

Maya Mantarlarının Hızlı Tanımlanmasında Lizis Filtrasyon Sonrası MALDI TOF-MS Yönteminin Kullanımı

Use of MALDI TOF-MS Method After Lysis Filtration for Rapid Identification of Yeast

Sami Eren[®], Dilek Yeşim Metin[®], Süleyha Hilmioğlu Polat[®]

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Eren S, Metin DY, Hilmioğlu Polat S. Maya mantarlarının hızlı tanımlanmasında lizis filtrasyon sonrası MALDI TOF-MS yönteminin kullanımı, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(4):421-7.

Öz

Amaç: İnvazif kandidozda 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 yönteminin uygunluğu araştırılmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan kültürlerinden izole edilen 100 *Candida* kökeni, Dalmay plak, MALDI-TOF MS ve lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yöntemleriyle araştırıldı ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmamızda konvansiyonel ve MALDI-TOF MS tanımlama yöntemlerine göre; 37 *Candida albicans*, 23 *Candida parapsilosis*, 17 *Candida tropicalis*, dokuz *Candida glabrata*, altı *Candida kefyar*, üç *Candida guilliermondii*, üç *Candida dubliniensis*, üç *Candida krusei* olarak tanımlanmıştır. Lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yönteminde ise tanımlama oranları; 26 *C. albicans*, dokuz *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, dokuz *C. glabrata*, iki *C. kefyar*, üç *C. dubliniensis*, iki *C. krusei* olarak belirlenmiştir. MALDI-TOF MS yöntemi ve Dalmay plak ile lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yöntemi 64 kökende uyumlu bulunmuştur. Uyumsuzluğun yanlış tanımlamadan değil, spektrum yetersizliğinden kaynaklandığı gözlemlenmiştir.

Sonuç: "Spektrum yetersizliği" olarak tanımlanmayan suşlar 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, Dalmay plak yöntemine göre de en az 72 saat avantaj sağladığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: MALDI-TOF, kütle spektrometrisi, filtrasyon, *Candida* spp

ABSTRACT

Objective: The early diagnosis of candidosis is very important in fungal infections and to reduce mortality rates, short-term and reliable methods are needed. In this study, the appropriateness of MALDI-TOF MS method after lysis filtration was investigated for the faster identification of *Candida* spp.

Method: 100 *Candida* isolated from positive blood cultures sent to Ege University, School of Medicine, Medical Microbiology laboratory, were studied with Dalmay plaque, MALDI-TOF MS and after lysis filtration methods. The results were compared with those obtained from the classical MALDI-TOF MS method.

Results: According to conventional and MALDI-TOF MS identification methods; 37 *Candida albicans*, 23 *Candida parapsilosis*, 17 *Candida tropicalis*, nine *Candida glabrata*, six *Candida kefyar*, three *Candida guilliermondii*, three *Candida dubliniensis* and three *Candida krusei* were identified. After lysis filtration method; 26 *C. albicans*, nine *C. parapsilosis*, 13 *C. tropicalis*, nine *C. glabrata*, two *C. kefyar*, three *C. dubliniensis*, two *C. krusei*. MALDI-TOF MS method and Dalmay plaque and after lysis filtration method were found to be compatible in 64 strains. Incompatibility was not due to incorrect identification, but spectrum deficiency.

Conclusion: The strains, which are not identified as "spectrum deficiency" consist of the species in the database. Sixty-four *Candida* species were found to be 100% compatible with the standard methods and this method was found to be advantageous for at least 48 hours compared to MALDI-TOF MS method which required subculture and for at least 72 hours compared to Dalmay plaque method.

Keywords: MALDI-TOF, mass spectrometry, filtration, *Candida* spp

Alındığı tarih / Received:
12.02.2021 / 12. February.2021

Kabul tarihi / Accepted:
22.04.2021 / 22. April.2021

Erken çevrimiçi / First Published:
23.09.2021 / 23. September.2021

ORCID Kayıtları

S. Eren 0000-0002-6263-8048
D.Y. Metin 0000-0002-7282-5031
S. Hilmioğlu Polat 0000-0001-8850-2715

✉ dilekyesimb@yahoo.com

* Bu çalışma, Dr. Sami Eren'in tezinden türetilmiştir.

