

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ



TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MAYA MANTARLARININ HIZLI TANIMLANMASINDA  
LİZİS FİLTASYON SONRASI MALDİTOF-MS  
YÖNTEMİNİN KULLANIMI**

Arş. Gör. Dr.Sami EREN

İZMİR  
2019

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MAYA MANTARLARININ HIZLI TANIMLANMASINDA  
LİZİS FİLTRASYON SONRASI MALDİTOF-MS  
YÖNTEMİNİN KULLANIMI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Arş. Gör. Dr.Sami EREN**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Dilek YEŞİM METİN**

**İZMİR**

**2019**

## ÖN SÖZ

Uzmanlık eğitimimde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine, tez çalışmamda bilgisi ve desteğiyle yanımda olan tez danışmanım Prof. Dr. Dilek Yeşim Metin 'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamda yardımlarından dolayı mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan sağlık teknikeri Sait Deniz ve Kadriye Şahin başta olmak üzere tüm personele teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Arş. Gör. Dr. Sami EREN

İZMİR-2019

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TABLolar LİSTESİ .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ .....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>2</b>
2.1. <i>Candida</i> Enfeksiyonları ve epidemiyoloji .....	2
2.2. Kandidemi.....	3
2.3. Tanı .....	5
2.4. Tanı Yöntemleri .....	5
2.4.1. Germ tüp testi .....	6
2.4.2. Dalmau Plak Yöntemi .....	6
2.4.3. Biyokimyasal testler .....	7
2.4.5. Kromojenik Besiyerleri .....	7
2.4.6. Maldi TOF MS .....	7
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>9</b>
3.1. Gereçler ve Kimyasallar .....	9
3.2. Yöntemler .....	10
3.2.1. Kan kültürü sistemi .....	10
3.2.2. Pozitif kan kültürünün işlenmesi.....	10
3.2.2.1 Gram boyama .....	10
3.2.2.2.Dalmau plak yöntemi .....	11
3.2.2.3.MALDI-TOF MS yöntemi .....	11
3.2.3.Lizis Filtrasyon sonrası MALDI TOF MS yöntemi.....	11
3.2.4.LF-MS yönteminin Uygulanması.....	13
3.2.5. İstatiksel Analiz Yöntemi.....	14
<b>BULGULAR .....</b>	<b>15</b>
4.1. Dalmau Plak ve Maldi Tof MS Yöntemi ile İdentifikasyon Sonuçları .....	15
4.2. LF- MS ile İdentifikasyon Sonuçları .....	15

4.3.Gram boyama sonuçlarının LF- MS ile karşılaştırılması.....	16
<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>18</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>25</b>
<b>7.KAYNAKLAR.....</b>	<b>26</b>



## ÖZET

**AMAÇ:** Mantar enfeksiyonları özellikle immun yetmezliklerde ve diğer altta yatan hastalığı olanlarda giderek artmaktadır. Dünyada her yıl yüz binlerce insan yüksek mortalite ve morbiditesi nedeniyle invazif kandidozdan ciddi bir şekilde etkilenmektedir. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarında erken tanı çok önemlidir ve mortalite oranını düşürmek için kısa sürede ve güvenilir sonuç veren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, *Candida* türlerinin daha hızlı tanımlanabilmesi için lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS (LF-MS) yönteminin uygunluğu araştırılmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Bu çalışmada, Haziran 2017-Kasım 2018 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen pozitif kan kültürlerinden izole edilen 100 *Candida* suşu, Dalmau plak, MALDI TOF yöntemi ve LF- MS yöntemi ile çalışılmıştır. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS tanımlama sonuçları, klasik MALDI TOF MS yönteminden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve istatistikler, SPSS v. 25.0 kullanılarak, Cohen'in Kappa katsayısı analizi ile gerçekleştirilmiştir.

**BULGULAR:** Çalışmamızda incelediğimiz 100 adet *Candida* türü konvansiyonel ve MALDI TOF tanımlama yöntemlerine göre; 37 *C. albicans*, 23 *C. parapsilosis*, 17 *C. tropicalis*, dokuz *C. glabrata*, altı *C. kefyr*, üç *C. guilliermondii*, üç *C. dubliniensis*, iki *C. krusei* olarak tanımlanmıştır. Lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF MS yönteminde ise tanımlama sonuçları; 26 *C. albicans*, dokuz *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, dokuz *C. glabrata*, iki *C. kefyr*, üç *C. dubliniensis*, iki *C. krusei* olarak belirlenmiştir. MALDI-TOF yöntemi ve Dalmau plak ile LF- MS yöntemi 64 kökünde uyumlu bulunmuştur. Tanımlanamamanın yanlış tanımlama nedeniyle değil, spektrum yetersizliği nedeniyle olduğu gözlemlenmiştir.

**SONUÇ:** "Spektrum yetersizliği" olarak tanımlama dışı kalan suşlar, aslında veri tabanında yer alan türlerden oluşmaktadır. Altmış dört *Candida* türünün standart yöntemlerle %100 uyumlu olacak şekilde tanımlama yaptığı ve bu yöntemin subkültür gerektiren MALDI-TOF MS yöntemine göre en az 48 saat, Dalmau plak yöntemine göre de en az 72 saat avantaj sağladığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Matrix-yardımlı Laser Desorpsiyon-Ionizasyon Kütle Spektrometrisi; Filtrasyon; *Candida* spp; Kandidemi

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** Fungal infections are gradually increasing especially in immunodeficiencies and other underlying diseases. Every year, hundreds of thousands of people are seriously affected by invasive candidiasis due to high mortality and morbidity. For this reason, early diagnosis is very important in fungal infections and there is a need for in a short span of time and reliable methods in order to decrease the mortality rate. In this study, the appropriateness of MALDI TOF MS (LC-MS) method after lysis filtration was investigated in order to identify *Candida* species more quickly.

**MATERIALS AND METHODS:** In this study, 100 *Candida* strains isolated from positive blood cultures sent to Ege University Faculty of Medicine Microbiology Laboratory between June 2017 and November 2018 were studied by Dalmau plaque, MALDI TOF method and LF-MS method. The MALDI TOF MS identification results after lysis filtration were compared with the results obtained from the classical MALDI TOF MS method and the statistics were analyzed with SPSS v.25,0 Cohen's Kappa.

**RESULTS:** In our study, 100 *Candida* species were examined according to conventional and MALDI TOF methods; 37 *C. albicans*, 23 *C. parapsilosis*, 17 *C. tropicalis*, 9 *C. glabrata*, 6 *C. kefyr*, 3 *C. guilliermondii*, 3 *C. dubliniensis*, 2 *C. krusei*. LF-MS method in the identification results; 26 *C. albicans*, 9 *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, 9 *C. glabrata*, 2 *C. kefyr*, 3 *C. dubliniensis*, 2 *C. krusei*. MALDI-TOF method, Dalmau plate and LF-MS method were found to be compatible with 64 origins. It was observed that incompatibility was due to lack of spectrum instead of misidentification.

**CONCLUSION:** The offences which are not defined as "spectrum deficiency" are in fact the species in the database. Sixty-four *Candida* species were identified to be 100% compatible with standard methods and this method was found to be advantageous for at least 48 hours according to the MALDI-TOF MS method requiring subculture and at least 72 hours according to Dalmau plaque method.

**Key words:** Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry; Filtration; *Candida* spp; Candidemia

## TABLÖLAR LİSTESİ

- Tablo 1.** Dalmau, MALDI-TOF MS ve LF-MS ile tanımlanan Candida türleri..... 16
- Tablo 2.** LF- MS sonuçlarının Previ Color Gram boyama sonuçlarıyla karşılaştırılması..... 16
- Tablo 3.** Dalmau ve MALDI-TOF MS ile LF-MS yöntemi arasında belirlenmiş türlerin Cohen'in kappa değeri ve uyum ölçümleri ..... 17
- Tablo 4.** Spektrum yetersizliği olan izolatların değerlendirme dışı bırakılmasıyla Dalmau plak ve LF - MS arasındaki uyum..... 17





## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Gram boyama yapılan preparatların değerlendirilmesi.....	11
Şekil 2. LF-MS yöntemi numune hazırlama aşamaları .....	14



## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AIDS</b>	:Acquired immune deficiency syndrome
<b>SCOPE</b>	:Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance
<b>KDE</b>	:Kan dolaşımı enfeksiyonları
<b>YBÜ</b>	:Yoğun bakım ünitesi
<b>ABD</b>	:Amerika Birleşik Devletleri
<b>ELİSA</b>	:Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ITS</b>	:İnternal transcribed spacer
<b>MALDI TOF</b>	:Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Tme of Flight
<b>MS</b>	:Kütle spektrofotometrisi
<b>LF-MS</b>	:Lizis filtrasyon sonrası MALDITOF
<b>LF</b>	:Lizis filtrasyon
<b>SDA</b>	:Sabouraud-dekstroz-agar
<b>GİS</b>	:Gastrointestinal sistem
<b>SVK</b>	:Santral venöz kateter

## 1. GİRİŞ

Mantarlar, bağışıklığı normal kişilerde yüzeysel enfeksiyonlar oluştururken, kanser, AIDS, radyoterapi, kortikosteroid, kemoterapi, bağışıklığı baskılayıcı ve immünomodulator ilaç kullanımı gibi nedenlerle bağışık sistemi baskılanmış hastalarda da yaşamı tehdit eden, morbidite ve mortalitesi yüksek ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (1). Fungemi, özellikle de kandidemi bağışık baskılı hastalarda en sık görülen mantar enfeksiyonudur. Etken *Candida* cinsi maya mantarlarıdır. 2004 yılında yapılan “Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance (SCOPE)” çalışmasında *Candida* türlerinin nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE) arasında dördüncü sırada olduğu, yoğun bakım (YB) hastaları arasında ise üçüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir (2,3). Türkiye’de ise *Candida* türlerinin YB ünitesinde görülen dördüncü en sık etken olduğu, KDE’lerde ise sıralamanın 3-7 arasında olduğu bildirilmiştir (4).

Bilinen 200’den fazla *Candida* türü vardır. En sık hastalık etkeni *Candida albicans* olmakla birlikte son yıllarda başta azoller olmak üzere, antifungal ilaçlara dirençli olabilen non-albicans *Candida* türlerinin sıklığı da artmaktadır (5). Tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen hala kandidemiye bağlı mortalite yüksek olup, antifungal tedaviye başlamadaki gecikmeler mortalite oranını artırmaktadır (6). Yapılan araştırmalarda kandidemili hastalarda tanıdaki gecikmelerin mortalite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (7).

Kandidemilerin tanısında altın standart yöntem kan kültürüdür. Kültür sonucunda üreyen etkenin tür düzeyinde tanımlanması, olası direncin öngörülmesine ve uygun tedavinin planlanmasına olanak vermektedir. Ancak kan kültüründe mantarların üremesi zaman alıcı olup en erken 2-4 gün arasında değişmekte, üreyen etkenin tür düzeyinde tanımlanması da mevcut yöntemlerle 48-72 saatte gerçekleşebilmektedir.

Bu araştırmada, kan kültüründe üreyen *Candida*’ların erken dönemde LF-MS ile tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır. Bakteriler için literatürde çok sayıda araştırma olmasına karşın, mantarlarla ilgili yapılan çalışma sayısı azdır. Bu yöntemin geçerli bulunması durumunda kandidemili hastalarda uygun antifungal tedaviye 48-72 saat erken başlanabilecek, mortalite ve morbiditenin azaltılması mümkün olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Candida* türleri, Deuteromycota'da *Blastomycetes* sınıfının Cryptococcales takımında Cryptococcaceae ailesinde sınıflandırılan, 4-6 µm boyutlarında, ince duvarlı, tomurcuklanarak üreyen morfolojik olarak oval veya yuvarlağımsı, blastosporlarla çoğalan, psödohif oluşturan, maya formunda mantarlardır. Bilinen 200'den fazla tür vardır. İnsanda sıklıkla hastalık oluşturan türler *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* ve *C. dubliniensis* olarak bildirilmiştir (8,9).

