

Candida Tür Tayininde Rutinde Yaygın Olarak Kullanılan Yöntemlerle Yeni Kullanılmaya Başlayan MALDI TOF-MS ve Moleküler Yöntemlerin Sonuç Verme Süreleri, Maliyetleri ve Güvenilirliklerinin Karşılaştırılması

A Comparison of the Costs, Reliability and Time of Result Periods of Widely Used Methods, New Molecular Methods and MALDI TOF-MS in the Routine Diagnosis of *Candida* Strains

Elçin KAL ÇAKMAKLIOĞULLARI¹, Nergis AŞGIN¹, Kenan DEĞERLİ²

¹ Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Karabük.

¹ Karabük University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Karabük, Turkey.

² Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

² Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Manisa, Turkey.

* Bu çalışma, Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından KBÜ-BAP-16/1-KP-243 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Makale Atfı: Kal Çakmaklıoğulları E, Aşgin N, Değerli K. *Candida* tür tayininde rutinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerle yeni kullanılmaya başlanan MALDI TOF-MS ve moleküler yöntemlerin sonuç verme süreleri, maliyetleri ve güvenilirliklerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2019;53(2):204-212.

ÖZ

Son yıllarda *Candida* cinsi mayaların tür tayininin hızlı ve doğru yapılması türler arasında antifungal tedaviye yanıtın farklılık göstermesi nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Günümüzde immün sistemi basılayan birçok hastalık ve uygulanan tedaviler sonrasında mantar enfeksiyonları ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada insanlarda en sık mantar enfeksiyonu etkeni olan *Candida* türlerinin tayininde kullanılan yöntemlerin doğruluk, maliyet ve sonuç verme sürelerini karşılaştırmak amaçlanmıştır. Çalışmaya, Temmuz 2016-Aralık 2017 tarihlerinde Karabük Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen, çeşitli klinik örneklerden kanlı agar (Becton Dickinson, ABD) veya Sabouraud dekstroz agar (SDA) (Oxoid, İngiltere)'da üreyen, koloni morfolojisi ve mikroskopik görünümü ile maya olduğuna karar verilen ve tam otomatize tanımlama sistemi Phoenix™ Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, ABD) ile *Candida* türü olarak tanımlanan 91 maya izolatu dahil edilmiştir. İzolatlar ayrıca ITS1 (ileri) 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' ve ITS4 5'-TCC TCC CGC TTC TTG ATA TGC-3' (Iontek, Türkiye) primerleri kullanılarak dizi analizi ve "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS)" sistemleri ile de tanımlanmıştır. Dizi analizi altın standart yöntem olarak kabul edilmiş ve sonuçlar *Candida* tür tanımlamasında doğruluk ölçütüne göre MALDI TOF-MS ve Phoenix™ Yeast ID Panel sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 91 *Candida* izolatu DNA dizi analizi sonuçlarına göre; 24'ü *Candida albicans*, 20'si *Candida tropicalis*, 16'sı *Candida parapsilosis*, 13'ü *Candida*

İletişim (Correspondence): Dr. Öğr. Üyesi Elçin Kal Çakmaklıoğulları, Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balıklar Kayası Mevkii, Demir Çelik Kampüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 78050 Karabük, Türkiye.
Tel (Phone): +90 505 805 9075, E-posta (E-mail): dreincinal@yahoo.com

glabrata, yedisi *Candida kefyr*, altısı *Candida krusei*, ikişer tanesi *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondi* ve biri *Candida lusitanae* olarak saptanmıştır. Moleküler DNA dizi analizi sonuçlarına göre tam otomatize sistem Phoenix™ ve MALDI TOF-MS sisteminin sırasıyla %92.3 ve %97.8 olarak doğru tanımlama yaptığı saptanmıştır. Doğruluğun yanı sıra maliyet ve sonuç verme süreleri çalışmamızda kullanılan üç yöntem arasında karşılaştırılmıştır. Üç tanımlama yöntemi için cihaz maliyeti hariç test başına maliyetleri ve SDA agarda saf olarak üretildikten sonraki sonuçlanma süreleri karşılaştırıldığında en düşük maliyetli ve en kısa sürede sonuç veren sistemin MALDI TOF-MS olduğu bulunmuştur. Bazı *Candida* türlerindeki antifungal direnç varlığı erken tedaviye başlama açısından tür düzeyinde tanımlamanın önemini ön plana çıkarmıştır. MALDI TOF-MS sisteminin yüksek doğru tanımlama performansına sahip olması, düşük maliyetli ve dakikalar içinde sonuç veriyor olması ile hızlı bir şekilde başlanacak antifungal tedavi kararının verilmesine olanak tanıyacaktır. Böylece mortalite, morbidite ve maliyet oranlarında azalma sağlanacaktır. Sonuç olarak, MALDI TOF-MS sisteminin hızlı, güvenilir ve test başı maliyetinin düşük olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanımının yaygınlaşmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: *Candida*; tür tanımlama; MALDI TOF-MS; moleküler dizi analizi; Phoenix™ Yeast ID Panel.

