

Trichosporon Türlerinin Tanımlanmasında Matris Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Sisteminin API ID 32C ve VITEK 2 ile Karşılaştırılması[§]

Süleyman PELİT*, Gonca ERKÖSE GENÇ*, Ayşe BARIŞ**, Zayre ERTURAN*

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

**Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

ÖZ

Amaç: Trichosporon türleri doğada geniş dağılım gösterir; insanlarda ise deri ve mukozada kolonize olabilen mayalardır. Trichosporon türlerinin neden olduğu invazif enfeksiyonlar yaygın olmamakla birlikte, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla fatal seyirlidir. Trichosporon türlerinin doğru identifikasyonu zor olmasına karşın uygun tedavi yaklaşımları açısından önemlidir. Fenotipik ve genotipik yöntemlere alternatif olarak Matris aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) hızlı ve doğru bir identifikasyon yöntemi olarak gündeme gelmektedir. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen Trichosporon cinsi mayaların MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile tür düzeyinde tanımlanması ve bu sonuçların rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların identifikasyonunda sıkça kullanılan API ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yoğun bakım hastalarından izole edilen ve konvansiyonel yöntemlerle cins düzeyinde tanımlanan toplam 45 Trichosporon suşu, MALDI-TOF MS, API ID 32C kiti ve VITEK 2 otomatize sistemi ile tanımlanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Her üç sistem ile yapılan tanımlama tüm izolatlar için %100 uyumlu bulunmuştur. İzolatların 44 (%97.8)'ü *T. asahii*, biri (%2.2) ise *T. mucoides* olarak tanımlanmıştır.

Sonuç: Buna göre MALDI-TOF MS yöntemi invazif enfeksiyonlarda en sık rastlanan Trichosporon türü olan *T. asahii*'nin tanımlanmasında API ID 32C ve VITEK 2 ile aynı doğrulukta ancak daha hızlı ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir, ayrıca düşük maliyetli olması bir alternatif oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: Trichosporon, identifikasyon, MALDI TOF MS

ABSTRACT

Comparison of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight (MALDI-TOF MS) with API ID 32C and VITEK 2 For the Identification of Trichosporon Species

Objective: Trichosporon species have a widespread distribution in the nature and human skin and mucosa can be colonized with Trichosporon species. Invasive infections caused by Trichosporon species are uncommon but frequently fatal in immunosuppressive patients. Correct identification of Trichosporon species is challenging but important for appropriate treatment approaches. As an alternative to phenotypic and genome-based identification techniques, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) is emerging as a rapid and accurate identification method. In this study we aimed to evaluate MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for the identification of Trichosporon species and compare it with frequently used API ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Material and Methods: A total of 45 Trichosporon strains that were isolated from intensive care unit patients and identified by conventional methods at the genus level, were identified by MALDI TOF MS, API ID 32C and VITEK 2 and the results were compared.

Results: All systems yielded fully (100%) concordant results for all of the isolates. Forty-four (97.8%) of the 45 isolates were identified as *T. asahii* and one (2.2%) as *T. mucoides*.

Conclusion: The MALDI TOF MS method was found to be an easily applicable alternative tool for identifying *T. asahii* strain of Trichosporon spp. with the comparable diagnostic accuracy as API ID 32 C, and VITEK 2 but with low costs, and faster yield.

Keywords: Trichosporon, identification, MALDI TOF MS

Alındığı tarih: 24.04.2017

Kabul tarihi: 07.07.2017

Yazışma adresi: Süleyman Pelit, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Halaskargazi Cad. Etfal Sok. Şişli / İstanbul

Tel: (0212) 373 50 00

e-posta: s_pelit@hotmail.com

GİRİŞ

İnvazif mantar enfeksiyonları, hematolojik maligniteli ve derin nötropenik hastalar başta olmak üzere, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde morbidite ve mortalitenin önemli nedenleri arasındadır. Bu hastalarda görülen mantar enfeksiyonlarından sıklıkla *Candida* ve *Aspergillus* türleri sorumlu olsa da, günümüzde *Candida* cinsi mayalarla benzer klinik tablolara yol açan, fakat tedavi seçenekleri daha sınırlı olan ender görülen diğer maya mantarlarının insidansları dikkat çekici şekilde artmaktadır^(1,2).