GİRİŞ

Mantarlar, bağışıklığı normal kişilerde yüzeysel enfeksiyonlar oluştururken, bağışık sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden, morbidite ve mortalitesi yüksek ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır⁽¹⁾. Fungemi, özellikle de kandidemi bağışık baskılı hastalarda en sık görülen mantar enfeksiyonudur.

Kandidemilerin tanısında altın standart yöntem kan kültürüdür. Kültür sonucunda üreyen etkenin tür düzeyinde tanımlanması, olası direncin öngörülmesi 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 gerçekleştirilmektedir. Yapılan araştırmalarda kandidemili hastalarda tanıdaki gecikmelerin mortalite ile ilişkili olduğu, antifungal tedaviye başlamadaki gecikmelerin mortalite oranını artırdığı bildirilmiştir⁽²⁾.

Bu çalışmada, kan kültüründe üreyen *Candida*'ların erken dönemde lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS (LF-MS) ile tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik Kurulu tarafından (26.08.2021 tarih ve 21-8T/33 No.) onaylanmıştır. Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 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. Rutinde uygulanan tanı yöntemlerinin kontrolü amacı ile *Candida albicans* ATCC 90028 ve *C. albicans* ATCC 10231 kökenleri kullanıldı.

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, Tablo 1'de tanımlandığı gibi kalitatif değerlendirme yapıldı.

Dalmau plak yöntemi: Sabouraud dekstroza 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 *Candida dubliniensis* türlerinin benzerliği nedeni ile bu morfolojide gözlenen türlerin hepsine ısı deneyi yapıldı. 35 ve 45°C'de üreyenler *C. albicans*, 35°C'de üreyip, 45°C'de üremeyenler de *C. dubliniensis* olarak tanımlandı.

MALDI-TOF MS yöntemi: VITEK MS (Vitek MS server v.3.2 yazılımı) ile 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 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (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) 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) için işlem tekrarlandı⁽³⁾. Üst üste 2 kez aynı sonuç elde edildikten sonra rapor edildi.

LF-MS yöntemi: Gram boyalı preparatta maya hücreleri görülen ve/veya maya mantarı üreyen kan kültür şişelerinden, lizis filtrasyon işlemi uygulandıktan

Tablo 1. Gram boyalı preparatta maya hücrelerinin kalitatif değerlendirilmesi.

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

sonra MALDI-TOF MS (Vitek-MS, bioMérieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapıldı.

Lizis filtrasyon; 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 vorteks-lendi. Elde edilen lizat oda ısısında 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 bekledi. Daha sonra çalışmada matriks çözeltisi olarak 1µL VITEK MS-CHCA kullanıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Plak cihaz içine yerleştirilerek işlem başlatıldı⁽⁴⁾.

MALDI-TOF MS sonuçları Vitek-MS v.3.2 veri tabanında %99.0 güvenilirlikte otomatik olarak hesaplandı. Tanımlanamayan suşlar (güvenilirlik: <%60) tekrarlandı⁽³⁾. Üst üste en az 2 kez aynı sonuç elde edildikten sonra rapor edildi.

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

BULGULAR

Dalmau Plak ve MALDI-TOF MS Yöntemi ile İdentifikasyon Sonuçları: Standart tanımlama yöntemleri (Dalmau Plak tekniği ve MALDI TOF MS) ile elde edilen sonuçlar birbiri ile %100 uyumlu olup, 100 *Candida* suşunun 37'si *C. albicans*, 23'ü *Candida*

Tablo 2. Dalmau, MALDI-TOF MS ve LF-MS ile tanımlanan *Candida* türleri.