ABSTRACT

In recent years, the fast and accurate identification of the *Candida* species is of great importance as the response to antifungal treatment differs among species. Following the treatment of several immunosuppressive diseases, fungal infections can emerge. The aim of this study was to compare the accuracy, costs and time of result periods of the methods used in the identification of the most common human fungal infectious agent, *Candida* strains. From various clinical samples sent to the Microbiology Laboratory of Karabuk University Training and Research Hospital between July 2016-December 2017, a total of 91 yeast isolates cultivated in blood agar (Becton Dickinson, USA) and/or Sabouraud dextrose agar (SDA-Oxoid, UK), confirmed with colony morphology and microscopic appearance, identified as *Candida* species with a fully automated identification system (Phoenix™ Yeast ID Panel, Becton Dickinson Diagnostics, USA) were included in the study. All the samples were examined with sequence analysis using ITS1 forward 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' and ITS4 reverse 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' primers (Intek, Turkey) and the matrix-assisted laser desorption-ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS) systems. Molecular sequence analysis was accepted as the gold standard method and the results were compared with those of the other methods MALDI TOF-MS and Phoenix™ Yeast ID Panel in respect of the accuracy of the identification of *Candida* strains. According to the results of the DNA sequence analysis of the 91 *Candida* isolates included in the study, 24 were identified as *Candida albicans*, 20 *Candida tropicalis*, 16 *Candida parapsilosis*, 13 *Candida glabrata*, seven *Candida kefyr*, six *Candida krusei*, two of each *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondi* and one *Candida lusitanae*. Compared to the results of the DNA sequence analysis, the accurate identification of the fully automated Phoenix™ system and the MALDI TOF-MS system was found as 92.3% and 97.8%, respectively. In addition to accuracy, costs and time of result periods of the three methods were also compared. Disregarding the cost of the device in the 3 methods, when the comparison was made of the cost per test and the time to results after pure production in SDA agar, the MALDI TOF-MS system was determined to have the lowest costs and provided results in the shortest time. As some of the *Candida* strains have antifungal resistance, identification of the strains must be a priority in respect of starting early treatment. The MALDI TOF-MS system has high performance in accurate identification, low costs and the system provides the results within minutes, thereby allowing immediate decision to be made for the antifungal treatment to be started. Thus, the morbidity, mortality and cost rates will be reduced. In conclusion, as the MALDI TOF-MS is a rapid, reliable and low cost per test system, it can be considered suitable for routine use in laboratories.

Keywords: *Candida*; strain identification; MALDI TOF-MS; molecular sequence analysis, Phoenix™ Yeast ID Panel.

GİRİŞ

Candida türleri insanların sindirim sistemlerinde ve mukoz membranlarında normal flora üyesi olarak bulunan maya türü mantarlardır¹. *Candida* cinsine ait 150'den fazla tür bulunmasına rağmen, bunların çok küçük bir kısmı insanlarda enfeksiyon etkeni olarak rol oynamaktadır. İmmün sistemi baskılanmış olan transplant, hematolojik malignansi, kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) olan hastalar ile birlikte, geniş spektrumlu antibiyotik ve antikanser ilaçların, santral venöz kateterlerin kullanımındaki artış fırsatçı mantarların ortaya çıkmasına katkıda bulunan en önemli faktörler arasındadır^{2,3}. Klinik örneklerden sıklıkla izole edilen *Candida* türleri; *Candida albicans*, *Candida guilliermondi*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis* ve *Candida glabrata*'dır⁴.