Trichosporon türleri doğada geniş bir dağılıma sahip olup, toprak, su ve bitkiler üzerinde bulunabilen ve insanlarda deriyi ve mukozaları kolonize edebilen mayalardır. Önceleri yüzeysel enfeksiyon etkeni olarak bilinen bu mikroorganizmalar, günümüzde invazif enfeksiyonlardan giderek artan sıklıkta izole edilmektedir. *Trichosporon* cinsi mayalarla meydana gelen sistemik enfeksiyonların neredeyse tümü *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon mucoides* ve *Trichosporon ovoides* türleri ile oluşmaktadır⁽³⁾.

Klinik örneklerden izole edilen *Trichosporon* cinsi mayaların identifikasyonunda zorluklar yaşanmakla birlikte, antifungal duyarlılık profili nedeniyle hastaların uygun tedaviye yönlendirilebilmeleri için bu mayaların doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanması önem taşımaktadır⁽⁴⁾. Bu mantarlar rutin klinik laboratuvarlarda konvansiyonel olarak makroskobik, mikroskobik ve bazı biyokimyasal özelliklerine göre cins düzeyinde tanımlanabilmektedir^(3,5). *Trichosporon* türlerinin identifikasyonunda API ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), API 20C AUX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve RapID Yeast Plus (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, GA, ABD) gibi asimilasyon temelli hazır ticari kitler ile VITEK 2 (bioMérieux,

Marcy l'Etoile, Fransa) gibi otomatize sistemleri kullanılabilmeyle birlikte, bu yöntemlerin veritabanlarında sınırlı sayıda *Trichosporon* türünün yer alması kısıtlayıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır⁽⁶⁾. Mayaların tanımlanmasında çeşitli moleküler yöntemler de kullanılabilmeyle birlikte, bu yöntemler her rutin laboratuvar için ekonomik açıdan uygun değildir⁽⁴⁾.

Son yıllardaki gelişmelerle çeşitli patojenlerin kütle spektrometre temelli tekniklerle tanımlanması, mikrobiyoloji laboratuvarında identifikasyonda kullanılabilecek yeni bir seçenek sunmaktadır. Mikroorganizmaların spesifik protein yapılarının iyonize olarak uçuş zamanına göre protein parmak izinin oluşturulması prensibine dayanan matris aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemi ile patojen mikroorganizmalar hızlı bir şekilde tanımlanabilmektedir. Bu yöntemde mikroorganizmaların protein parmak izleri, sistemin veritabanındaki referanslarla karşılaştırılmaktadır⁽⁴⁾.

Günümüzde Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya), Saramis (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve Andromas (Andromas, Paris, Fransa) olmak üzere ticari olarak dört farklı sistem bulunmaktadır⁽⁷⁾.

Bu araştırmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Trichosporon* cinsi mayaların MALDI-TOF MS yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanması ve bu sonuçların rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mayaların identifikasyonunda sıkça kullanılan API ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Mayıs 2014-Haziran 2015 tarihleri