<i>Candida</i> türleri	Dalmau Plak	MALDI TOF- MS	LF- MS	LF-MS ile "spektrum yetersizliği"
<i>Candida albicans</i>	37	37	26	11
<i>Candida parapsilosis</i>	23	23	9	14
<i>Candida tropicalis</i>	17	17	13	4
<i>Candida glabrata</i>	9	9	9	0
<i>Candida kefy</i>	6	6	2	4
<i>Candida dubliniensis</i>	3	3	3	0
<i>Candida guilliermondii</i>	3	3	0	3
<i>Candida krusei</i>	2	2	2	0
Toplam	100	100	64	36

parapsilosis, 17'si *Candida tropicalis*, dokuzu *Candida glabrata*, altısı *Candida kefy*, üçü *Candida guilliermondii*, üçü *Candida dubliniensis* ve ikisi *Candida krusei*, olarak tanımlanmıştır (Tablo 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. kefy*, 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 (Tablo 2). Spektrum yetersizliği *C. parapsilosis* (14/23; %60.8), *C. albicans* (11/37; %29.7), *C. tropicalis* (4/17; %23.5), *C. kefy* (4/6; %66.6) ve *C. guilliermondii* (3/3; %100) kökenlerinde görülmüştür.

Gram boyama sonuçlarının LF- MS ile karşılaştırılması: Gram boyalı preparatlarda gözlenen kalitatif maya yoğunluğu ile LF-MS yönteminin tanımlaması arasındaki ilişki Tablo 3'de gösterilmiştir.

Spektrum yetersizliği gözlenen 36 suşun ürettiği kan kültür şişelerinde, Gram boyamada maya hücreleri yoğunluğunun düşük olduğu (0-1) gözlenmiştir. 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.

Tablo 3. LF- MS sonuçlarının Previ Color Gram boyama sonuçlarıyla karşılaştırılması.

Tanımlanan türler		Kalitatif Gram Boyama					Toplam
		0	1	2	3	4	
<i>Candida albicans</i>	LF-MS	3	12	5	4	2	26
	SY	1	9	0	0	1	11
<i>Candida parapsilosis</i>	LF-MS	1	4	0	4	0	9
	SY	3	8	3	0	0	14
<i>Candida tropicalis</i>	LF-MS	3	6	1	1	2	13
	SY	3	0	1	0	0	4
<i>Candida glabrata</i>	LF-MS	1	2	5	0	1	9
	SY	0	0	0	0	0	0
<i>Candida kefyr</i>	LF-MS	0	2	0	0	0	2
	SY	3	1	0	0	0	4
<i>Candida krusei</i>	LF-MS	0	0	0	0	2	2
	SY	0	0	0	0	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	LF-MS	0	0	0	0	0	0
	SY	2	1	0	0	0	3
<i>Candida dubliniensis</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

TARTIŞMA

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.

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 kısalt-

mamaktadır. 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⁽⁵⁾.

Klinik laboratuvarlarında maya izolatlarını tanımlamak için kullanılan konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında, MALDI-TOF MS ile çok daha kısa sürede, daha az malzeme ile maliyet etkin ve giderek büyüyen veri tabanı sayesinde daha doğru tanımlamalar yapılabileceği öne sürülmektedir^(6,7). 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 *Candida famata* ile *Candida guilliermondii* gibi türlerin bu yöntemle doğru bir şekilde tanımlandığı bildirilmiştir⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Kim ve ark.⁽¹¹⁾, 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.⁽¹⁰⁾, 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.⁽¹²⁾, 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 sonucu ile bazı izolatlar (%36) tanımlanamamıştır. Bunun aksine, prosedürlere uyularak yapılan klasik MALDI-TOF MS yönteminde türler mükemmel düzeyde tanımlanmıştır.

Van Belkum ve ark.⁽¹³⁾, MALDI-TOF MS yönteminin, klinik örnekler üzerinde doğrudan gerçekleştirilemeyeceğini klinik örnekte bulunan az sayıda mikroorganizmanın, doğru spektrum elde edilmesine izin vermeyeceğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte, kan kültüründe zenginleştirmeden sonra tanımlamanın mümkün hale gelebileceği, konsantrasyon ve ekstraksiyon için lizis filtrasyon ya da santrifüjle muamele edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, üreme sinyali gösteren şişelerden öncelikli olarak Gram boyalı preparat hazırlanmış ve maya hücreleri görülenlerden yoğunlaştırma amacıyla direkt LF yapılarak MALDI-TOF MS yöntemi uygulanmıştır. Her şişeden yapılan Gram boyalı preparatlarda maya yoğunluğunun farklı olması nedeni ile 0 ile +4 arasında kalitatif skorlama yapılmıştır. Van Belkum ve ark.'ları⁽¹³⁾ tarafından ileri sürülen maya yoğunluğunun tanımlamada

önemli olduğu düşüncesi bu çalışmada da gözlenmiştir. Gram boyamada skorun "0" olduğu şişelerdeki izolatlarda doğru tanımlama oranı %40 iken, maya yoğunluğunun artması ile oran %100'lere yükselmiştir.