### 2.1. *Candida* Enfeksiyonları ve epidemiyoloji

*Candida* türleri, gastrointestinal, ürogenital ve deride olmak üzere normal insan florasında bulunur ve enfeksiyonların çoğu endojen kaynaklıdır (10). Ayrıca ekzojen olarak ta kişiden kişiye, doğum sırasında anneden yenidoğana, cinsel yol ile partnere ve el taşıyıcılığı ile sağlık personelinden yatan hastalara geçtiği bildirilmiştir (11).

*Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlara kandidoz adı verilir. Kandidozlar yüzeysel ve sistemik (derin iç organ kandidozları) olabilir. Yüzeysel kandidozlar deri ve mukozanın enfeksiyonları olup daha çok bağışıklığı normal kişilerde görülür. Sistemik enfeksiyonlar sıklıkla hastanede yatan, bağışıklığı baskılanmış hastalarda ortaya çıkar. Yatıklığı olan hastalarda sıklıkla invazif enfeksiyonlar gelişir; kana, ardından karaciğer, dalak, böbrek, kalp ve beyne yayılabilir. Hatta bazı hastalarda deri tutulumu da görülebilir Hematolojik maligniteler, kemik iliği ve solid organ nakilleri, nötropeni, kronik granülomatöz hastalıklar, bağ dokusu hastalıkları, büyük gastrointestinal sistem cerrahileri, katater varlığı, antibiyotik, kortikosteroid ve immünsüpresif ilaç tedavisi sistemik kandidozlar için en önemli risk faktörleridir (12).

İnvazif *Candida* enfeksiyonları, invazif mantar enfeksiyonlarının %70-90'ını oluşturmaktadır. Yoğun Bakım Üniteleri'nde ise invazif mantar enfeksiyonlarının en sık nedenidir. Son 30 yılda hastanede, özellikle YBÜ'lerinde yatan hastalarda mantar kolonizasyon ve enfeksiyon insidansı hızla artış göstermektedir. ABD'de 1979-2000 yılları arasında, mantarlarla ilişkili sepsis olgularının %207 oranında artış gösterdiği ve *Candida* türlerinin en sık izole edilen etkenler arasında olduğu bildirilmiştir (13). Yine ABD'de hastanede yatan hastalardan izole edilen KDE'lerde *Candida* türleri dördüncü sırada yer almaktadır (2). *Candida* enfeksiyonları özellikle YBÜ'de yatan hastalarda %40-75 arasında değişen oranlarla önemli bir ölüm nedeni olup, kemik iliği yapılan hastalarda, invazif kandidozlardaki ölüm oranının, invazif aspergilloza göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (14,15).

Sistemik kandidozlarda en sık etken *C. albicans*'tır. Ancak son 20 yılda *albicans* dışı *Candida* (ADC) türlerinin görülme sıklığı artmıştır. *Candida* türlerindeki epidemiyolojik farklılıklar ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye, hatta merkezden merkeze değişmektedir. Hastanelerdeki hasta profili, profilakside kullanılan antifungal ilaçlar da *Candida* türlerinin görülme sıklığına ve epidemiyolojisine etki edebilmektedir. *Albicans* dışı *Candida* türlerinin belirli pH derecelerini tercih etmeleri nedeniyle orofarinks ve vajina gibi yüzeysel bölgelerde daha sık enfeksiyon etkeni oluşturdukları ileri sürülmektedir. *Candida glabrata*'nın nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan önemli bir patojen olarak, özellikle diyabetik hastalardaki üriner sistem enfeksiyonlarında sık görüldüğü, enfeksiyonların kateter kullanımı ve profilaktik olarak azol kullanımına sekonder olarak gelişebileceği belirtilmektedir. Yine kinolon kullanımının da *C. glabrata*'nın neden olduğu kandidüriyle ilişkili olduğu değerlendirilmiştir (16). *Candida tropicalis*'e bağlı enfeksiyonların özellikle hematolojik maligniteli ve nötropenik hastalarda sık olduğu, bu hastaların *C. tropicalis*'e bağlı enfeksiyonlara daha yatkın olduğu; bu türün, *C. albicans* ile karşılaştırıldığında daha yüksek mortalite ile seyreden disemine enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir. *Candida parapsilosis*'in özellikle endoftalmit, endokardit, septik artrit, peritonit ve kandidemide etken olduğu, bu durumun da genellikle invazif girişimler ve prostetik aletler ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. *Candida parapsilosis*'in, yüksek konsantrasyonda glukoz içeren çözeltilerden ve protezlerden kaynaklanabileceği, ayrıca kateter uçlarında biyofilm oluşturma özelliği nedeniyle parenteral beslenen hastalarda izolasyon oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (2,11,17). *C. dubliniensis*'in HIV pozitif hastalarının vajina, idrar, deri ve gastrointestinal sisteminden izole edildiği ve nadiren kolonize olduğu hastalarda kandidemiye neden olduğu ileri sürülmektedir (18).

## 2.2. Kandidemi

Kandidemi, kan dolaşımında *Candida* türlerinin neden olduğu sistemik bir enfeksiyon olup kan kültüründe *Candida* üremesi ile tanınır. Kandidemi, organ tutulumlarıyla giden invazif kandidoza yol açması ve ölümcül seyretmesi nedeniyle önemlidir. Fransa'da kandidemi ile ilişkili ölüm oranının %40, ABD'de ise %25-38 olduğu tahmin edilmektedir (14,15). Tanıdaki her bir saatlik gecikmenin mortaliteyi %1,6 oranında artırdığı antifungal tedavi uygulanmayan ya da geç başlanan hastalarda, tedavi alanlara nazaran ölüm oranının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, hastanede yatış sürelerinin uzaması ve bakım maliyetlerinin artması nedeniyle, tıbbi ve ekonomik yönden ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak da görülmektedir (7,15).

Kandidemilerde halen *C. albicans* en sık etken olmakla birlikte, son 20 yılda ADC türlerinin görülme sıklığı artmıştır (12). Amerika Birleşik Devletleri tıp merkezlerinde 2019

hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, ADC türlerinin baskın olduğu bildirilmiştir. Epidemiyolojideki bu değişiklik; şiddetli immünoşüpresyon, prematürite, geniş spektrumlu antibiyotikler ve yaşlı hastalara maruziyet gibi faktörlere bağlanmaktadır. Avrupa ülkelerinde yapılan bir çalışmada ise kandidemili hastaların yarısından fazlasında *C. albicans*'ın etken olduğu bunu ADC türlerinden *C. glabrata* (%14), *C.parapsilosis* (%14), *C tropicalis* (%7) ve *C. krusei* (%2)'nin izlediği bildirilmiştir. Latin Amerika ülkelerinde de epidemiyolojide değişiklikler gözlenmiş, özellikle Şili'de *C. albicans* prevalansının değiştiği, ADC'ler arasında en sık *C.parapsilosis* gözlendiği, bunu *C. tropicalis* ve *C. glabrata*'nın izlediği belirtilmiştir. Brezilyada yapılan bir çalışmada da kandidemili hastaların %40.9'unda *C. albicans*'ın izole edildiği, takip eden türlerin *C. tropicalis* (% 20.9), *C parapsilosis* (% 20.5) ve *C. glabrata* (% 4.9) olduğu ileri sürülmüştür (18). Avrupa'da ve Türkiye'de *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis*, *C.albicans*'tan sonra sık rastlanılan *Candida* türleridir. Türkiye'de nozokomiyal kandidemi etkenlerinin değerlendirildiği çalışmalarda en sık etkenin *C. albicans* (%40-60) olduğu gözlenmiş, ADC türleri ise sırasıyla *C.parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* olarak belirtilmiştir (2,19).

Kateter ve implantlarda biyofilm oluşturma özelliği olan *Candida parapsilosis*'in özellikle bebek ve yeni doğan enfeksiyonlarında, deri ve mukozadan kaynaklanan nozokomiyal kandidemilerde sık görüldüğü belirtilmektedir. Bu nedenle *C.parapsilosis*'in kandidemi etkeni olarak sık görülmesinin, enfeksiyon kontrol önlemlerinin yetersizliğinin bir göstergesi olduğu kabul edilmektedir (20).

*Candida tropicalis*'in flukonazol profilaksisi almamış, daha çok nötropenisi ve mukoziti olan hastalarda görüldüğü ileri sürülmektedir. Bazı araştırmalarda *C. tropicalis* ile kolonize nötropenik hastalarda invazif kandidoz gelişme oranının %60-80 olduğu belirtilmektedir. Özellikle flukonazol profilaksisi uygulanan, hematolojik maligniteli, kemik iliği ve kan alıcılarında *Candida krusei*'ye; piperasilin/tazobaktam ve vankomisin tedavisi alan hastalarda *C. glabrata* ve *C. krusei*'ye bağlı kandidemilerin daha sık olduğu ileri sürülmektedir (20).

*Albicans* dışı *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların artışı ve antifungal ilaçlara direncin ortaya çıkması, kandidozların tedavinde önem taşımaktadır (21). *Albicans* dışı *Candida* türleri arasında *C. tropicalis* ve *C.parapsilosis*'in, genellikle azollere duyarlı ancak *C. albicans*'la karşılaştırıldığında flukonazole daha az duyarlı olduğu görülmektedir. *Candida glabrata*'nın özellikle flukonazol olmak üzere antifungal ilaçlara karşı daha dirençli olduğu bildirilmektedir. *Candida krusei*, flukonazole karşı intrensek dirençli olup bu türlerin neden olduğu enfeksiyonlar, önceki flukonazol profilaksisi ve nötropeni ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Tüm kandidemilerin % 1-2'sini oluşturan *Candida lusitaniae*'nin

azollere duyarlı ancak amfoterisin B'ye karşı daha yüksek bir dirence sahip olduğu bildirilmektedir (22).

### 2.3. Tanı

Kandidozlarda klinik belirti ve bulgularının özgül olmayışı nedeni ile tanısı zordur. Hasta gruplarının genellikle bağışık baskılı olması nedeni ile enfeksiyon etkenini saptamaya yönelik klinik örneklerin alınması her zaman mümkün olmamaktadır. Tanı genellikle klinik, radyolojik ve mikrobiyolojik olarak birlikte değerlendirilmektedir. Ancak kesin tanı etkenin mikrobiyolojik olarak gösterilmesi ile konmaktadır.

### 2.4. Tanı Yöntemleri

İnvazif kandida enfeksiyonlarının tanısında direkt mikroskopi ve kültür altın standart yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin duyarlılığı istenilen düzeylerde olmadığı ve izlenen hasta gruplarında her zaman kültür için uygun örnek alınmadığı için serolojik [antijenik yapılar (mannan,  $\beta$ -D-glukan vb), antikolar (anti-mannan, germ tüp antikor testi vb) ve kandida metabolitleri (D-arabinitol, enolaz vb)] ve moleküler yöntemler (hibridizasyon ve amplifikasyon temelli yöntemler) de yardımcı tanı testleri olarak kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri istenilen düzeyde olmayıp, prospektif ve hasta gruplarına özel çalışmalar yetersizdir. Moleküler testlerin kültür ve serolojik yöntemlere göre duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar olsa da; standardizasyon yetersizliği, metodolojik farklılıklar, maliyet ve özel laboratuvar koşulları gerektirmesi nedeni ile klinik kullanımda henüz istenilen düzeylere ulaşmamıştır (23,24).