Candida türlerinin tanımlanmasında rutinde mikroskopik ve morfolojik özelliklerinin incelenmesi ve substrat asimilasyonunun değerlendirilmesine dayanan bazı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler oldukça uzun zaman gerektiren ve rutin laboratuvarında iş yükünü arttıran yöntemlerdir. Bu nedenle daha kısa sürede sonuç veren, uygulaması daha kolay olan çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir⁵. "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS)", kütle spektrometresiyle protein parmak izi tanımlanması olup *Candida* izolatlarının tür tayininde yüksek başarıya ulaşmıştır⁶. Moleküler dizi analizi yöntemi, güvenilirliği nedeniyle referans olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak, uygulama ve değerlendirmedeki güçlükleri, yüksek maliyeti ve zaman alıcı olması gibi dezavantajları rutin laboratuvarlarda kullanımını güçleştirmektedir^{7,8}. *Candida* türlerinde hızlı ve en doğru şekilde tanımlamanın yapılması, doğru anti-fungal tedavi uygulanabilmesi için çok önemlidir.

Çalışmamızda, *Candida* türlerinin tanımlanmasında altın standart yöntem olarak DNA dizi analizi yöntemi referans alınarak, tam otomatize tanımlama sistemi Phoenix™ Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, ABD) ve MALDI TOF-MS (Bruker Daltonics, Almanya) sisteminin doğruluk oranlarının hesaplanması ve kullanılan tüm testlerin maliyet ve sonuç verme sürelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 02-05-2018 ve Karar no: 5/17).

Çalışmaya, Temmuz 2016-Aralık 2017 tarihleri arasında, Karabük Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerde üreyen, Phoenix™ Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, ABD) ile cins düzeyinde *Candida* olarak tanımlanan 91 maya izolatu dahil edildi. *Candida* izolatları MALDI TOF-MS sistem ve moleküler dizi analizi çalışılıncaya kadar %30 gliserollü beyin kalp infüzyon buyyon içerisinde -20°C'de saklandı. Tüm izolatlar, stok besiyerinden Sabouraud dekstroz agar (SDA)'a (Becton Dickinson, ABD) tek koloni ekim yöntemiyle pasajlanarak 48

saat inkübe edildi. Uygulanan yöntemler sonrasında elde edilen sonuçların her biri, her bir yöntem için ayrı araştırmacı tarafından kaydedildi.

Phoenix™ Tam Otomatize Tanımlama Sistemi

Tam otomatize tanımlama sistemi Phoenix™ Yeast ID Panel üretici firma önerileri doğrultusunda kullanıldı. SDA besiyerinde üremiş olan saf kolonilerden alınarak Phoenix AST Buyyon içinde 0.5 McFarland olacak şekilde inokulum hazırlandı. Hazırlanan inokulum panele eklenerek Phoenix cihazına yüklendi ve 16-18 saat sonra sonuçlar alındı.

MALDI TOF-MS

MALDI TOF-MS ile gerçekleştirilen *Candida* tanımlamaları Bruker Microflex LT (Bruker Daltonics, Almanya) cihazında üretici firma önerileri doğrultusunda yapıldı. Test edilecek *Candida* kolonisi 300 µl steril distile su içine konularak üzerine 900 µl etanol eklendi. Vortekslenip santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. İşlem bir kez daha tekrarlandı. Çökelti üzerine 50 µl %70 formik asit çözeltisi eklendi. Bu karışım üzerine 50 µl asetronitril eklendi. Santrifüj yapıldıktan sonra 1 µl süpernatant cilalanmış hedef tabla üzerine konuldu ve üzerine 2 µl matriks solüsyonu eklenerek havada kurutuldu. Hazırlanan hedef tabla cihaza yüklendi. MALDI Biotyper 3.1 ile tiplendirme yapıldı. MALDI Biotyper skoru ≥ 2 olanlar tür düzeyinde güvenilir tanımlama sınırları içinde, skoru ≥ 1.7 ve < 2.0 olanlar ise cins düzeyinde güvenilir tanımlama sınırları içinde değerlendirildi. Çalışılan tüm mayaların skoru ≥ 2 olarak bulundu.