arasında, 26-95 yaş aralığındaki, yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören 45 hastanın klinik örneklerinden (43'ü idrar ve ikisi kan) izole edilen 45 maya suşu dâhil edilmiştir. İdrar örnekleri rutin prosedür olarak üriner sistem patojenlerinin izolasyonunda kullanılan kromojenik agara (RTA, Türkiye) ekilmiştir. Kan örnekleri ise BACTEC 9120 (Becton-Dickinson, Sparks, MD, ABD) otomatize kültür sisteminde inkübe edilerek, pozitif sinyal veren şişelerden Gram boyama yapılarak, %5 koyun kanlı agar (RTA, Türkiye), çikolata agara (RTA, Türkiye) ve Sabouraud dekstroz agara (SDA) (RTA, Türkiye) ekim yapılmıştır. Maya suşlarının konvansiyonel olarak tanımlanmasında %1 Tween 80 ilave edilmiş mısır unlu jelozda 25°C'de 72 saatte mikroskopik morfolojisi, üre agarda üreaz enzimi varlığı incelenmiştir. Üreaz testinde negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak *Proteus mirabilis* ATCC 12453 kullanılmıştır⁽⁵⁾.

Suşlar, VITEK 2 YST Compact Otomatize Sistem maya tanımlama kartı (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve API ID 32C maya tanımlama kiti (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ile üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılarak tanımlama yapılmıştır⁽⁶⁾.

MALDI-TOF MS Sistemi: Bu işlem için tüm izolatların SDA'daki 24 saatlik taze pasajları kullanılmıştır. Mayalardan protein ekstraksiyonu işlemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda etanol formik asit yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrası oluşan süpernatant kısmından 1 µl alınarak MALDI plağı üzerindeki iki ayrı noktaya konulmuştur. Bu noktalardaki sıvı kuruduktan hemen sonra örneğe 1 µl matris solüsyonu (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) ilave edilmiş ve yine kuruması beklenmiştir. Ardından plak MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazına konularak Flex Analysis bilgisayar programı ile kütle spektrometreleri elde edilmiştir. Elde edilen protein

profilleri Bruker BioTyper v3.1 (Bruker Daltonics, Almanya) yazılımı ve rutin veri tabanını kullanarak incelenmiş ve maya suşları tanımlanmıştır. Elde edilen skor değerleri 2,0'ın üzerinde ise sonuç tür düzeyinde anlamlı ve 1,7-2,0 arasında ise cins düzeyinde güvenilir olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin 1,7'nin altında olması ise güvenilir olmayan identifikasyon olarak kabul edilmiştir⁽⁶⁾.

BULGULAR

Çalışmada incelenen 45 maya izolatının tümünün SDA'da 37°C'de 24-48 saatte ürettiği, %1 Tween 80 ilaveli mısır unlu jelozda hif, blastospor ve artrospor oluşturduğu ve hepsinin üreaz testinin pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre tüm suşlar *Trichosporon* cinsi olarak tanımlanmıştır.

Mayaların tanımlanmasında kullanılan VITEK 2, API ID 32C ve MALDI-TOF MS sistemlerinin her üçü ile %100 uyumlu olarak suşların 44 (%97.8)'ü *T. asahii*, 1'i (%2.2) ise *T. mucoides* olarak tanımlanmıştır. VITEK 2 ve API ID 32C ile elde edilen identifikasyon sonuçlarının geçerlilik değeri %99'un üzerinde olmuştur. Bruker MALDI-TOF MS ile tanımlanan tüm mikroorganizmaların skor değerleri 2.0'ın üzerinde olarak saptandığından, bu sonuçlar tür düzeyinde anlamlı olarak kabul edilmiştir. İdentifikasyon API ID 32C ile 48 saatte, VITEK 2 ile 24 saatte ve MALDI-TOF MS ile 25-30 dakikada gerçekleştirilmiştir.

TARTIŞMA

Trichosporon cinsi mayalar günümüzde yaşamı tehdit eden fırsatçı patojenler olarak karşımıza çıkmakta, özellikle hematolojik maligniteli ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda sıklığı giderek artan oranlarda invazif enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu cinse ait mayaların hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması hastaların uygun

tedaviye başlayabilmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin efektif olarak uygulanabilmesi açısından oldukça önemlidir⁽⁸⁾. *Trichosporon* cinsi mayaların tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel yöntemler zaman alıcıdır ve tür düzeyinde identifikasyon için yetersizdir. Bu mayalar moleküler yöntemler ile tür düzeyinde güvenilir bir şekilde tanımlanabilmekle birlikte, pahalı, zaman alıcı deneyim gerektirmelerinden dolayı her laboratuvarında uygulanamamaktadır. Bu nedenle çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarı mayaların tanımlanması için API ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), Phoenix 100 (Becton-Dickinson, Sparks, MD, ABD) gibi hızlı ticari tanımlama sistemleri kullanmaktadır⁽⁴⁾.