Günümüzde kandidemilerin tanısında altın standart hala kan kültürü olup en duyarlı olanı lizis santrifügasyon yöntemidir. Bu yöntem, zahmetli ve kontaminasyon gelişmesine açıktır. Yeni geliştirilen otomatize kan kültürü sistemlerinin (BACTEC ve Bact/ALERT) de kandan izolasyon şansını artırdığı ve duyarlılığının da lizis santrifügasyon yöntemine yakın olduğu bildirilmektedir (25-27). Otomatize kan kültür sistemlerinde inkübasyon zamanı üretici firmanın önerileri doğrultusunda belirlenmelidir. Genel olarak standart kan kültür şişeleri için beş gün, fungal kan kültür şişeleri için ise üç dört haftalık inkübasyon önerilmektedir. Otomatize kan kültür sistemlerinin etkinlikleri birbirine yakın olup *C. glabrata* izolasyonunda BactAlert sisteminin Bactec sistemine göre daha iyi olduğu, Bactec sistemini kullanan merkezlerin kandidemi şüphesinde fungal kan kültür şişelerini kullanmalarının *C. glabrata* izolasyonu açısından yararlı olacağı ileri sürülmüştür (28)

Kandan mantar izolasyonunun başarısı, alınan kanın miktarına, örnek sayısına ve kullanılan yöntemlere bağlı olarak değişebilmektedir (26). Kanda mantar üremesinden sonra

izolasyon için en sık kullanılan besiyeri Sabouraud dekstroz agar (SDA) ve %5 koyun kanlı agar besiyeridir (29). İzolasyonun sağlıklı olması için besiyerlerine kloromfenikol, gentamisin, penisilin, streptomisin ve siprofloksasin eklenebilir, böylece bakterilerin üremesi engellenmiş olur (29,30). Sikloheksimid, gibi maddeler bazı *Candida* türlerinin de üremesini inhibe ettiği için besiyerinde yer almamalıdır (25). Kan kültüründe üreme sinyalinin ardından Gram boyama ile yapılan preparatın mikroskopik incelemesinde maya hücrelerinin varlığı değerlendirilir. Etkenin tür düzeyinde olabildiğince erken tanımlanması en az kültürde üretilmesi kadar önemlidir. Kültür sonucunda üreyen etkenin tür düzeyinde tanımlanması, olası direncin öngörülmesine ve tedavinin erken dönemde planlanmasına olanak vermektedir. Kültürde üreyen *Candida* kolonilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler (germ tüp oluşturma, Dalmou plak yöntemi), otomatize ticari yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (31,32).

#### **2.4.1. Germ tüp testi**

Geleneksel olarak, *C. albicans*'ın ilk identifikasyonu kan kültür şişelerinden pasajlanmış katı besiyerinde üreyen kolonilerden yapılan çimlenme borusu (germ tüp) testi ile gerçekleştirilmekte ancak bu testte yeterli miktarda koloni oluşması için 24-72 saate ihtiyaç duyulmaktadır. *Candida albicans* insan veya hayvan serumunda 37<sup>0</sup>C de 2-3 saat inkübe edildiklerinde germ tüp oluşturabilmektedir. Germ tüp, maya hücrelerinden direkt oluşmakta ve kısa hif başlangıcında daralma olmayan uzantı şeklinde yapılar olarak gözlenmektedir. Başta *C. tropicalis* olmak üzere bazı *Candida* (*C. dubliniensis* ve *C. stellatoidea*) türleri de 3 saatlik süreden sonra germ tüp oluşturabilmektedir. Ancak maya hücresinin başlangıç noktasında boğumlanma olmaktadır (30,31).

#### **2.4.2. Dalmou Plak Yöntemi**

*Candida* türlerinin mikromorfolojik olarak tür düzeyinde tanımlanmasında "Dalmou plak" yöntemi kullanılır. Bu yöntem için iğne öze yardımı ile alınan maya kolonisi, agar zarar görmeyecek şekilde uzunlamasına çizgi şeklinde mısır unu/tween-80 agar besiyeri üzerine paralel şekilde çizilir Bu yöntemde agarın ortasına bir çizgi çekilir ve kolonilerin seyreltilmesi için ilk çizgiye 3-4 tane paralel çizgi çekilmektedir. Bu teknikle seyreltme sağlanmakta ve çizgi ekimlerin üzerine, tamamen kapatacak şekilde steril bir lamel yerleştirilmektedir. Ekim plakları 30°C' de 48-72 saat inkübe edilir. Bu sürenin sonunda, petri kapakları açılarak lamel altında kalan alan, X10 ve X40 büyütmede mikroskopik olarak incelenerek, maya türleri mikromorfolojik özelliklerine göre tür düzeyinde tanımlanır (9).



### 2.4.3. Biyokimyasal testler

Karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri tam ya da yarı otomatize olarak *Candida*'ların tür tanımlamasında kullanılır. Mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanması asimilasyon olarak adlandırılmaktadır. Fermentasyon ise, karbonhidratları anaerobik olarak kullanan maya hücrelerinin CO<sub>2</sub> ve etanol oluşturmaya dayanan testlerdir (33). Karbonhidratların fermentasyonu sonucu meydana gelen asit, besiyerine eklenen fenol kırmızısı gibi pH indikatörleri yardımıyla renk değişikliği oluşturur. Bu renk değişikliği ile mayaların farklı karbonhidratlara verdikleri farklı tepkimelere göre tür tanımlaması yapılır. Karbonhidrat fermentasyon testi; mayanın karbondioksit ve alkol oluşturmaya göre ölçüm yapılan bir test ve gaz oluşumu da fermentasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (31,34,35). *Candida* türlerinin ayırt edilmesinde karbonhidrat fermentasyon testi, karbonhidrat asimilasyon testine göre daha az duyarlıdır (34).

Nitrat asimilasyon testi, mayaların nitrojen kaynağı olarak nitratı kullanma yeteneklerini ortaya koyan bir testtir. Bazı *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılan bu yöntem, özellikle *Cryptococcus* ve *Pichia* türlerinin tanımlanmasında kullanılır (31,36).

### 2.4.5. Kromojenik Besiyerleri

Farklı *Candida* türlerinin ürettiği ekzoenzimlerle reaksiyona giren türe özgü kromojenik substratlar kromojenik besiyerlerinde bulunmaktadır. Reaksiyon sonucu parçalanmış substratlardan çeşitli kromojenik ürünlerin ortaya çıkmasıyla kolonilerin renkleri ve morfolojileri değerlendirilmektedir. Günümüzde CHROMagar *Candida* (CHROMagar, France), *Candida* ID (bioMérieux), CandiSelect (Bio-Rad), Hi Chrome (HiMedia Laboratories) gibi çok sayıda kromojenik besiyeri bulunmaktadır (32). Primer izolasyon besiyeri olarak kullanılabilen kromojenik besiyerleri özellikle kandan olmak üzere klinik örneklerde, birden fazla türün etken olduğu mikst enfeksiyonların saptanması ve identifikasyon problemlerinin çözümünde kullanılmaktadır (34). Bu besiyerleri, sınırlı sayıda ancak sık rastlanılan (*C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) *Candida* türlerinin erken dönemde tanımlanmasında önem sağlamaktadır (37,38).

### 2.4.6. Maldi TOF MS

Matriks aracılı lazer desorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS); klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, mikroorganizmaların tek bir koloni ile hızlı, güvenilir tanımlamasını yapan yeni bir yöntemdir. MALDI-TOF MS sadece

mantarlar için değil bakteri, mikobakteri ve virüslerin tanımlanmasında da kullanılmaktadır (34,39). Bu yöntemde mikroorganizmalara ait moleküllerin (protein, peptid, şeker, polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmakta ve sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmektedir (26). Günümüzde, dört farklı MALDI TOF MS sistemi kullanılmaktadır. Bunlar Bruker Biotyper (Bruker-Daltonik, ABD), Axima/Saramis (Shimadzu, Japonya), VITEK MS (bioMérieux, Fransa) ve Andromas (Andromas SAS, Fransa) sistemleridir. MALDI TOF MS sisteminde, tanımlanmak istenen mikroorganizma kolonileri kimyasal bir matriksle bir araya getirilir. Kullanılabilecek matriksler, 4-hydroxy- $\alpha$ -cyanocinnamic acid (“alphacyano” veya 4-HCCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid)’tir.

Mantarların yüksek kaliteli MALDI-TOF kütle spektrumlarını elde etmek için, hücrelerin % 70 formik asit içinde parçalanması veya mekanik bozulmaya tabi tutulması gerekmektedir, % 70 formik asit ekstraksiyonun kullanılması, matriks solüsyonu uygulamasından önce gerçekleştirilir (40). Etanol ya da formik asit kullanılan yöntemlerin ekstraksiyon etkinliği ve spektrum kalitesi yüksektir (41). Tanımlanmak istenen mikroorganizma kolonisi veya ekstraktı ‘target slayt’ adı verilen metal slayta yayılır sonra üzerine matriks solüsyonu eklenir. Örnek kristalize olduktan sonra cihaza yerleştirilerek lazer atışlarına maruz bırakılır. Lazer enerjisi matriks moleküllerinin aktivasyonunu gerçekleştirir. Sonraki aşamada mikroorganizma-matriks kompleksinde mikro patlamalar meydana getirir. Ardından bu moleküller iyonlaşarak slayttan ayrılır ve serbest hale geçer. İyonize moleküllerin detektöre hareketi cihaz içindeki elektrotlar sayesinde gerçekleşir. Elektrotlar sayesinde 20 kV civarında elektrik potansiyeli üretilir ve iyonize moleküller detektöre doğru hızlandırılmaktadır. Spektrofotometredeki vakum, iyonlarla hava moleküllerinin çarpışmasını engellemektedir. Bu nedenle iyonların hızı, sadece *kütle/yük* ( $m/z$ ) oranıyla gösterilen kütle ve molekülün yüküne bağlı olarak gösterilir. Bu sistemin uygulanmasında hemen her zaman moleküller benzer şekilde yüklendikleri için uçuş süresi temelde kütleyle bağlıdır ve iyonlar kütlelerine göre detektöre çarpar. Bu sebeple küçük kütleyle sahip iyonlar detektöre önce ulaşır. Bir MALDI-TOF MS spektrumunda x eksenini proteinlerin  $m/z$  oranını, y eksenini de bu proteinlerin yoğunluğunu göstermektedir. Mikroorganizmaya ait proteinlerin, çarpma zamanına göre kütle spektrumu oluşturulur ve kaydedilir. Sonuçta MALDI-TOF MS ile tanımlama yapan sistemlerde, yeni kaydedilen spektrum, mevcut veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılır ve sonucun güvenilirliği yüzde değeri ile belirtilir (42). Güvenirlik düzeyi yüzde yetmiş (%70) ve üstü tanımlama başarılı kabul edilir (43).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, 17 TIP 031 numaralı Ege Üniversitesi Rektörlük Projesi kapsamında gerçekleştirildi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 29/06/2017-25/11/2018 tarihleri arasında kan kültüründe üreme sinyali veren kan kültür şişelerinden yapılan Gram boyalı preparatlarda maya hücresi görülen, randomize 100 örnek çalışmaya alındı. Bu şişelerden tür tanımlaması için, rutin uygulamada yapılan Dalmau plak ve MALDI-TOF MS yöntemine paralel olarak LF-MS yöntemi uygulandı. *Candida albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* 10231 kökenleri, rutin uygulamada tanı için kullanılan yöntemler ile çalışıldı.