Moleküler Dizi Analizi

Candida örnekleri, otomatik Fluorion® i12 Nükleik Asit İzolasyon Sistemi (Iontek, Türkiye) ile Fluorion® i12 Nükleik Asit İzolasyon Kitleri kullanılarak manyetik tanecik teknolojisi ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), daha önce tanımlanmış bir yöntem temel alınarak; ITS1 forward 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' ve ITS4 revers 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (Iontek, Türkiye) primerleri ile gerçekleştirildi⁹. GelDoc cihazı ve Quantity One programı ile UV ışık altında görüntü alındı. Jelde görüntülenen örnekler, dizileme işlemine sokuldu. Örnekler ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazı ile ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizilendi. Elde edilen DNA dizileri "National Center for Biotechnology Information" BLAST sistemi kullanılarak tanımlandı.

Moleküler dizileme yöntemi altın standart yöntem olarak kabul edilerek elde edilen sonuçlar MALDI TOF-MS ve Phoenix™ Yeast ID Panel yöntemlerine ait sonuçlar ile *Candida* tür tanımlamasında doğruluk ölçütüne göre karşılaştırıldı. Doğru tanımlamanın yanı sıra testlerin maliyeti ve sonuç verme süreleri çalışılan üç yöntem için karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmamıza 53 idrar, 25 kan, sekiz endotrakeal aspirat, üç bronkoalveoler lavaj ve iki balgam örneğinde üreyen, Phoenix™ Yeast ID Panel değerlendirmesi ile *Candida* türü olduğu belirlenen 91 maya izolatu dahil edilmiştir. Kanlı agar (Becton Dickinson, ABD) veya

SDA besiyerlerinde üreyen şüpheli maya kolonileri saf ise doğrudan çalışmaya alınmıştır. Karışık üremelerde ise gentamisin/kloramfenikollü SDA besiyerine pasajlanarak çoğaltıldıktan sonra tanımlama yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 91 *Candida* izolatından elde edilen DNA dizi analizi sonuçlarına göre; 24'ü *C.albicans*, 20'si *C.tropicalis*, 16'sı *C.parapsilosis*, 13'ü *C.glabrata*, yedisi *C.kefyr*, altısı *C.krusei*, ikisi *C.dubliniensis*, ikisi *C.guilliermondi* ve biri *C.lusitaniae* olarak tanımlanmıştır. Altın standart yöntem olarak kabul ettiğimiz DNA dizi analizi sonuçları referans alınarak, Phoenix™ tam otomatize tanımlama sistemi ve MALDI TOF-MS doğruluk ölçütüne göre karşılaştırıldığında Phoenix™ tam otomatize tanımlama sistemi için bu oran %92.3, MALDI TOF-MS için ise %97.8 olarak tespit edilmiştir (Tablo I).

Çalıştığımız üç tanımlama yönteminin cihaz maliyeti hariç test başı maliyetleri ve SDA agarda saf olarak üretildikten sonraki sonuçlanma süreleri karşılaştırılmıştır. Moleküler dizi analizi sonuçları 12 saat sonra elde edilmiş ve test başı maliyeti 100 TL olarak belirlenmiştir. Phoenix™ Yeast ID Panel sonuçları 16-18 saat sonra belirlenmiş ve test başı maliyeti 18 TL olarak saptanmıştır. MALDI TOF-MS sisteminde sonuçlar üç dakika sonra belirlenmiş ve test başı maliyeti 15 TL olarak bulunmuştur (Tablo II).

Tablo I. Moleküler Dizi Analizi Sonuçları ile Phoenix™ Yeast ID Panel ve MALDI TOF-MS Karşılaştırması

Moleküler dizi analizi (n= 91)	Phoenix™ Yeast ID panel Sayı	MALDI TOF-MS Sayı
<i>Candida albicans</i> (n= 24)	21	23
<i>Candida tropicalis</i> (n= 20)	19	20
<i>Candida parapsilosis</i> (n= 16)	15	15
<i>Candida glabrata</i> (n= 13)	11	13
<i>Candida kefyr</i> (n= 7)	7	7
<i>Candida krusei</i> (n= 6)	6	6
<i>Candida dubliniensis</i> (n= 2)	2	2
<i>Candida guilliermondi</i> (n= 2)	2	2
<i>Candida lusitaniae</i> (n= 1)	1	1
Doğruluk (%)	92.3	97.8

