* yerine *Clavispora lusitaniae* tanımını vermiştir. Bunlar aynı türdür. Buna benzer terminolojik karışıklıklar zaman zaman gen bankası kayıtlarında da görülmektedir. Tedavi düzenlenmesinde tür tanımı kullanılmaktadır. Sistem bilgi kayıtlarında sürekli güncellemeler yapılamaz ise, rutin tanımlama sonuçları verilmeyen önce klinisyen için alışılmış isimler kullanılarak düzeltilmesi bu sorunları ortadan kal-

dırabilir. Burada mikrobiyoloji laboratuvarından tanımlama sonucu çıkarılmadan önce taksonomik bilgi eşliğinde gözden geçirilmesi gerektiği bir kez daha vurgulanmalıdır. Yüksek teknolojik yöntemler kullanıldıkça, farklı türler karşımıza çıkmaya devam edecektir.

Toplam 124 *Candida* kökeninin değerlendirildiği Polonya merkezli bir çalışmada, ID32C, Vitek 2 YST sonuçları iki ayrı MALDI-TOF ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda ID32C yönteminin MALDI-TOF ile uyumu %98.4, Vitek 2 YST sisteminin %100 bulunmuştur. Bu çalışmada iki kütle spektrometresinden, bizim de çalışmamızda kullandığımız, Bruker sistemi, Vitek sisteminden bir miktar üstün bulunmuştur. Her iki MALDI-TOF cihazı da genel olarak ID32C ve Vitek 2YST tanımlama sistemlerine uyumlu sonuç vermiştir⁽¹⁴⁾.

Ülkemizde de MALDI-TOF kullanımı yaygınlaşmakta ve son yıllarda bu konuda yapılan yayın sayısı artmaktadır. Özcan ve ark.⁽¹⁵⁾, 297 *Candida* kökenini tür düzeyinde tanımlamak için çimlenme borusu oluşturma ve MALDI-TOF sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar kökenlerin tamamını tür düzeyinde tanımlamışlar, ancak bu sonuçları bir başka tanımlama yöntemi ile karşılaştırmamışlardır. Bu nedenle sonuçları sonuçlarımız ile karşılaştıramamıştır.

Fatania ve ark.⁽¹⁶⁾ standart biyokimyasal tanımlama (SBT) olarak API 20C AUX yöntemini, MALDI-TOF ile karşılaştırmışlardır. Çoğunluğu *Candida* cinsine ait toplam 200 maya kökeninden 182 tanesinin (%91) SBT ve MALDI-TOF ile aynı tür olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Uyumsuz sonuç veren 18 örnekten 3 tanesine bir başka merkez MALDI-TOF yöntemini uygulamış ve aynı tanımlama sonucunu verdiği için dizi analizine gönderilmemiştir. Kalan 15 örneğe dizi analizi uygulanmıştır. MALDI-TOF ile isimlendirilemeyen 8, SBT ile isimlendirilemeyen 4 örnek dizi analizi ile tanımlanmıştır. Bu

araştırmacılar MALDI-TOF sistemini rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için güvenilir bulmuş, gerektiğinde bir başka doğrulama yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Kim ve ark.⁽¹⁷⁾ 2016 yılında yaptıkları çalışmada, Vitek 2 sistemi ile *C. famata* (38 adet), *C. lusitaniae* (12 adet), *Meyerozyma guilliermondii* (5 adet, *Candida guilliermondii*) olarak tanımlanan toplam 55 kökeni, BD Phoenix sistemi, Vitek MALDI-TOF sistemi ve DNA dizi analizi yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışma, tasarımı bakımından çalışma sonuçlarımız ile karşılaştırılabilecek en benzer çalışmadır. Köken sayıları da çalışmamıza yakındır. Vitek 2 ile *C. famata* olarak tanımlanan 38 köken dizi analizi ile 20 *C. tropicalis*, 7 *C. albicans*, 4 *C. parapsilosis*, 2 *M. guilliermondii*, 2 *Candida auris*, birer de *C. lusitaniae*, *C. krusei* ve *Pichia fabianii* olarak isimlendirilmiştir. Dizi analizi sonuçları esas alındığında, bu 38 kökenin 31 tanesi *Phoenix* ile doğru tanımlanmıştır. MALDI-TOF bu 38 örneğin 34 tanesini ITS dizi analizi ile aynı tür olarak tanımlamıştır. Toplam 55 köken için, Vitek MALDI-TOF ile doğru tanımlama yüzdesi %92,7 (51/55), Bruker MALDI-TOF %94.6 (52/55) olarak hesaplanmıştır. Kütle spektrometresi yöntemlerinin rutin laboratuvarlarda kullanılmasının dizi analizi sonuçlarına yakın güvenilirlikte sonuç vereceği, otomatize tanımlama sistemlerinin *C. albicans* dışındaki türlerin tanımlanmasında yetersiz kaldıkları bir kez daha gösterilmiştir.