#### 3.1. Gereçler ve Kimyasallar

- BacT/Alert 3D otomatik kan kültürü cihazı (bioMérieux, Fransa)
- Previ Color Gram boyama cihazı (bioMérieux, Fransa)
- Vitek MS MALDI TOF MS cihazı (bioMérieux, Fransa)
- Vitek MS MALDI TOF MS plate (bioMérieux, Fransa)
- Vitek MS MALDI TOF MS CHCA matrix (bioMérieux, Fransa)
- %5 Koyun kanlı agar (bioMérieux, Fransa)
- Eozin Metilen Blue Agar (bioMérieux, Fransa)
- Sabouraud-dekstroz-agar (SDA)
- Mısır unu-%1 tween 80 agar
- Brij O10 [Polioksietilen (10) oleil eter] (Amresco, ABD, Kat. No: 1B1335)
- Sodyum klorid (NaCl) (Amresco, ABD, Kat. No:0241)
- 3-[Sikloheksilamino]-1-Propan-Sulfonik Asit (CAPS) (Amresco, ABD, Kat. No: 0365)
- Sodyum fosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich, ABD, Kat. No: 71636)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich, ABD, Kat. No: S5881)
- Hidroklorik asit (HCl) (Sigma-Aldrich, ABD, Kat. No: H1758)
- Polyester başlıklı eküvyon (Cleanmo Corp, Çin, Kat. No: CM-PS743) (Texwipe TX743 muadili)
- Millipore Express PLUS Membran Filtre, polietersulfon, 0.45 µm, 25 mm (HPWP02500) Merck-Millipore, ABD.
- Vakum Filtrasyon Cihazı

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Kan kültürü sistemi**

Araştırmada incelenen hastalardan elde edilen kan kültürü örnekleri BacT-Alert 3D (bioMérieux, Fransa) tam otomatik kan kültürü sisteminde inkübe edilmiştir. Mikrobiyal saptama sistemi BacT/Alert 3D, örneklerdeki üremeyi sürekli izleyen, inkübe eden ve çalkalayan kolorimetrik sistem olarak bilinen bir cihazdır. Takip edilen örnekler cihaza yerleştirildikten sonra, pozitif veya negatif olarak saptanana kadar periyodik olarak izlenmektedir. Karbondioksit sensörlerine sahip BacT/Alert FA-FN Plus (bioMérieux, Fransa) kan kültürü şişeleri, katı-faz reflektometrelerle sürekli izlenmektedir. BacT/Alert bilgi işlem sistemi sensör okumalarını denetler ve hangi örneklerin negatif, hangilerinin pozitif olduğuna veri tabanındaki bilgilere göre karar vermektedir. İncelenen örneklerde üremenin saptanması halinde, cihaz tarafından sesli ve görüntülü olarak alarm verilmektedir. Bir örnek beş günlük süre içerisinde cihaz tarafından herhangi bir sesli ve görüntülü alarm verilmezse üreme belirtisinin olmadığı kabul edilir ve negatif olarak değerlendirilir.

### **3.2.2. Pozitif kan kültürünün işlenmesi**

Kan kültürü şişelerinde pozitif olarak saptanan örneklerden enjektör yardımıyla 3 cc'lik örnekler alınmıştır. Bu örneklerin, 1 cc %5 koyun kanlı agar besiyerine (bioMérieux, Fransa) ve 1 cc'de EMB agar besiyerine (bioMérieux, Fransa) subkültürleri yapıldı. 24 saat 35<sup>0</sup>C'de enkübe edildi. Diğer 1 cc de Gram boyama için lama yayılarak, preparat hazırlandı. Gram boyamada maya hücresi görülen şişelerden ek olarak SDA besiyerine de subkültür için 1 cc aktarıldı. Maya hücresi görülmemiş ise SDA'ya ek pasaj yapılmadı.

Gram boyalı preparatta maya hücresi görülmediği halde 24 saatlik enkübasyon sonrasında kanlı agar ve EMB agar besiyerinde maya üremesi olduysa üreyen kolonilerden SDA besiyerine pasaj yapıldı.

#### **3.2.2.1 Gram boyama**

Üreme sinyali veren şişelerden Gram boyama için preparat hazırlandı, Previ-Color (bioMérieux, Fransa) Gram boyama cihazı ile Gram boyama yapıldı ve X100 büyütme ile ışık mikroskopunda değerlendirildi. Gram boyalı direkt mikroskopik bakıda maya hücrelerinin varlığının tür tanımlamasına katkı sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek amacıyla Şekil 1'de tanımlandığı gibi kalitatif değerlendirme yapıldı.

- 0: Maya hücresi görülmedi
- 1+: Tüm alanlarda 5' den az maya hücresi
- 2+: 2-3 alanda 1-5 maya hücresi
- 3+: Her alanda 5' den az maya hücresi
- 4+: Her alanda 5' den fazla maya hücresi

**Şekil 1.** Gram boyama yapılan preparatların değerlendirilmesi

### 3.2.2.2.Dalmau plak yöntemi

Sabouraud dekstroz agar besiyerinde üreyen maya kolonisi, iğne öze yardımı ile alındı. Mısır unu/tween-80 agar besiyeri üzerine uzunlamasına 4 paralel çizgi çizildi. Ekim çizgilerinin üzerine steril bir lamel yerleştirildi. Ekim plakları 30°C' de 48-72 saat inkübe edildikten sonra ışık mikroskopunda X10-X40 büyütmede, iki farklı araştırmacı tarafından ayrı ayrı değerlendirildi ve mikromorfolojik özelliklerine göre mayaların tür tanımlaması yapıldı.

*Candida albicans* ve *C. dubliniensis* türlerinin benzerliği nedeni ile bu morfolojide gözlenen türlerin hepsine ısı deneyi yapılmıştır. 35 ve 45<sup>0</sup>C'de üreyenler *C. albicans*, 35<sup>0</sup>C'de üreyip, 45<sup>0</sup>C'de üremeyenler de *C. dubliniensis* olarak tanımlanmıştır.

### 3.2.2.3.MALDI-TOF MS yöntemi

MALDI-TOF MS yönteminde [VITEK MS (Vitek MS server v.3.2 yazılımı)] tüm izolatların SDA besiyerindeki 24 saatlik taze pasajları kullanıldı. MALDI-TOF MS yöntemi için önceden hazırlanan koloniler örnek tablasına çok az miktarda aktarıldı ve üzerine CHCA matrix damlatılarak fiksasyonu ve kristalizasyonu sağlandı.

Rutin laboratuvar iş akışında mayaların tanımlaması yapılan ve antibiyotik absorban içermeyen kan kültürü şişeleri (BacT/Alert FA-FN Plus, Biomerieux, Fransa) bu çalışmada LF-MS yöntemi için hemen kullanılmayacak ise +4°C'de (en fazla 24 saat olmak koşuluyla) saklandı.

MALDI-TOF MS sonuçları Vitek-MS v.3.2 veri tabanında %99.0 güvenilirlikte otomatik olarak hesaplandı. Tanımlanamayan suşlar (güvenilirlik: <%60) tekrarlandı (44). Üst üste 2 kez aynı sonuç elde edildikten sonra rapor edildi.

### 3.2.3.Lizis Filtrasyon sonrası MALDI TOF MS yöntemi

**3.2.3.1.Lizis filtrasyon için 1 litre lizis solüsyonu hazırlanması: “%0,6 Brij 97+ 0,4M CAPS, pH: 11,7”**

### ***Gereçler***

- 60 mL %10'luk Brij 97 [Polioksietilen ( 10) oleil eter] Stok solüsyonu\*
- 88,5 gram [3- (sikloheksilamino ) -1- propansülfonik asit (CAPS)]
- 2 litre distile su
- 5N NaOH (yaklaşık 60 mL yeterli) (20,25 gram NaOH 100 mL'de çözülür)
- 1N NaOH (çok az miktar yeterli) (4 gram NaOH 100 mL'de çözülür)
- 0,2 µm por çaplı polietersülfon filtre (MiniSart® enjektör filtre)

### ***\*%10'luk Stok solüsyon hazırlanması (200mL)***

Brij 97 şişesi +4 C °den çıkartılıp 36 C° inkübatörde 30 dakika bekletildi ve 200 ml'lik cam kap içerisine 20 gram Brij 97 tartıldı. Kaba 160 ml distile su eklenip, manyetik karıştırıcıda orta hızda üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak iki saat karışmaya bırakıldı. İki saat sonunda distile su 200 ml'ye tamamlanarak, tekrar manyetik karıştırıcı ile yavaş devirde dönmeye bırakılır ve bu solüsyon, homojenize olduktan sonra steril bir başka kap içerisine 0,2 µm por çaplı polietersülfon filtreden süzülerek +4 C° de saklandı.

### ***Lizis solüsyonunun hazırlanması***

Bir litrelik dereceli silindirik kaba 88,5 gram CAPS, 400 mL distile su ve ardından 40 ml 5N NaOH eklendi. Alüminyum folyo ile üzeri kapatılarak manyetik karıştırıcıda orta hızda tamamen çözünene dek karışmaya bırakıldı ve 100 ml daha distile su eklenerek karıştırılmaya devam edildi ve pH metre probu karışıma daldırıldı. pH düzeyi 11,7±0,01'e ulaşip stabilize olana kadar 5N NaOH eklendi, beş dakika daha proba takip edilerek karıştırılmaya devam edildi. Bu işlemten sonra, pH metre probu içinden çıkartılarak ve solüsyon iyice berrak hale gelene kadar karışmaya bırakıldı. Solüsyonun içerisine 60 ml %10'luk Brij 97 stok solüsyonu eklendi ve 10 dakika karışmaya bırakıldı. Solüsyon yeterli büyüklükteki dereceli bir cam kaba aktarıldıktan sonra, distile su ile 1 litre olana kadar tamamlandı ve 10 dakika daha karıştırıldı. pH metre ile ölçüme devam edildi ve pH 11,7±0,01 düzeyine ulaşana kadar NaOH eklenir. Elde edilen solüsyon 0,2 µm por çaplı polietersülfon filtreden süzülerek 50 cc'lik steril kaplara, üzerlerine tarih yazılarak bölüştürüldü.

### **3.2.3.2.Lizis filtrasyon için 1 litre yıkama solüsyonu hazırlanması: “20nM Sodyum fosfat + %0,05 Brij 97+ %0,45 NaCl, pH:7,2”**

### ***Gereçler***

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sodyum fosfat, dibazik, anhidroz)
- %10'luk Brij 97 Stok solüsyonu (lizis solüsyonunda kullanılan stok solüsyonu)

- %0,45 NaCl (500 mL %0,9'luk NaCl 1000 cc distile su ile tamamlanarak)
- 5N ve 1N HCl [1N HCl:8.98mL HCl 100 mL distile su ile tamamlanarak,
- dansite:1,16, ağırlık oranı:%35]
- 0,2 µm por çaplı polietersülfon filtre (MiniSart® enjektör filtre)
- 50 cc'lik steril kaplar

#### ***Yıkama solüsyonunun hazırlanması***

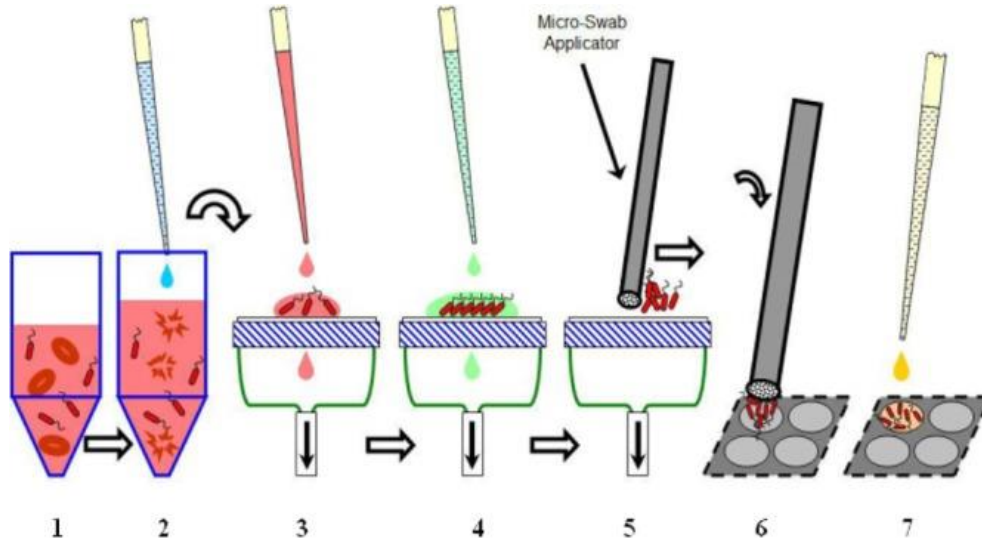
900 mL %0,45'lik NaCl içine 5 mL %10'luk stok solüsyonu, elde edilen karışıma da 2,84 gram Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> eklenerek manyetik karıştırıcıya konuldu. Karışım pH metre ile sürekli ölçülerek ve HCl eklenerek pH 7,2'ye ayarlanana kadar devam edildi. Solüsyon % 0,45'lik NaCl ile 1000 cc' ye tamamlandı. 0,2 µm por çaplı polietersülfon filtreden süzülerek 50 cc'lik steril kaplara, üzerlerine tarih yazılarak dağıtıldı.