Guo ve ark.'nın⁽⁹⁾ altı farklı *Trichosporon* türünden oluşan 45 klinik izolatu dâhil ettikleri çalışmalarında, moleküler yöntem referans alındığında VITEK 2 Compact YST sistemi ile 36 *T. asahii* izolatu'nun %75'i doğru tanımlanırken, yedi suş tanımlanamamış ve iki suş da yanlış tanımlanmıştır. Veri tabanında bulunmayan türlerden oluşan dokuz izolatu'nun beşi tanımlanamazken, iki suş *Cryptococcus laurentii*, iki suş da *T. asahii* olarak yanlış tanımlanmıştır.

Mayaların tanımlanmasında kullanılan API ID 32C, AuxaColor ve VITEK 2 ticari testlerinin değerlendirildiği bir metaanaliz çalışmasında, 26 literatür incelenmiş, sonuçlara göre VITEK 2 sistemi ile 61 *T. asahii* suşunun %85'inin, 21 *T. mucoides* suşunun tamamının; API ID 32C sistemi ile ise 11 *Trichosporon beigelii* suşunun %90'ının doğru tanımlandığı belirtilmiştir⁽¹⁰⁾.

Son dönemlerde MALDI-TOF MS, rutin mikrobiyoloji laboratuvarında mikroorganizmaların tanımlanmasında güvenilir sonuç vermesi, hızlı ve kolay uygulanması ve maliyetinin düşük olması nedeniyle umut veren bir sistem olarak ortaya çıkmıştır⁽⁷⁾.

Chao ve ark.⁽¹⁾ sekizi *Trichosporon* cinsi içinde bulunan toplam 200 maya suşunun tanımlanmasında iki MALDI-TOF MS sisteminin (Bruker Biotyper ve VITEK MS) sonuçlarını DNA sekans analizi, Phoenix 100 ve VITEK 2 sistemlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmışlardır. *Trichosporon* cinsinde yer alan altı *T. asahii*, bir *T. mucoides* ve bir *Trichosporon insectorum*'dan oluşan sekiz suşun MALDI-TOF MS sistemleri ile tanımlanmasında, Bruker Biotyper ile altısı (%75), VITEK MS ile beşi (%62.5) doğru olarak tanımlanmıştır. Bruker Biotyper sistemi *T. asahii* suşlarından birini tanımlayamamış, *T. insectorum* suşunu ise *C. albicans* olarak tanımlamıştır. VITEK MS ise *T. asahii* suşlarından birini *T. asteroides* olarak, *T. mucoides* suşunu ise *Geotrichum klebahnii* olarak tanımlamıştır.

Durán-Valle ve ark.⁽¹¹⁾ üçü *T. mucoides* olan 175 maya suşunun tanımlanmasında VITEK MS ile API ID 32C'yi karşılaştırdıkları çalışmalarında, VITEK MS'in API ID 32C'den daha güvenilir olduğu ve yalnızca birkaç dakika içerisinde sonuç alınabildiğini belirtmişlerdir. Her üç *T. mucoides* suşu VITEK MS ile doğru olarak tanımlanmıştır.

Dhiman ve ark.⁽²⁾ üçer *T. asahii* ve *T. mucoides* suşu dâhil olmak üzere toplam 261 maya suşunu inceledikleri çalışmalarında, *Trichosporon* türlerinin tamamını Bruker MALDI-TOF MS sistemi ile doğru olarak tanımlamışlardır.