Test maliyetleri rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yöntem seçiminde büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda düzenlenen geri ödeme kurları gereğince, Sağlık Uygulama Tebliği fiyatları uygulanmaktadır. Test başına maliyet hesabı yapılarak testin güvenilirliği yanında, maliyetinin de uygun olması beklenmektedir. Çalışmamızda değerlendirilen beş yöntemin süre ve maliyet açısından karşılaştırması yapılmıştır. En ucuz yöntem olan mısır unu-tween 80 agar mor-

folojisine dayalı tanımlama genellikle 48 saat bazen, 72 saat sürebilmekte ve deneyimli personel gerektirmektedir. MALDI-TOF yöntemi cihaz fiyatı hariç tutulduğunda sarf malzemesi gerektirmeyen, ucuz bir yöntemdir. Üstelik dakikalar içinde sonuç alınmaktadır. Ancak, cihazın yüksek maliyeti önemli bir engelleyici unsurdur. Örnek sayısı yüksek olan laboratuvarlarda, test karşılığı firma tarafından temin edilmesi koşuluyla, kullanımı yaygınlaşabilir. Biyokimyasal yöntemler olan ID32C ve Phoenix sistemlerinin maliyeti birbirine yakındır. Çalışma süresi de benzerdir. Phoenix sistemi ile genellikle 16 saat içinde sonuç alınmaktadır. En güvenilir yöntem olarak bilinen ancak yüksek maliyeti nedeniyle rutin laboratuvarlar için uygulaması zor olan dizi analizi yöntemi ise aynı gün içinde sonuç verebilmektedir. Maliyet analizine dayalı bir seçim yapılmak istendiğinde, her laboratuvarın kendi koşullarını ve test sayılarını düşünerek karar vermesi gerekecektir.

Kökenlerin tamamına dizi analizi uygulanamamıştır. Çalışmamızın en önemli eksiği budur. Başlangıçta planlanmış olmasına rağmen, maliyet ve teknik nedenler nedeniyle sonuçlandırılmamıştır. Yalnızca 27 örnek için altın standart yöntem olarak rRNA gen bölgesi ITS genleri dizi analizi uygulanarak ikinci bir karşılaştırma yapılabilmektedir. Dizi analizi ile karşılaştırıldığında en güvenilir sonuç veren yöntemin MALDI-TOF olduğu görülmüştür. *C. albicans* dışındaki türlere ait 27 kökenden 21 tanesinin (%78) ID32C yöntemi ile doğru tanımlandığı belirlenmiştir. MALDI-TOF ile dizi analizi arasındaki uyum %81 ile en yüksek değerdir. Diğer iki yöntem olan mısır unu-tween 80 agar morfolojisi ve Phoenix sistemleri %59 ile %52 oranında doğru tanımlama yapabilmektedir. Bu oranların hesaplanmasında 27 örnekten elde edilen sonuçlar kullanıldığı için, güvenilirlikleri düşük olmakla birlikte, rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için genel bir değerlendirme sunmaktadır.