#### **3.2.4.LF-MS yönteminin Uygulanması**

Eş zamanlı ya da 24 saat içinde, Gram boyalı preparatta maya hücreleri görülen ve/veya maya mantarı üreyen kan kültür şişelerinden, yönergelere uygun yöntemlerle hazırlanmış solüsyonlar ve kimyasallar ile lizis filtrasyon (LF) işlemi uygulandıktan sonra MALDI-TOF MS (Vitek-MS, Biömerieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapıldı.

Lizis filtrasyon işlemi sırasında pozitif kan kültürü şişesinden alınan 2 ml kan kültürü sıvısına 1 mL lizis solüsyonu (%0,6 Brij 97+ 0,4M CAPS, pH: 11,7) eklenip beş saniye vorteksledi. Elde edilen lizat iki dakika bekletildikten sonra 2 cm çapında 0.45 µm por çaplı polietersülfon filtreden 40 sn boyunca damlatılarak vakum aspirasyon cihazı yardımıyla filtre edildi. Kalan pellet 3 ml yıkama solüsyonu (20 nM Sodyum fosfat + %0,05 Brij 97+ %0,45 NaCl, pH 7,2) ile üç kez yıkandı. Filtrede kalan rezidü pellet polyester başlıklı sürüntü çubuğuyla (Cleanmo TX743) MALDI-TOF MS tanımlama tablasına aktarıldı. Hücre duvarını parçalayarak protein ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla üzerine formik asit ilave edildi. Kuruyuncaya kadar beklendi. Daha sonra çalışmada matriks çözeltisi olarak 1µL VITEK MS-CHCA (= α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) kullanıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Plak cihaz içine yerleştirilerek işlem başlatıldı.

MALDI-TOF MS sonuçları Vitek-MS v.3.2 veri tabanında %99.0 güvenilirlikte otomatik olarak hesaplandı. Tanımlanamayan suşlar (güvenilirlik: <%60) tekrarlandı (44). Üst üste 2 kez aynı sonuç elde edildikten sonra rapor edildi.



**Şekil 2.** LF-MS yöntemi numune hazırlama aşamaları (45).

1= Test tüpü içinde kan kültürü; 2= Kan kültürünün Liziz tamponu ile inkübe edilmesi; 3= Filtre membranına lizat ilave edilmesi; 4= Filtre membranını yıkama tamponu ile yıkama; 5= Mikroorganizmaların filtre zarından çıkarılması; 6= Mikroorganizmaları, MALDI hedef plakasına aktarma; 7= Mikroorganizmaların üstüne matris solüsyonunun eklenmesi.

### 3.2.5. İstatiksel Analiz Yöntemi

İstatiksel analiz yöntemi olarak Cohen'nin Kappa katsayısı SPSS sürüm 25.0 programı ile hesaplandı. Cohen'in kappa katsayısı iki değerleyici arasındaki karşılaştırmalı uyuşmanın güvenilirliğini ölçen bir istatistik yöntemi olarak bilinmektedir (46). Kappa ( $\kappa$ ) -1 ile +1 arasında bir değer alabilir, elde edilen verilerin değerleri Landis ve Koch (47). tarafından önerilen şekilde, aşağıdaki gibi yorumlanmıştır.

- < 0 Şansa bağlı olabilecek uyumdan daha kötü uyum olması
- 0.01 — 0.20 Önemsiz düzeyde uyum olması
- 0.21 — 0.40 Zayıf düzeyde uyum olması
- 0.41 — 0.60 Orta düzeyde uyum olması
- 0.61 — 0.80 İyi düzeyde uyum olması
- 0.81 — 1.00 Çok iyi düzeyde uyum olması

Kültür sonrası rutinde kullanılan Dalmau plak ve MALDI-TOF MS yöntemi ile elde edilen sonuçlar, LF-MS sonuçları ile karşılaştırılarak duyarlılık hesaplandı.



## BULGULAR

Bu çalışmada, 29.06.2017-25.11.2018 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen pozitif kan kültürlerinde izole edilen ve Dalmau plak ve MALDI-TOF MS yöntemi ile tür tanımlaması yapılan 100 *Candida* kökeni LF-MS yöntemi ile de tanımlanarak, sonuçları değerlendirilmiştir. Standart uygulanan yöntemler *C. albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* 10231 ile doğrulanmıştır.

### 4.1. Dalmau Plak ve Malditof MS Yöntemi ile İdentifikasyon Sonuçları

Standart tanımlama yöntemleri (Dalmau Plak tekniği ve MALDI TOF MS) ile elde edilen sonuçlar birbiri ile %100 uyumlu olup (Cohen'in kapa değeri: 1,00), 100 *Candida* suşunun 37'si *C. albicans*, 23'ü *C. parapsilosis*, 17'si *C. tropicalis*, dokuzu *C. glabrata*, altısı *C. kefyr*, üçü *C. guilliermondii*, üçü *C. dubliniensis*, ikisi *C. krusei*, olarak tanımlanmıştır (Tablo 1). MALDI TOF MS ile elde edilen sonuçlar %99 güvenilirlikle tanımlanmıştır.

### 4.2. LF- MS ile İdentifikasyon Sonuçları

LF- MS ile 100 *Candida* türünün 64'ü %99 güvenilirlik düzeyinde tanımlanmıştır. Bunların 26'sı *C. albicans*, dokuzu *C. parapsilosis*, 13'ü *C. tropicalis*, dokuzu *C. glabrata*, ikisi *C. kefyr*, ikisi *C. krusei*, üçü *C. dubliniensis* olarak gözlenmiştir. *Candida* türlerinin 36'sı bu yöntemle "spektrum yetersizliği" nedeni ile tanımlanamamıştır. Bu şişelerden ikinci kez çalışıldığında da benzer sonuçlar alınmıştır. Standart Dalmau plak, MALDI-TOF MS ve LF-MS sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Spektrum yetersizliği ile *C. parapsilosis* (14/23; %60,8), *C. albicans* (11/37; %29,7), *C. tropicalis* (4/17; %23,5), *C. kefyr* (4/6; %66,6) ve *C. guilliermondii* (3/3; %100) kökenlerinde görülmüştür.

**Tablo 1.** Dalmau, MALDİ-TOF MS ve LF-MS ile tanımlanan *Candida* türleri

Tanımlama yöntemleri sonuçları					
		Dalmau Plak	Maldi ToF MS	LF-MS	LF-MS ile “spektrum yetersizliği”
GEÇERLİ TÜRLER	<i>C.albicans</i>	37	37	26	11
	<i>C.parapsilosis</i>	23	23	9	14
	<i>C.tropicalis</i>	17	17	13	4
	<i>C.glabrata</i>	9	9	9	-
	<i>C.kefyr</i>	6	6	2	4
	<i>C.dublinsiensis</i>	3	3	3	-
	<i>C.guilliermondii</i>	3	3	-	3
	<i>C.krusei</i>	2	2	2	-
	Toplam	100	100	64	36

### 4.3.Gram boyama sonuçlarının LF- MS ile karşılaştırılması

Gram boyalı preparatlarda gözlenen kalitatif maya yoğunluğu ile LF-MS yönteminin tanımlaması arasındaki ilişki Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** LF- MS sonuçlarının Previ Color Gram boyama sonuçlarıyla karşılaştırılması

Tanımlanan Türler		KALİTATİF GRAM BOYAMA					Toplam
		0	1	2	3	4	
<i>C.albicans</i>	LF-MS	3	12	5	4	2	26
	SY	1	9	0	0	1	11
<i>C.parapsilosis</i>	LF-MS	1	4	0	4	0	9
	SY	3	8	3	0	0	14
<i>C.tropicalis</i>	LF-MS	3	6	1	1	2	13
	SY	3	0	1	0	0	4
<i>C.glabrata</i>	LF-MS	1	2	5	0	1	9
	SY	0	0	0	0	0	0
<i>C.kefyr</i>	LF-MS	0	2	0	0	0	2
	SY	3	1	0	0	0	4
<i>C.krusei</i>	LF-MS	0	0	0	0	2	2
	SY	0	0	0	0	0	0
<i>C.guilliermondii</i>	LF-MS	0	0	0	0	0	0
	SY	2	1	0	0	0	3
<i>C.dublinsiensis</i>	LF-MS	0	0	0	0	3	3
	SY	0	0	0	0	0	0
TOPLAM	LF-MS	8 (%40)	26 (%55,3)	11(%73,3)	9 (%100)	10 (%90,9)	64 (%64)
	SY	12	19	4	0	1	36

SY: Spektrum Yetersizliği

Spektrum yetersizliği gözlenen 36 suşun üretildiği kan kültür şişelerinde, Gram boyamada maya hücreleri yoğunluğunun düşük olduğu (0-1) gözlenmiştir Ancak, LF-MS ile

tanımlanan 64 kökenin 34'ünde de Gram boyamada maya yoğunluğu düşük bulunmuştur. Gram boyamada “0” olarak değerlendirilen izolatlarda identifikasyon sonucu %40; “1” olarak değerlendirilenlerde identifikasyon sonucu % 55,3; “2” olarak değerlendirilenlerde %73,3; “3” olarak değerlendirilenlerde %100 ve “4” olarak değerlendirilenlerde %90,9 olarak bulunmuştur.

Dalmau plak ve MALDI-TOF MS yöntemi ile LF-MS yöntemi arasındaki tür tanımlamasının uyumunun istatistiksel olarak karşılaştırılması Tablo 3’de verilmiştir.

**Tablo 3.**Dalmau plak ve MALDI-TOF MS ile LF-MS yöntemi arasında belirlenmiş türlerin Cohen’in kappa değeri ve uyum ölçümleri

Türler	P değeri	Cohen’in Kappa değeri	Değerlendirmesi
<i>C.albicans</i>	<0,000	,749	İyi düzeyde uyum
<i>C.tropicalis</i>	<0,000	,844	Çok iyi düzeyde uyum
<i>C.parapsilosis</i>	<0,000	,497	Orta düzeyde uyum
<i>C.glabrata</i>	<0,000	1,000	Çok iyi düzeyde uyum
<i>C.dublinskiensis</i>	<0,000	1,000	Çok iyi düzeyde uyum
<i>C.krusei</i>	<0,000	1,000	Çok iyi düzeyde uyum
<i>C.kefyr</i>	<0,000	0,485	Orta düzeyde uyum
<i>C.gulliermondii</i>		Hesaplanamamıştır	Hesaplanamamıştır

*Candida* türleri arasında *C. glabrata*, *C.dublinskiensis*, *C.krusei* ve *C.tropicalis* için uyum “çok iyi düzeyde” olarak bulunmuştur. *Candida gulliermondii* spektrum yetersizliğinden dolayı LF-MS yöntemiyle saptanamamış, bu nedenle de kappa değeri hesaplanamamıştır. Uyumsuzluğun nedeni olan “spektrum yetersizliği” dışlanırsa, 64 kökenin tamamı uyumlu bulunmuştur (Cohen’in kappa değeri: 1,00 ) (Tablo 4).