Almeida Junior ve ark.⁽¹²⁾ 16'sı *Trichosporon* türü ve 71'i *T. asahii* olan toplam 93 maya suşunu Bruker Biotyper sistemi ile tanımlamış, sonuçları IGS1 (intergenic spacer 1) geni sekans analizi verileri ile karşılaştırmışlardır. Bruker Biotyper 3.0 veritabanı ile suşların cins düzeyinde %85.1'ini ve tür düzeyinde ise yalnızca %31.3'ünü doğru olarak tanımlamışlardır. *Trichosporon dermatitis* suşlarının tamamı, bu tür veritabanında bulunmadığı için *T. mucoides* olarak tanımlanırken, 21 adet *T. asahii* suşunun 11'i

(%52.4) *T. cutaneum* olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar bu veritabanının geliştirilmeye gereksinimi olduğu sonucuna varmışlardır.

Trichosporon cinsi için en kapsamlı araştırmayı yapan Kolecka ve ark.⁽⁴⁾ 14 farklı *Trichosporon* türüne ait toplam 45 kültür koleksiyonu suşunun 41'ini (%91.1) ve klinik örneklerden izole edilmiş, 10 farklı *Trichosporon* türüne ait toplam 102 suşun 101'ini (%99.0) Bruker MALDI-TOF MS sistemi ile doğru olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada, ilk olarak 2009 yılında tanımlanan birtür olan *Trichosporon mycotoxinivorans*'ın da doğru olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, yazarlar, birbirine çok yakın türler olan *T. inkin/T. ovooides*, *Trichosporon japonicum/T. asteroides* ve *T. dermatis/T. mucoides*'in doğru tanımlanamadığını vurgulamışlardır.

Bu çalışmada ise, MALDI-TOF MS sistemi olan Bruker Biotyper ile 45 suşun 44'ü (%97.8) *T. asahii*, biri (%2.2) ise *T. mucoides* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçların, API ID 32C ve VITEK 2 ile elde edilen sonuçlarla %100 uyumlu olduğu görülmüştür.

Mayaların MALDI-TOF MS ile identifikasyonu öncesinde yaklaşık 25 dakika süren bir ekstraksiyon aşaması gerçekleştirilmesi gerekli olmakla birlikte, bazı araştırmacılar buna alternatif olan ve daha kısa süren yöntemler geliştirdiklerini bildirmişlerdir⁽¹³⁻¹⁹⁾.

Trichosporon asahii Türkiye dâhil birçok ülkede en sık izole edilen *Trichosporon* türüdür⁽²⁰⁻²³⁾. Bu türün birçok antifungale karşı yüksek MİK değerlerine sahip olması özellikle daha sık izole edildiği immunsupresif ve yenidoğan hasta grubunda sorun oluşturmaktadır⁽²⁰⁾. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, bu türün amfoterisin B, flukonazol ve 5-flusitozine düşük duyarlı olduğu ve vorikonazolün en aktif antifungal olduğu belirtilmiştir⁽²³⁾. Mantar tedavisinde sıklıkla kullanılan bu antifungallere karşı duyarlılığının

düşük olması, bu türün hızlı ve doğru olarak tanımlanmasının tedaviyi yönlendirmede önem taşıdığını göstermektedir⁽²¹⁻²³⁾.

MALDI-TOF MS, laboratuvarlarda kullanılan API ID 32C ve VITEK 2'ye göre daha hızlı, aynı gün içinde sonuç alınabilen bir sistemdir. Cihaz ve bilgisayar yazılımı için başlangıçta yüksek bir fiyat ödense de, sarf malzeme ve reaktif gereksinimi ihmal edilebilecek düzeydedir. Ayrıca aynı cihazla Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, *Nocardia* ve *Actinomyces* spp. ve mikobakteriler gibi birçok mikroorganizma tanımlanabilmektedir^(2,13,24).