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında kan kültüründe üreme sinyali veren şişelerin kanlı agar, EMB agar ve SDA besiyerlerindeki subkültürlerinde maya üreyen kolonilerden, çalışmalarda da önerildiği gibi birden fazla yöntemle (Dalmau yöntemi ve MALDI-TOFMS) tür tanımlaması yapılmaktadır⁽⁶⁾. 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⁽¹⁴⁾. 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.

İlk kez Fothergill A ve ark.⁽⁴⁾ 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^(7,15-17).

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. Kalan 36 köken "spektrum yetersizliği" nedeniyle tanımlanamamıştır (Tablo 2). Fothergill A ve ark.'nın⁽⁴⁾ çalışmalarında belirtilen tür düzeyinde tanımlama başarısı bu çalışma ile benzer olup; bu çalışmada da "tanımlanamayan" türler bulunmaktadır. "Spektrum yetersizliği" olarak tanımlama dışı kalan suşlar, aslında veri tabanında yer alan türlerden oluşmaktadır. Bu değişken, analiz dışı bırakıldığında 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.

Lizis filtrasyon sonrası MALDI-TOF MS yöntemi 100 izolata uygulanmış, 36'sı spektrum yetersizliğinden kaynaklanan identifikasyon problemi nedeniyle hiç tanımlanamamıştır (Tablo 2). 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 (Tablo 3), 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 kullanılabilirliği düşünülmüştür. Ancak maya yoğunluğu az ise, LF-MS yönteminin başarısız olabileceği akıldan tutulmalı ve uygulanmamalıdır. MALDI-TOF MS yönteminde tanımlamanın doğru yapılabilmesi, yeterli spekt-

rumun 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.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik Kurulu tarafından (26.08.2021 tarih ve 21-8T/33 No.) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Ege University, Medical Faculty, Ethics Committee (08.26.2021, 21-8T/33).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors

KAYNAKLAR

1. Groll AH. Invasive opportunistic mycoses: clinical trials review, 2007-2008. *Curr Infect Dis Rep.* 2008;10(6): 451-3. <https://doi.org/10.1007/s11908-008-0073-0>
2. Yeğenoğlu Y. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi.* 2011;70(1):23-8.
3. Lee H-S, Shin JH, Choi MJ, 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(3):223-30. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.3.223>
4. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YFW. 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;51(3): 805-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.02326-12>
5. Durán-Valle MT, Sanz-Rodríguez N, Muñoz-Paraiso C,

- Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL. Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32 C. *Sabouraudia*. 2014;52(4):342-9. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt036>
6. Keceli SA, Dundar D, Tamer GS. Comparison of Vitek Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry versus conventional methods in *Candida* identification. *Mycopathologia*. 2016;181(1-2):67-73. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9944-8>
 7. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, 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(1):176-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.05742-11>
 8. Carolis ED, Hensgens LA, Vella A, et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Sabouraudia*. 2014;52(2):123-30. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt009>
 9. Ece G, Samlioglu P, Akkoçlu 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):617-20. <https://doi.org/10.7150/ijms.4707>
 10. Pinto A, Halliday C, Zahra M, 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):e25712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025712>
 11. Kim SH, Shin JH, Mok JH, et al. Misidentification of *Candida guilliermondii* as *C. famata* among strains isolated from blood cultures by the VITEK 2 system. *BioMed Res Int*. 2014;2014:250408. <https://doi.org/10.1155/2014/250408>
 12. Van Herendael B, Bruynseels P, Bensaid M, et al. 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. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1383-y>
 13. Van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier J-P, 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): 475-83. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.475>
 14. Mancini N, De Carolis E, Infurnari 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;51(7):2453-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00841-13>
 15. 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;9:1097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01097>
 16. Iidevich 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(12):e114834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114834>
 17. 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;9:2400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02400>