**Tablo 4.**Spektrum yetersizliği olan izolatların değerlendirme dışı bırakılmasıyla Dalmau plak ve LF - MS arasındaki uyum

Simetrik Ölçümler				
	Değer	Asimptotik Standart	Yaklaşık T <sup>b</sup>	Yaklaşık Önemlilik
Uyuşmanın Kappa Ölçümü	1,0	0,028	14,927	0,000
Toplam geçerli olgu	64			

## 5.TARTIŞMA

Son yıllarda tanı ve tedavi protokollerindeki gelişmeler bağışık baskılı hasta gruplarında ve fırsatçı maya enfeksiyonlarında özellikle de fungemilerde artışa neden olmuştur (48). *Candida* türleri, nozokomiyal enfeksiyonların %15, mantar enfeksiyonlarının %72 ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının %8-15'inde etken olarak bildirilmektedir (49). Hastanede yatan hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni invazif *Candida* enfeksiyonları olup bunların başında da kandidemiler gelmektedir. ABD'de yapılan araştırmalara göre *Candida* türleri kan dolaşımı enfeksiyon etkenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır (20). Kandidemiler hastanede yatan hastalarda ciddi mortalite ve morbiditeye neden olmakta, hastane bakım maliyetlerini ciddi şekilde artırmaktadırlar. *Candida* sepsisine bağlı mortalite oranı bakteriyel sepsisten daha yüksek olup, 24 saat içinde uygun tedavi başlanmadığında %97,6'lere çıkmaktadır (50,51).

Tüm dünyada invazif kandidoz ve kandidemilerin yaklaşık %95'inden *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C. krusei* türleri sorumludur. *Candida albicans* en yaygın görülen tür olmasına rağmen son yıllarda ADC türlerinin görülme sıklığı da artmıştır (52,53). *Candida albicans*'ın 1990- 2010 yılları arasında kandidozlardaki sıklığının %65'ten %44'e düştüğü, buna karşılık ADC türlerinden *C. tropicalis* ve *C.parapsilosis* insidansında artış olduğu belirtilmiştir. (54) *Candida* türlerinin görülme sıklığı bölgen bölgeye, hastaneden hastaneye farklılıklar gösterir, bunların virülansları ve antifungal duyarlılıkları da türe özgüdür. Azollere, ekinokandinlere ve amfoterisin B'ye karşı farklı duyarlılık profilleri olan türlerin varlığı nedeniyle etken olan *Candida* türünün hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması tedavi başarısı için en önemli koşuldur (51,55).

Kandidoz ve kandidemilerin tanısında kan kültürü hala altın standarttır. Etken olan türün tanımlanmasına ve antifungal duyarlılık testinin yapılmasına olanak sağlar. Kan kültürleri için broth besiyerleri, bifazik besiyerleri ve lizis santrifügasyon gibi manuel sistemler ve BactAlert ve Bactek gibi ticari otomatize sistemleri kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan otomatize kan kültürü sistemleri kandan mantar izolasyonu için uygun olup, devamlı monitorizasyon olanağı nedeniyle de fungeminin erken tanısına olanak sağlamaktadırlar. Otomatize kan kültür sistemleri pozitiflik süresini her ne kadar kısaltmış olsa da inkübasyon süreleri en az beş gün olmakta ve daha da aşağı çekilememektedir. Bu çalışmada Haziran 2017-Kasım 2018 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan örnekleri otomatize BactAlert (BioMérieux) sisteminde beş gün enkübe edilerek izlenmiştir.

*Candida* türlerinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin tanımlanması sıklıkla fenotipik özelliklerine göre yapılmaktadır. Bunlar germ tüp, mısır unu tween 80 agardaki morfolojik görünümüleri gibi konvansiyonel yöntemler ile ticari olarak bulunan çeşitli asimilasyon ve fermentasyon testleridir. Konvansiyonel yöntemler basit ve ucuzdur. Ancak zaman alıcı olmaları, deneyim gerektirmesi ve iyi derecede mikroskopik gözlem becerisine sahip olunması gibi bazı dezavantajlara da sahiptir. Ticari testler özel bir deneyim gerektirmemekle birlikte, tanımlama süresini kısaltmamaktadır. Son yıllarda moleküler temelli testler epidemiyolojik ve araştırma amaçlı olarak mantarların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Doğru sonuç verebilen ancak zaman alıcı, pahalı ve henüz standardize olmayan bu yöntemler de teknik olarak rutin kullanıma uygun değildir (56)

Mayaların tanımlanmasında kullanılan Dalmau plak yönteminde, mısır unu tween 80 agarda 48-72 saat inkübasyon sonrasında mayaların mikroskopik morfolojileri değerlendirilmektedir. Rutin tanı laboratuvarlarında sık kullanılan ve standart olan bu yöntem, kayda değer bir beceri ve deneyim gerektirmektedir (57). Morfolojik bulgular ADC türlerinde özgül olmayıp bunlarda fenotipik ve genotipik tanımlama daha önemli olmakla birlikte bazı türlerde ayırt edici de olabilir. Örneğin *C. glabrata* mısır unu/tween-80 agarda hiç hif oluşturmaz ve tüm mayalar arasında en küçük blastospora sahip olan türdür. Bu gibi nedenlerle morfolojik incelemenin her zaman diğer tanımlama sistemlerine ek olarak kullanılması önerilmektedir (9). Bazı araştırmacılar CHROMagar *Candida* (CMA)'nın *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *Trichosporon* türlerinin tanımlanmasında etkili bir yöntem olduğunu, *C. glabrata*'nın, ise besiyerinde morfolojik olarak *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. wickerhamii*, *Cryptococcus neoformans* ve *C. guilliermondii*'e benzer bir görünüme sahip olması nedeniyle ayırt edilemeyeceğini ve güvenilir bir yöntem olmadığını belirtmişlerdir. Tanımlama için mısır unu tween 80 agardaki mikromorfolojik bilgilerin de gerekli olduğunu vurgulamışlardır. Benzer şekilde CMA'da pembe parlak koloniler oluşturan *C. famata* ve *C. glabrata*'nın ayırımında mısır unu tween 80 agar'da yalancı hif oluşturmayan maya hücrelerinin *C. glabrata* olarak tanımlanabileceğini ileri sürmüşlerdir. *Candida krusei*'nin ise hem CMA hem de mısır unu tween 80 agarda belirgin bir morfoloji göstererek, başarılı bir şekilde tanımlanabileceğini belirtmişlerdir (58). Bu çalışmanın yapıldığı laboratuvarında, rutin tanımlama işlemlerinde otomatize MALDI-TOF MS yönteminin yanında morfolojik tanımlama desteği için Dalmau plak birlikte kullanılmaktadır. Yine aynı çalışmada (57) *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'in benzer morfolojik görünümüleri nedeniyle ayırımları için, ısı deneyi ile 45<sup>0</sup>C'de üreme özelliğinin yararlı olacağı önerilmiştir ki, bu çalışmada da *C. albicans*'a benzer morfoloji gösteren kökenlerden, 45<sup>0</sup>C'de üremeyen iki tanesi *C. dubliniensis* olarak tanımlanmış, otomatize yöntemle de aynı sonuç elde edilmiştir.

Konvansiyonel yöntemde karşılaşılan bu problemlerin giderilmesi için daha hassas ve spesifik olan ancak daha az teknik uzmanlık gerektiren ve daha kısa inkübasyon süresi sağlayan alternatif testlere ihtiyaç doğmuştur. Son yıllarda *Candida*'ların tür tanımlamasında kullanılan yöntemlerdeki dezavantajların çoğunun mayalardan salınan spesifik proteinlerin saptanmasına dayanan matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile aşılabileceği bildirilmektedir. Klinik laboratuvarlarında maya izolatlarını tanımlamak için kullanılan konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında, MALDI-TOF MS ile, çok daha kısa sürede ve giderek büyüyen veritabanı sayesinde daha doğru tanımlamalar yapılabileceği öne sürülmektedir (51).

MALDI-TOF MS yöntemi ile konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı, ekonomik ve daha güvenilir sonuçlar alındığını gösteren çeşitli çalışmalar vardır. MALDI-TOF MS'in çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizm yöntemi (AFLP) ile doğrulamasının yapıldığı bir çalışmada *C. parapsilosis* complex (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*) ve *Lodderomyces elongisporus* izolatlarının her iki yöntemle de doğru tanımlandığı; biyokimyasal yöntemlerle birbirinden ayıramayan ve direnç profillerinde farklılık bulunan *Candida ortho/meta/parapsilosis*, *Candida glabrata/ bracarensis/ nivariensis*, *C. albicans/ dubliniensis* gibi genetik olarak yakın ilişkili türlerin veya fenotipik olarak birbirine çok benzeyen *C. famata* ile *C. guilliermondii* gibi türlerin bu yöntemle doğru bir şekilde tanımlandığı bildirilmiştir (59-61).

Kim ve ark. (62), 2014'te yaptıkları çalışmada Vitek-2 ile *C. famata* olarak tanımlanan 26 *Candida* izolatının doğrulaması için MALDI-TOF MS ve gen sekans analizini kullanmışlardır. Çalışmada Vitek-2'nin *C. famata* olarak tanımladığı kökenlerin gen sekans analizinde *C. guilliermondii* ile %100 homoloji gösterdiği, MALDI-TOF MS'in ise çalışılan 26 suştan 21'ini doğru tanımladığı, dört izolatın ise tanımlanamadığı bildirilmiştir.

Pinto ve ark. (60), Bruker sistemi ile yaptıkları araştırmalarında ekstraksiyon yapılmadan direkt yayma ile spektrum oluşmadığını ya da kabul edilemez düşüklükte spektrumlar oluştuğunu tespit etmişlerdir. van Herendael ve ark. (63), basitleştirilmiş ekstraksiyonla tanımlama yapmayı değerlendirmişler ancak 28 izolatın sınır değerinin, güvenilir tanımlama için minimum cut off değerinin (1,7 cut off) altında olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada da LF-MS ile spektrum yetersizliği nedeni ile bazı izolatların tür düzeyinde tanımlanmasında sorunlar yaşanmıştır. Bunun aksine, tanımlamadan önce yapılan hazırlık aşamasının prosedürlere uygun yapıldığı klasik MALDI-TOF MS yönteminde, türlerin tanımlanması mükemmel düzeyde gerçekleşmiştir. Ancak çalışmamızın ana konusu LF-MS yöntemiyle identifikasyonda yeterli düzeyde tanımlamaya

ulaşlamamıştır, tanımlama düzeyi %64 de kalmıştır. Spektrum yetersizliği ile tanımlanamayan izolatlar değerlendirme dışı bırakılırsa elde edilen veriler %100 uyumlu bulunmuştur.

Van Belkum ve ark. (64), MALDI-TOF MS yonteminin, klinik ornekler uzerinde doğrudan geręekleřtirilemeyeceęini klinik ornekte bulunan az sayıda mikroorganizmanın, doğru spektrum elde edilmesine izin vermeyeceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte, kan kültüründe ancak zenginleştirmeden sonra, tanımlamanın mümkün hale gelebileceği bildirilmiştir. Pozitif kan kültürleri için, mikrobiyal biyokütle genellikle yeterliyen kütle spektral analizinden önce konsantre edilmesi gerektiği ve saflaştırılması gerektiği ifade edilmiştir. Konsantrasyon ve ekstrasyon için lizis filtrasyon ya da santrifüjle muamele edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, üreme sinyali gösteren şişelerden öncelikli olarak Gram boyama yapılmış ve maya hcreci görülenlerden yoğunlaştırma amacıyla, direkt LF yapılarak, ardından MALDI-TOF MS yontemi uygulanmıştır. Her şişeden yapılan Gram boyalı preparatlarda maya yoğunluğunun farklı olması nedeni ile 0 ile +4 arasında kalitatif skorumlama yapılmıştır. Van Belkum ve ark. (64)'ları tarafından ileri sürülen maya yoğunluğunun tanımlamada önemli olduğu düşüncesi bu çalışmada da gözlenmiştir. Gram boyamada "0" olarak tanımlanan izolatlarda doğru tanımlama oranı %40 iken, maya yoğunluğunun artması ile %100'lere artmıştır.