Wang ve ark.⁽¹⁸⁾ Çin genelinde çok merkezli bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada 25 farklı tür içeren 2683 izolat değerlendirilmiştir. Bu geniş çalışmada iki ayrı firmaya ait iki MALDI-TOF sistemine ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu iki cihazdan elde edilen uyumsuz tanımlama sonuçları için ITS dizi analizi yöntemi kullanılarak maliyet azaltılmaya çalışılmıştır. Araştırmacılar bu yaklaşımı “integre altın standart” yöntem olarak isimlendirmişlerdir. Çalışmamızda da, örneklerin tamamına benzer nedenler ile ITS dizi analizi uygulanamamıştır. Seçilmiş 27 örneğin sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmamızın zayıf yönü bu açıdan bakıldığında kabul edilebilir sınırlar içindedir. Karşılaştırmalı çalışmaların büyük bölümü sınırlı sayıda örnek içermektedir⁽⁵⁾. Üstelik değerlendirilen örneklerin genellikle yarısı aslında tür tanımında sorun yaşamadığımız *C. albicans* kökenlerini içermektedir⁽¹⁹⁾. Çalışmaların birbiri ile karşılaştırılmasını kısıtlayan en önemli faktör kökenlerin tür çeşitliliğinin sınırlı olması, *C. albicans* dışındaki köken sayısının yetersiz olması ve her çalışmada kullanılan yöntemin birbirinden çok farklı olmasıdır^(20,21). Mayaların tanımlanmasında sorunlar olması nedeniyle güvenilir ve hızlı olduğu kadar, ucuz da olan bir yöntemin arayışı sürmektedir^(22,23).

Duyvejonck ve ark.⁽²⁴⁾ 347 örnek için MALDI-TOF yöntemini altın standart kabul ederek ITS bölgesinin dizi analizi sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılara göre, üreyen koloniden elde edilen DNA'nın dizilenmesinin düşük pozitif prediktif değere sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun yerine klinik örnekten doğrudan DNA elde edilmesini önermişlerdir. Gerek koloniden ve gerekse klinik örnekten doğrudan yapılan DNA eldesi ve dizi analizi yönteminin bütün mikroorganizmaların tanımlanmasında altın standart olduğu tartışmasız olmakla birlikte, bu yöntemin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında günlük kullanımı olası değildir. Üstelik bazı teknik kısıtlılıkları da bulunmaktadır⁽²⁵⁾. Bu nedenle

en az DNA kadar güvenilir olan “proteom” tanımlamasının kullanıldığı kütle spektrometresi yönteminin yaygınlaşmasının *Candida* cinsi içindeki tür tanımlamasında en doğru sonuçları sunacağı düşünülmektedir. Bu konuda ülkemizden yapılan bildirimlerin sayısı artmaktadır⁽²⁶⁾.