Tablo II. Moleküler Dizi Analizi, Phoenix™ Yeast ID Panel ve MALDI TOF-MS Test Başı Maliyet ve Tanımlama Süresi Karşılaştırması

Yöntem	Test başı maliyet	Tanımlama süresi
Moleküler dizi analizi	100 TL	12 saat
Phoenix™ Yeast ID panel	18 TL	16-18 saat
MALDI TOF-MS	15 TL	3 dakika

TARTIŞMA

Maya mantarlarından *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar son yıllarda giderek artan sıklıkta karşımıza çıkmakta ve antifungal tedavinin doğru ve zamanında uygulanmaması mortalitede artışa neden olmaktadır³. Maya türlerinin doğru ve hızlı tanımlanması uygun antifungal tedavinin seçimi açısından çok önemlidir¹⁰. *Candida* enfeksiyonlarında ilk sırada *C.albicans* olmasına rağmen, antifungal tedaviye daha zor yanıt verdiği bilinen *C.tropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* gibi albicans dışı *Candida* türlerinin görülme oranı hızla artmaktadır¹¹. Pfaller ve arkadaşlarının¹² 6.5 yıl süren küresel çapta yapılan çalışmalarında, *C.albicans* dışı türlerin görülme sıklığındaki artış çok net olarak vurgulanmış, özellikle seyrek rastlanan türlerdeki artışın %50'ye ulaştığı belirtilmiştir. *Candida* türleri arasında antifungallere duyarlılık açısından farklar görülmektedir. *C.krusei* flukonazole doğal olarak dirençliyken, *C.glabrata* izolatlarında flukonazole, *C.lusitaniae* izolatlarında ise amfoterisin B'ye karşı duyarlılığın diğer türlere göre daha düşük olduğu belirtilmektedir⁴. Bu da tedavide kullanılacak olan antifungal seçimi için tür tanımlamasının önemini ortaya koymaktadır.

Günümüzde rutin laboratuvarlarda morfolojik ve biyokimyasal temele dayanan fenotipik tanımlama sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz yöntemlerden biri olan Phoenix™ Yeast ID Panel, karbonhidrat asimilasyonunun yanı sıra enzimatik reaksiyonları da kullanan tam otomatize bir tanımlama sistemidir. Gayibova ve arkadaşlarının¹³ yaptıkları çalışmada uzun süredir rutinde kullanılan ve karbonhidrat asimilasyon temeline dayalı API ID 32C ile Phoenix™ Yeast ID Panel'in uyumu değerlendirilmiş ve Phoenix™ Yeast ID Panel'in daha kısa sürede sonuç vermesi, sık izole edilen türlerde uyumun yüksek olması ve maliyetinin daha düşük olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanımının uygun olacağı kanısına varılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda rutinde sıklıkla kullanılan Phoenix™ Yeast ID Panel'i kullanmayı tercih ettik. Yapılan çalışmalarda^{14,15} Phoenix™ Yeast ID Panel'in %90'ın üzerinde doğruluk ile tanımlama yaptığı bulunmuş olup çalışmamızda bu oran %92.3 olarak saptanmıştır. Saf kültür plağından sisteme yükleme yapıldıktan 16-18 saat sonra sonuç alınması ve çalışma için herhangi bir mikolojik deneyime gerek duyulmaması avantaj olarak görülse de tek başına tür tanımlamasında yeterli olmayacağı ve sonuçlarının mısır unu/tween 80 (MT₈₀) agarda yapılan morfolojik tanımlama ile desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür. MT₈₀ agarda yapılan değerlendirmenin mikolojik deneyim gerektirmesi ve uzun zaman alması rutin uygulamalarda dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda hata oranlarının *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.glabrata* türlerinden kaynaklandığı görülmektedir. Bu türler için MT₈₀ agarda yapılan değerlendirme ile doğru tanımlama yapılabileceğini düşünmekteyiz. Daha az görülen türler olan *C.kefyr*, *C.krusei*, *C.dublinskiensis*, *C.guilliermondi*, *C.lusitaniae*'da ise Phoenix™ sisteminin %100 doğru tanımlama yaptığı tespit edilmiş olsa da söz konusu türlerdeki izolat sayımızın az olması buna neden olmuş olabilir. Özellikle az görülen türlerin sayıca yüksek tutulduğu çalışmaların yapılmasının daha güvenilir sonuçlar vereceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda MALDI TOF-MS sisteminin tanımlamada doğruluk oranı %97.8 olarak bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalarda da bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. Görkem ve arkadaşları⁶ %100, Marklein ve arkadaşları¹⁶ %96, Stevenson ve arkadaşları¹⁷ %99, Van Veen ve arkadaşları¹⁸ %97.5 oranında doğru tanımlama yapıldığını bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmaların hiçbirinde izolatların tamamına dizi analizi uygulanmamıştır. Bizim çalışmamızda ise tüm izolatlara altın standart yöntem olarak kabul edilen DNA dizi analizi uygulanmıştır. Doğruluk oranlarının bu yöntem temel alınarak yapılması nedeniyle sonuçlarımızın daha güvenilir olduğu düşüncesindeyiz. Bazı çalışmalarda öncelikle, uygulaması kolay ve maliyeti daha düşük olan yöntemler karşılaştırılmış daha sonra uyumsuz olan az sayıdaki örnek moleküler çalışmaya alınmıştır^{19,20}. Bizim çalışmamızda ise moleküler dizi analizi, Phoenix™ tam otomatize sistem ve MALDI TOF-MS sistemi çalışmaya dahil ettiğimiz tüm izolatlara uygulanmıştır. MALDI TOF-MS sisteminde cihaz maliyeti göz ardı edildiğinde kullanılan test maliyeti oldukça düşük olup herhangi bir mikolojik deneyim gerektirmemesi ve sonucun dakikalar içinde elde edilmesi büyük bir avantajdır. Ancak, cihaz maliyetinin yüksek olması nedeniyle günümüzde örnek sayısı yüksek olan üçüncü basamak hastanelerde MALDI TOF-MS sistemi kullanılabilir. MALDI TOF-MS sistemi yüksek duyarlılıklı, kolay, hızlı ve ucuz bir sistemdir^{21,22}. Bu nedenle kullanımın yaygınlaştırılması uygun olacaktır.