Keçeli ve ark.(65), 97 *Candida* kökeninde; Vitek-MS yonteminin tanımlama performansını değerlendirmişler, elde ettikleri sonuçları germ tüp, mısır unu tween 80 agarda morfolojik grmleri, API *Candida* ve API 20C AUX sistemleri ile karşılaştırmışlardır. Vitek-MS, API veya mısır unu tween 80 agarda farklı tanımlanan türleri ITS rDNA sekans analizi ile doğrulamışlardır. Farklı olarak tanımlanan altı kökenin sekans analizi %56,2 API 20C AUX, % 50 mısır unu tween 80 agar, % 93.7 Vitek-MS ile uyumlu çıkmıştır. *Candida* türlerinin tanımlanmasında tek bir yontemin yeterli olmadığını; Vitek MS'in daha az malzeme gereksinimi ile hızlı sonuç verme, maliyet etkin olma, yorumlanma kolaylığı ve sonuçların geniş bir veri tabanında saklanması gibi birçok avantajının olduğunu belirtmişlerdir. Konvansiyonel tanımlama yontemleri ile karşılaştırıldığında, Vitek-MS sonuçlarının *Candida* tür tanımlamasında daha güvenilir, hızlı olduğunu ve Vitek-MS sisteminin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin tanımlama yontemi olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarı'nda kan kültüründe üreme sinyali veren şişelerin kanlı agar, EMB agar ve SDA besiyerlerindeki subkltrlerinde maya üreyen kolonilerden, çalışmalarda da önerildiği gibi

birden fazla yöntemle (Dalmau yöntemi ve MALDI-TOF MS) tür tanımlaması yapılmaktadır. Kullanımda olan dört farklı MALDI-TOF MS sistemi vardır. Bunlardan VITEK MS (Vitek MS server v.1.2 yazılımı) ve Bruker sisteminin identifikasyon performanslarını karşılaştıran bir çalışmada, VITEK MS ve Bruker sistemlerinin, tıbbi önemi olan ve sık karşılaşılan mayalarda doğru tanımlama oranlarının yüksek, nadir görülen mayalarda ise VITEK MS yönteminin tanımlama oranının daha düşük ve yanlış tanımlama oranının da daha yüksek olduğu bildirilmiştir (66). Bu çalışmada kullanılan sistem VITEK MS'tir. Çalışmadaki tür çeşidi sayısı (sekiz) az olmakla birlikte *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve *C. dubliniensis* gibi tanımlamada sorun yaşanan türler konvansiyonel yöntemle uyumlu olacak şekilde doğru tanımlanmıştır.

Kan kültüründe uygulanan mevcut prosedürde, pozitif kan kültür şişelerinden *Candida*'nın tür tanısı için, öncelikle katı besiyerine pasaj yapılması ve üreyen kolonilerden tanımlama yapılması gerekmektedir. Bu da, otomatize kan kültür şişelerinde pozitif sinyal alındıktan sonuç raporuna kadar en az 48-72 saatlik bir süreyi kapsamaktadır (55).

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda da sinyal oluşumu sonrasında geçen süre Dalmau plak yönteminde en az 72 saat, MALDI-TOF MS (Vitek MS)'te ise 24-48 saattir. Kandidemilerde tedavideki her bir saatlik gecikmenin mortaliteyi artırdığı bilinmektedir (7). Bu çalışmada, tanımlama basamağındaki süreyi en aza indirmek için, üreme sinyali sonrası kan kültür şişelerinden subkültür basamağının atlanıp, direkt kan kültür şişesinden LF-MS yönteminin performansının rutin uygulamadaki yöntemlerle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MALDI-TOF MS yönteminin hazırlık aşamasında matriks solüsyonu olarak adlandırılan kimyasal maddeler, örneğin kristalizasyonunu sağlayan, değişen lazer dalga boylarında güçlü bir optik absorpsiyon yeteneği gösteren küçük asit molekülleridir. Bu kimyasal maddeler sayesinde lazer enerjisi absorblanarak, analitin yüzeyel salınımla (desorbition) gaz fazına buharlaşması ve iyonlaşması sağlanır. Moleküllerin saptanan piklerinin yoğunluğu ve büyüklüğü, matriks molekülünün seçimine bağlı olarak değişmektedir (67). Bu çalışmada matriks solüsyonu olarak cihazın üretici firmasının önerdiği, düşük kütle iyonlarını ideal olarak saptayabilen CHCA asiti kullanılmıştır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda üreme sinyali veren kan kültürü şişelerinden yapılan subkültürlerin ardından rutin tanımlama işlemi kapsamında standart tanımlama yöntemi olarak kullanılan Dalmau plak ve MALDI-TOF MS ile 100 köken içinde sekiz farklı çeşit *Candida* türü saptanmıştır. Bunların 94'ünde, kandidemilerde sık etken olan *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*



ve *C. krusei*; altısında da daha nadir görülen türlerden *C. guilliermondii* ve *C. dubliniensis* izole edilmiştir. MALDI-TOF MS ile tanımlamada türlerin hepsi %99 güvenilirlikte tanımlanmış olup; yapılan çalışmalarda da (68, 69) belirtildiği gibi, MALDI-TOF MS'in diğer konvansiyonel yöntemlerle tanımlama uyumu Dalmau yöntemi ile de gözlenmiştir.

MALDI-TOF MS yönteminde, subkültür elde etmeden doğrudan doğruya kan kültüründen analiz yapılmasında çeşitli zorluklar ortaya çıkmaktadır Başarılı bir tanımlama için mayalardaki hücre içi proteinlerin serbest hale gelmesi gerekmektedir. Bununla beraber maya proteinleri, spektrum ve pik eşleşmesini engelleyebilen spektral kirleticiler olarak bilinen kan bileşenlerinden (eritrositler, lökositler ve serum proteinleri) temizlenmelidir. MALDI-TOF MS kullanılarak maya ve diğer mikroorganizmaların tanımlanması, bir izolattan kaliteli bir protein spektrumunun elde edilmesine ve bu spektrumun tanımlanmış bir veri tabanında karşılaştırılmasıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle, bu teknolojiyi kullanan cihazların veri tabanının genişliği ve çeşitliliği önem arz etmektedir. Bu durumda cinsin veya türün bilinmeyen izolatları için sonuçlar “düşük skorlar” veya “kabul edilemez” tanımlamalar şeklinde olacaktır. Ticari olarak mevcut referans veri tabanlarının yetersiz olması nadir *Candida* türlerinin ve mayaların sınırlı sayıda spektrum içermelerine ve tanımlanamamalarına neden olmaktadır (70). Kalın hücre çeperleri nedeniyle, mantarlarda yüksek kaliteli MALDI-TOF MS spektrumlarını elde etmenin, çoğu bakteri türünden daha zor olduğu ve kültür ortamının, büyüme koşullarının ve ekstraksiyon prosedürlerinin optimizasyonunu ve standardizasyonunu gerektirdiği ileri sürülmektedir. Yüksek kaliteli MALDI-TOF kütle spektrumları elde etmek için, mantar hücrelerinin% 70 formik asitte ve / veya bir boncuk çırpıcıda mekanik olarak parçalanmasının gerekebileceği belirtilmektedir.

İlk kez Fothergill A ve ark. (45) tarafından pozitif sinyal veren Vitek MS, BacT / Alert şişelerinden bir miktar alınan kan kültürü sıvısının oda sıcaklığında 2- 4 dakika süreyle lizis tamponu ile inkübe edildikten sonra elde edilen lizatın filtrelenerek, mikroorganizmaların toplanması ve Vitek MS ile tanımlanması esasına dayanan, bakteri ve maya türlerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasını amaçlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Vitek MS ile çalışmaya dahil edilen 259 şişenin 189 (%73)'unda mikroorganizma tür seviyesinde tanımlanırken, 51 (%19.7)'inde tanımlanamamış, altısında (% 2.3) yanlış tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu yöntemin avantajının santrifüj gerektirmemesi, 15 dakikadan daha kısa bir sürede Vitek MS analizi için temiz bir spektrum üretmesi ve mikroorganizmaları doğrudan pozitif kan kültür şişelerinden tanımlaması olduğunu ileri sürmüşlerdir. Lizis sonrası direkt kan kültür şişesinden mayaların santrifüj edilmesi ile elde edilen, *Candida*'ların tür tanısında farklı protokoller ve farklı eşik değerlerin kullanıldığı çalışmalar da vardır (50, 51, 55, 71).

Bu çalışmada, Dalmau plak yöntemi ve MALDI-TOF MS yönteminde birbiri ile %100 uyumlu olacak şekilde tanımlanan türlerin 64'ünde LF-MS ile %99 güvenilirlikte tanımlama gerçekleşmiştir. İstatistiksel olarak uyum ölçümleri *C. kefir* ve *C. krusei* dışında iyi ve çok iyi düzeyde saptanmıştır (Tablo 2). Kalan 36 köken “spektrum yetersizliği” nedeniyle tanımlanamamıştır. Fothergill A ve ark. (45)'nin çalışmalarında belirtilen tür düzeyinde tanımlama başarısı bu çalışma ile benzer olmakla birlikte, farklı olarak bu çalışmada “tanımlanamayan” ya da “yanlış tanımlanan” türlerin olmamasıdır. “Spektrum yetersizliği” olarak tanımlama dışı kalan suşlar, aslında veri tabanında yer alan türlerden oluşmaktadır. Bu değişken analiz dışı bırakıldığında kappanın uyum oranı “çok iyi düzeyde” (Tablo 3) bulunmuş olup, tanımlama yapılan 64 *Candida* türünün standart yöntemlerle %100 uyumlu olacak şekilde tanımlama yaptığı ve bu yöntemin subkültür gerektiren MALDI-TOF MS yöntemine göre en az 48 saat, Dalmau yöntemine göre de en az 72 saat avantaj sağladığı görülmüştür.

Tanımlanan kökenlerle tanımlanmayan kökenlerin Gram boyalı preparatları birlikte değerlendirildiğinde, tanımlamanın olmadığı şişelerdeki maya hücresinin 0 ve +1 skorunda yer aldığı gözlenmiştir. Tanımlamanın yetersiz olduğu türler belli bir türe özgü olmayıp, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefir* gibi sık görülen türler ile daha ender görülen *C. guilliermondii* türünde saptanmıştır. Bu durumun türden ziyade şişedeki maya yoğunluğu ile ilişkili olabileceği, şişelerdeki maya yoğunluğunun tür tanımlamasında sorunlara yol açtığı düşünülmüştür. Bunu destekler nitelikte, MALDI-TOF MS ile direkt pozitif kan kültüründe doğru tanımlama oranlarının, kullanılan protokol ve kan kültüründeki mantar yükü ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (51, 71).

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Mantar enfeksiyonları özellikle bağışık yetmezliklilerde ve diğer altta yatan hastalığı olanlarda giderek artmaktadır. Fırsatçı mantar enfeksiyonlarının en sık nedeni *Candida* türleridir ve *Candida*'lara bağlı enfeksiyonlar içinde en sık kandidemiler görülmektedir. Kandidemiler, hastanede yatan hastalarda invazif kandidozların en sık görülen klinik şekli olup yüksek mortalite ve morbidite ile seyretmektedir. Mortalite ve morbiditeyi etkileyen en önemli faktörlerden biri erken dönemde başlanacak uygun antifungal tedavidir. Bunun için de ön koşul hızlı ve doğru tür tanımlamasının yapılmasıdır.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, hasta örneklerinde üreyen mayaların tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntemler ve geliştirilen çeşitli ticari yöntemlerin avantaj ve dezavantajları olmakla birlikte, bu yöntemlerle tür düzeyinde tanı en erken 48-72 saatte gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada uygulanan LF-MS yöntemi, basit ve kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem olup, mevcut tanımlama yöntemlerine göre en az 48 saat avantaj sağlamaktadır.

Lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yöntemi 100 izolata uygulanmış, 36'sı spektrum yetersizliğinden kaynaklanan identifikasyon problemi nedeniyle hiç tanımlanamamıştır. Ancak bu türler subkültür sonrası yapılan MALDI-TOF MS ile tanımlanan ve veri tabanındaki spektrumda yer alan türlerdir. Ayrıca bu sorun çalışmada saptanan sekiz türden altısında gözlemlendiği için, türlerle ilişkilendirilemeyecek bir durumdur. Elde edilen veriler, Gram boyama ile elde edilen kalitatif maya yoğunluğu sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, tanımlamadaki sorunun maya yoğunluğu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür ve tanımlanan 64 izolatta elde edilen sonuçlar konvansiyonel yöntemle %100 uyumlu bulunmuştur. Kan kültürü şişelerinde pozitif sinyal sonrası Gram boyalı preparatta her sahada maya hücrelerinin görülmesi durumunda, LF-MS yönteminin kullanılabileceği düşünülmüştür. MALDI-TOF MS yönteminde tanımlamanın doğru yapılabilmesi, yeterli spektrumun elde edilebilmesi için teknik prosedür ve gerekliliklerin doğru uygulanmasının yanında maya hücre yoğunluğunun da önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmadaki veriler, tür çeşitliliğinin ve çalışılan örnek sayısının az olması nedeni ile daha geniş bir yorum yapmayı engellemektedir. Spektrum yetersizliğinden kaynaklanan tanımlama probleminin çözülmesine yönelik, daha fazla türü kapsayacak şekilde daha yüksek sayıda örnek içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7.KAYNAKLAR

1. Groll AH. Invasive opportunistic mycoses. Clinical trials review, 2007–2008. *Curr Infect Dis Rep.* 2008;10(6): 451-453.
2. Wisplinghoff H; Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals : analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2004 Aug 1;39(3):309-17.
3. Lewis RE. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin.* 2009 Jul;25(7):1732-40. doi: 10.1185/03007990902990817.
4. Arman D, Sezer BE.Yoğun Bakım Ünitesinde Gelişen Fungal İnfeksiyonlar. *Derleme Yoğun Bakım Dergisi.* 2010; 9(3): 121-128.
5. Willke TA, Çerikçioğlu N, Söyletir G, Doganay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi,Candida türleri.İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017.p.2115-2129.
6. Sav H, Demir G, Atalay MA, Koç, AN. Klinik örneklerden izole edilen Candida türlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 2013; 70(4):175-180.
7. Yeğenoğlu Y. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İst Tıp Fak Derg.* 2007; 70(1):23-28.
8. Hazen K, Howell SA. Candida. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA. *Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara: Nobel Kitabevi; 2009.p.1762-1765.
9. Larone DH. Medically Important Fungi A Guide to Identification. *Yeast and Yeast Like Organisms.* 5nd ed. Washington DC: ASM Press; 2011.p.109–143.
10. Eggimann P, Pittet D, Garbino J. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):685-702.
11. Khan ZU, Chandy R, Metwali KE. Candida albicans strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes 11-12. *Mycoses.* 2003; Cilt 46: 479–486.
12. Ustaçelebi S. Candida türleri. In: E Tümbay, et al. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.p. 1081-1086.

13. Martin Greg S, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-1554.
14. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O. Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; Cilt 23(1): 317–322.
15. Seyedmousavi S, İlkit M, Durdu M, Ergin Ç, Hilmioğlu-Polat S, Melchers W, et al. Candida ve Kandidoz: Epidemiyoloji, Tanı, Tedavi, Antifungal İlaç Direnci ve Konağın Genetik Yatkınlığında Güncel Durum. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2015; Cilt 45(1): 1-11.
16. Eggimann P, Que YA, Revely JP, Pagani JL. Preventing invasive candida infections. Where could we do better?. *J Hosp Infect.* 2015;89(4):302-308.
17. Akalın H. Fungal İnfeksiyonlar. In: Yalçın AN, Erbay RH. Yoğun Bakım Ünitesinde İnfeksiyonlar. Nobel Tıp Kitapevleri; 2009.p. 147-153.
18. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. S.Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013;62(1): 10-24.
19. Edwards, JE. Candida Species. In: Mandell GL, Bennett J, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunder; 2010.p.3225-3241.
20. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1): 133–163.
21. Pereira GH, Müller PR, Szesz MW, Levin AS, Melhem MS. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-C. albicans Candida species. *Med Mycol.* 2010; 48(6) : 839-42.
22. Cruciani M, Serpelloni G. Management of Candida infections in the adult intensive care unit. *Expert Opin Pharmacother.* 2008 Feb;9(2):175-91.
23. Wheat, LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis.* 2008; 8(3):128-139.
24. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 465-84.

25. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. Candida. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. Elsevier Health Sciences. 2009; 2(2): 197-229.
26. Pfaller MA. Application of Culture-Independent Rapid Diagnostic Tests in the Management of Invasive Candidiasis and Cryptococcosis. Journal of Fungi. 2015;1(2):217-251.
27. Kauffman CA. Clinical manifestations and diagnosis of candidemia and invasive candidiasis in adults. <https://www.uptodate.com>. [Çevrimiçi] 27 Aug. 2018. [Alıntı Tarihi: 27 Dec 2018.] <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults>.
28. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD. et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. Clin Microbiol. 2011;49(9): 3300-3308.
29. Sutton DA. Specimen Collection, Transport, and Processing: Mycology. In: Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007.p. 1728-1736.
30. Yıldırım ŞT. Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. In: Ş. Ustaçelebi et al. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ankara: Güneş kitabevi; 1999.p.1127-1144.
31. Hazen KC, Howell SA. Candida, Cryptococcus, and Other Yeasts of Medical Importance. In: Murray PR et al. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007.p. 1762-1788.
32. Çerikçioğlu N. Mantar enfeksiyonlarının moleküler yöntemlerle tanısı. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Konuşma Özetleri .2010; 128-131.
33. Buckley HR. Identifications of yeasts. In: Evans EGV, Richardson MD. Medical Mycology: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 1989.p. 97-109.
34. Neppelenbroek K, Seó R, Urban V, Silva S, Dovigo L, Jorge J, et al. Identification of Candida species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral diseases, 2014; 20(4):329-344.
35. Pincus DH, Orena S, Chatellier S. Yeast identification--past, present, and future methods. Med Mycol. 2007;45(2): 97-121.
36. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Woods GL, et al. Mycology. In: Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. USA: Lippincott Williams and Wilkins Publishers; 2006.p.1151-1244.

37. Segal E, Elad D. Candidiasis. In: Merz W, Hay R, Topley W. Microbiology and Microbial Infections. 10nd ed. London: Hodder Arnold; 2005.p.579-623.
38. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J Clin Microbiol. 1994; 32(8):1923–1929.
39. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel 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):1614-1616.
40. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, et al. Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and Corynebacterium Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2012;50(1):3093–5.
41. Drevinek M, Dresler J, Klimentova J, Pisa L, Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. Lett Appl Microbiol.2012;55(1): 40-46.
42. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3): 547–603.
43. Wattal C, Oberoi JK. Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Jan;35(1):75-82.
44. Lee HS, Shin JH, Choi MJ, Won EJ, Kee SJ, Kim SH, et al.. Comparison of the Bruker Biotyper and VITEK MS Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Systems Using a Formic Acid Extraction Method to Identify Common and Uncommon Yeast Isolates. Ann Lab Med. 2017;37:223-230.
45. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid Identification of Bacteria and Yeasts from Positive-Blood-Culture Bottles by Using a Lysis-Filtration Method and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum Analysis with the SARAMIS Database. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):805-9.

46. Cohen JA. Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*, 1960;20.
47. Kılıç S. Kappa Testi. *Journal of Mood Disorders*, 2015;5(3):142-4.
48. Posteraro B, Efremov L, Leoncini E, Amore R, Posteraro P, Ricciardi W. Are the Conventional Commercial Yeast Identification Methods Still Helpful in the Era of New Clinical Microbiology Diagnostics? A Meta Analysis of Their Accuracy. *J Clin Microbiol*.2015; 53(8) :2439-2450.
49. Warnock DW. Mantarların Taksonomisi ve sınıflandırılması. In: Murray PR. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009.p. 1721-1727.
50. Idelevich EA, Grunewald CM, Wüllenweber J, Becker K. Rapid Identification and Susceptibility Testing of *Candida* spp. from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2. *PLOS ONE*. 2014; 9: 1-14.
51. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D’Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories. *J Clin Microbiol*.2012;50:176-179
52. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect*. 2008;4(1):5-24.
53. Rodloff C, Koch D, Schaumann R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res*. 2011;16(4):187-95.
54. Yapar N. Epidemiology and risk factors for Invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10(1):95-105.
55. Vecchione A, Florio W, Celandroni F, Barnini S, Lupetti A, Ghelardi E. A Rapid Procedure for Identification and Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts From Positive Blood Cultures. *Front Microbiol*. 2018; 9:1-5
56. Duran-Valle MT, Sanz-Rodriguez N, Munoz-Para PC, Almagro-Molto M, Gomez-G, Jose L. Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32 C. *Medical Mycology*. 2014;52(1):342–349.



57. Afreen, Bhattacharyya S, Sengupta A, Sarfraz A, Kumar D, Kumar R, Kumar A. Identification of *Candida* and *Trichosporon* species by oxidase and coagulase test. *International Journal of Advanced Research*. 2016; 4(5): 475-479.
58. Koehler AP, Chu KC, Elizabeth TS, Cheng, Augustine FB. Simple, Reliable, and Cost-Effective Yeast Identification Scheme for the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(2): 422–426.
59. De Carolis E, Hensgens LA, Vella A, Posteraro B, Sanguinetti M, Senesi S, Tavanti A. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDITOF MS vs. AFLP. *Medical Mycology*. 2014;52(1):123–30.
60. Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One*. 2011;6(10):1-7.
61. Ece G, Samlioglu P, Akkoclu G, Atalay S, Kose S. The Evaluation of the Distribution of Yeast like Fungi 'Candida Species' at a Tertiary Care Center in Western Turkey. *Int J Med Sci*. 2012; 9(7): 617–620.
62. Kim SH, Shin JH, Mok JH, Kim SY, Song SA, Kim HR, et al. Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among Strains Isolated from Blood Cultures by the VITEK 2 System. *Bio Med Research International*, 2014;1(1):1-6. Article ID 250408.
63. Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, Boekhout T, De Baere T, Surmont I, Mertens AH. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(5): 841-8.
64. van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier JP, Girard V. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues? *Ann Lab Med*. 2017; 37(6): 475-483.
65. 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 Feb;181(1-2):67-73.
66. Mancini N, De Carolis E, Infurnari L, Vella A, Clementi N, Vaccaro L, et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-

- time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J Clin Microbiol.* 2013 Jul;51(7):2453-7.
67. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380-407.
68. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Vega M, González M, García MI, Rodríguez S, et al. Identification of fungal clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Rev Esp Quimioter.* 2013 Sep;26(3):193-7.
69. Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, Cassaing S. identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J Clin Microbiol.* 2012 Jun; 50(6): 2107–2110.
70. Buchan BW, Ledebor NA. Advances in Identification of Clinical Yeast Isolates by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionizatio. *J Clin Microbiol.* 2013 May;51(5):1359-66.
71. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2577.