O zamana kadar çimlenme borusu oluşturma, mısır unu-tween 80 agarda morfolojik özelliklerin analiz edildiği klasik tanımlama yöntemine eşlik eden karbonhidrat asimilasyonuna dayalı biyokimyasal yöntemlerin kullanımına devam edilmeli, otomatize tanımlama sistemlerinden elde edilen tür tanımları mutlaka bir başka klasik yöntem ile doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Nerurkar V, Khan S, Kattungal S, Bhatia S. Identifying *Candida* and other yeast-like fungi: utility of an identification algorithm in resource limited setting. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:DC01-4. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9753.5259>
2. Procop GW, Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th Edition, Wolters&Kluwer, 2016.
3. Çopur Çiçek A, Koç AN, Ertürk A, Demir G, Bahçeci İ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *Abant Med J* 2104; 3:248-52.
4. İnci M, Atalay MA, Koç AN, Özer B, Kılınc Ç, Durmaz S. *Candida albicans* dışı mayaların tanımlanmasında VITEK 2 YST kart ile API 20C AUX sisteminin karşılaştırılması. *Dicle Tıp Derg* 2012; 39:80-2. <https://doi.org/10.5798/diclemedj.0921.2012.01.0099>
5. Öztürk T, Özseven AG, Sesli Çetin E, Kaya S. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe Tıp Derg* 2013; 14:17-22.
6. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, et al. 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; 53:1823-30. <https://doi.org/10.1128/JCM.00367-15>
7. Chao Q-T, Lee T-F, Teng S-H, et al. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PLoS One* 2014; 9:e109376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109376>
8. Sow D, Fall B, Ndiaye M, et al. Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. *Mycopathologia* 2015; 180:173-9. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9905-2>
9. Feyzioğlu B, Doğan M, Özdemir M, Baykan M, Baysal B. *Candida* türlerinin tanımlanmasında Corn Meal Agar, *Candida* ID2 kromojenik besiyeri ve API 32 IDC performansının değerlendirilmesi. *Selçuk Tıp Derg* 2014; 30:43-5.
10. Sav H, Demir G, Atalay MA, Koç AN. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2013; 70:175-80. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2013.37267>
11. Pravin Charles MV, Kali A, Joseph NM. Performance of chromogenic media for *Candida* in rapid presumptive identification of *Candida* species from clinical materials. *Pharmacognosy Res* 2015; 7(Suppl 1):S69-73. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.150528>
12. Dirican A. Tanı testi performanslarının değerlendirilmesi ve kıyaslanması. *Cerrahpaşa J Med* 2001; 32:25-30.
13. Karabıçak N, Uludağ Altun H ve ark. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında maya türlerinin tanımlanmasında sık kullanılan ticari sistemlerin değerlendirilmesi: çok merkezli bir çalışma. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49:210-20. <https://doi.org/10.5578/mb.9370>
14. 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; 65:111-4. <https://doi.org/10.5604/17331331.1197283>
15. Özcan N, Ezin Ö, Akpolat N, Bozdağ H, Mete M, Gül K. Klinik örneklerde saptanan *Candida* türlerinin MALDI-TOF MS ile tiplendirilmesi. *Dicle Tıp Derg* 2016; 43:390-4.
16. Fatania N, Fraser M, Savage M, Hart J, Abdolrasouli A. Comparative evaluation of matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry and conventional phenotypic-based methods for identification of clinically important yeasts in a UK-based medical microbiology laboratory. *J Clin Pathol* 2015; 68:1040-2. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203029>
17. Kim TH, Kweon OJ, Kim HR, Lee MK. Identification of uncommon *Candida* species using commercial identification systems. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26:2206-13. <https://doi.org/10.4014/jmb.1609.09012>
18. Wang H, Fan YY, Kudinha T, et al. A comprehensive evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry systems for identification of yeasts, part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1376-80. <https://doi.org/10.1128/JCM.00162-16>
19. Gayibova Ü, Dalyan Cilo B, Ağca H, Ener B. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında Phoenix Yeast ID Panel ile API ID 32C ticari sistemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48:438-48. <https://doi.org/10.5578/mb.7827>

20. **Zhao L, De Hoog S, Cornelissen A, et al.** Prospective evaluation of the chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Fungal Biol* 2016; 120:173-8.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.006>
21. **Kaçmaz B, Sipahi AB, Aksoy A.** *Candida* türlerinin tanımlanmasında “API ID32C” ve “RAPID YEAST PLUS” sistemlerinin karşılaştırılması. *ANKEM Derg* 2006; 20:214-6.
22. **Doğan Ö, İnkaya AÇ, Gülmez D, Uzun Ö, Akova M, Arıkan Akdağlı S.** PNA-FISH yönteminin kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin direkt tanımlanması ve antifungal tedavi planına olası etki yönünden değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50:580-9.
<https://doi.org/10.5578/mb.27948>
23. **Fraser M, Brown Z, Houldsworth M, Borman AM, Johnson EM.** Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Med Mycol* 2016; 54:80-8.
24. **Duyvejonck H, Cools P, Decruyenaere J, et al.** Validation of High Resolution Melting Analysis (HRM) of the amplified ITS2 region for the detection and identification of yeasts from clinical samples: comparison with culture and MALDI-TOF based identification. *PLoS One* 2015; 10:e0132149.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132149>
25. **Khodadadi H, Karimi L, Jalalizand N, Adin H, Mirhendi H.** Utilization of size polymorphism in ITS1 and ITS2 regions for identification of pathogenic yeast species. *J Med Microbiol* 2017; 66:126-33.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000426>
26. **Keçeli SA, Dündar D, Tamer GS.** Comparison of Vitek Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry versus conventional methods in *Candida* identification. *Mycopathologia* 2016; 181:67-73.
<https://doi.org/10.1007/s11046-015-9944-8>