MALDI TOF-MS sistemi ile yapmış olduğumuz tanımlamada *C.kefyr*; *Kluyveromyces marxianus*, *C.krusei*; *Issatchenkia orientalis*, *C.guilliermondii*; *Meyerozyma guilliermondi*, *C.lusitaniae*; *Clavispora lusitaniae* şeklinde tür tanımlamaları tespit edilmiş olup söz konusu izolatların aynı türler olmasına rağmen MALDI TOF-MS sistemi gibi yüksek teknoloji kullanımını olan yöntemlerin bilgi bankasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu sistemin rutin laboratuvar kullanımına girmesiyle klinisyenler açısından oluşabilecek kafa karışıklığının önüne geçilmesi için sistemin bilgi bankasında mutlaka gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra sonuç verilmelidir. Benzer bir durum moleküler dizi analizinde de karşımıza çıkmış olup yaptığımız çalışmada gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra karşılaştırma yapılmıştır.

Dizi analizi, moleküler yöntemler içinde en klasik olan ve güvenilirliği nedeniyle referans olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak uygulama ve değerlendirmedeki güçlükler, yüksek maliyet ve uzun zaman alması gibi dezavantajları rutin laboratuvarlarda kullanımını güçleştirmekte ve daha çok araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır^{7,8}. Şahiner ve arkadaşlarının²³ yaptıkları çalışmada hastaların hastanede yatış süresi ve tedavileri sırasında uygulanan tanısal amaçlı testlerin maliyet-etkinlik durumları dikkate alındığında, moleküler yöntemlerin özellikle epidemiyolojik araştırmalarda ve doğrudan klinik örneklerde etkeni saptayabilen standardize edilmiş yöntemler geliştirildiğinde tercih edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Olası bulaş kaynaklarının bulunması amacıyla izole edilen örneklerin genotipik ilişkilerinin gösterilmesi için yapılan moleküler epidemiyolojik çalışmalarda çok değerli sonuçlar elde edilmiştir^{24,25}. *Candida* tür tanımlaması amacıyla yapılan çalışmalarda altın standart yöntem olarak moleküler dizi analizi çalışmaları kullanılsa da yüksek maliyeti nedeniyle kullanımı kısıtlı olmaktadır^{19,26}. Özellikle hastalarda maliyet gözetmeksizin doğrudan klinik örnekten tür tayininin yapılması doğru antifungal tedavinin başlanması

açısından büyük önem taşımaktadır²⁷. DNA dizi analizi yönteminin altın standart yöntem olması, doğrudan klinik örnekten çalışılabiliyor olması çok büyük avantaj olmakla birlikte, maliyet, iş yükü, teknik imkanlar ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle günümüzde rutin laboratuvar uygulamalarında kullanımı mümkün değildir.