Bu çalışmanın bazı eksik yönleri bulunmaktadır. Çalışmamızda, bir tek *T. mucoides* suşunun haricinde *T. asahii* dışındaki türler yer almadığından, diğer *Trichosporon* türlerinde MALDI-TOF MS ile diğer iki sistemin uyumu değerlendirilememiştir. Yine, incelenen 45 suşun kullanılan yöntemlerle elde edilen tür tanımları moleküler yöntemlerle doğrulanamamıştır. Bu çalışma izolat sayısı yönünden yurdumuzda ve dünyada yapılmış olan az sayıdaki çalışmadan biridir.

Sonuç olarak, MALDI-TOF MS yöntemi *T. asahii*'nin tanımlanmasında VITEK 2 ve API ID 32C ile %100 oranında uyumlu olan, hızlı sonuç alınan, düşük maliyetli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer türlerin bu konuda değerlendirilebilmesi için ek çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. **Chao QT, Lee TF, Teng SH, et al.** Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PLoS One* 2014; 9:e109376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109376>
2. **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; 49:1614-6.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02381-10>
3. **Howell SA, Hazen KC.** *Candida, Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington DC: ASM Press, 2011:1793-1821.
<https://doi.org/10.1128/9781555816728.ch115>
 4. **Kolecka A, Khayhan K, Groenewald M, et al.** Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2491-500.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00470-13>
 5. **Larone DH.** *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 5th ed. Washington DC: ASM Press, 2011.
 6. **Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM.** Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24:682-700.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11>
 7. **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; 51:2453-7.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00841-13>
 8. **Marklein G, Josten M, Klanke U, et al.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2912-7.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00389-09>
 9. **Guo LN, Xiao M, Kong F, et al.** Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3805-11.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00937-11>
 10. **Posteraro B, Efremov L, Leoncini E, et al.** 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; 53:2439-50.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00802-15>
 11. **Durán-Valle MT, Sanz-Rodríguez N, Mu-oz-Paraíso C, Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL.** Identification of clinical yeasts by VITEK MS system compared with API ID 32C. *Med Mycol* 2014; 52:342-9.
<https://doi.org/10.1093/mmy/myt036>
 12. **de Almeida Júnior JN, Figueiredo DSY, Toubas D, et al.** Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:784-90.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12502>
 13. **Buchan BW, Ledebouer NA.** Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1359-66.
<https://doi.org/10.1128/JCM.03105-12>
 14. **Cheng JWS, Tang YE, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP.** Modified protocol for yeast identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Am J Microbiol Res* 2013; 4:71-3.
<https://doi.org/10.12691/ajmr-1-4-2>
 15. **Cassagne C, Cella AL, Suchon P, Normand AC, Ranque S, Piarroux R.** Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol* 2013; 51:371-7.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2012.720720>
 16. **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:e25712.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025712>
 17. **Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Gräser Y, Elsner P, Hipler UC.** Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses* 2012; 55:276-80.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02086.x>
 18. **Theel ES, Schmitt BH, Hall L, et al.** Formic acid-based direct, on-plate testing of yeasts and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3093-5.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01045-12>
 19. **Van Herendael BH, 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; 31:841-8.
<https://doi.org/10.1007/s10096-011-1383-y>
 20. **De Almeida Júnior JN, Hennequin C.** Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. *Front Microbiol* 2016; 7:1629.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01629>
 21. **Wolf DG, Falk R, Hacham M, et al.** Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4420-5.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4420-4425.2001>
 22. **Hazirolan G, Canton E, Sahin S, Arikan-Akdagli S.** Head-to-head Comparison of inhibitory and fungicidal

activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:4841-7.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00850-13>

- 23. Kalkancı A, Sugita T, Arikan S, et al.** Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. *Med Mycol* 2010;

48:141-6.

<https://doi.org/10.3109/13693780902977984>

- 24. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR.** Evaluation of matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3482-6.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00687-09>