Bazı *Candida* türlerinde antifungal direnç varlığı erken tedaviye başlama açısından tür düzeyinde tanımlamanın önemini ön plana çıkarmıştır. Bu açıdan bakıldığında zaman MALDI TOF-MS sisteminin diğer sistemlere göre hızlı, güvenilir ve ucuz bir sistem olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu sistemin rutin laboratuvarlarda yaygınlaştırılarak kullanılması gerektiği düşüncesindeyiz. Unutulmamalıdır ki, hastaya en kısa sürede başlanacak olan doğru antifungal tedavi hem hastanın mortalite ve morbidite oranında azalma sağlayacak hem de gerekli maliyetlerin azalmasına neden olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Hazen KC, Singleton DR, Masuoka J. Influence of outer region mannosylphosphorylation on N-glycan formation by *Candida albicans*: Normal acid-stable N-glycan formation requires acid-labile mannosylphosphate addition. *Glycobiology* 2007;17(10):1052-60.
2. Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 1):S43-53.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010;36(1):1-53.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(1):133-63.
5. Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, et al. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1994;32(5):1184-7.
6. Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73(1):65-7.
7. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(2):332-70.
8. Lemaignere CG, Roillides E, Hacker J, Müller FM. Molecular typing for fungi a critical review of possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect* 2003;9(3):172-85.
9. 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.
10. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis* 2000;30(4):662-78.
11. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(4):499-511.
12. 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.
13. 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.

14. Posteraro B, Ruggeri A, De Carolis E, Torelli R, Vella A, De Maio F, et al. Comparative evaluation of BD Phoenix™ and Vitek 2 systems for species identification of common and uncommon pathogenic yeasts. J Clin Microbiol 2013;51(11):3841-5.
15. Morgan M, Urquiza Y, Tracey J, Nwosu O. Comparative evaluation of the BD Phoenix™ yeast ID panel and the Vitek2 colorimetric yeast identification card for identification of yeast isolated from clinical samples. American Society for Microbiology 112th General Meeting. June 16-19 2012, San Francisco. Abstract Book, P-1220. ASM Press, Washington DC.
16. Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horre R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J Clin Microbiol 2009;47(9):2912-7.
17. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. J Clin Microbiol 2010;48(10):3482-6.
18. Van Veen SQ, Claas ECJ, 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.
19. Erdem H, Erganiş S, Evren E, Aksakal F, Çağlar K, Kalkancı A. Comparative analysis of different methods used for the identification of *Candida* on species level. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2017;47(3):114-24.
20. Kim TH, Kweon OJ, Kim HR, Lee MK. Identification of uncommon *Candida* species using commercial identification systems. J Microbiol Biotechnol 2016;26(12):2206-13.
21. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF-MS mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev 2012;36(2):380-407.
22. Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. J Clin Microbiol 2011;49(4):1614-6.
23. Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardiç 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.
24. Yucesoy M, Marol S, Ergon C. Genel cerrahi servisindeki hastalardan soyutlanan *Candida* suşlarının moleküler epidemiyolojik izlemi. FLORA 2004;9(1):47-53.
25. Cerikçioğlu N, İlki A, Bilgen H, Özek E, Metin F, Kalaca S. The relationships between candidemia and candida/colonization and virulence factors of the colonizing strains in preterm infants. Turk J Pediatr 2004; 46(3):245-50.
26. Toraman ZA, Bulut Y, Yılmaz M, Ozdarendeli A. Molecular identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from clinical samples. Mikrobiyol Bul 2005;39(2):199-204.
27. Wellinghausen N, Siegel D, Winter J, Gebert S. Rapid diagnosis of candidaemia by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples. J Med Microbiol 2009;58(Pt 8):1106-11.