

Kandidemilerin Hızlı Tanı ve İdentifikasyonunda Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS Yöntemi ve Germ Tüp Testinin Kıyaslanması

Comparison of MALDI-TOF MS Method Using Samples From Blood Culture Bottles and Germ Tube Test in Rapid Detection and Identification of Candidemia

Kerem Yılmaz*¹, Nurten Altanlar**²

*Soma Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Manisa, Türkiye

**Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Atf/Cite as: Yılmaz K, Altanlar N. Kandidemilerin hızlı tanı ve identifikasyonunda direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS yöntemi ve germ tüp testinin kıyaslanması. Turk Mikrobiyol Cemiyet Derg. 2021;51(3):288-94.

Öz

Amaç: Kandidemi, insidansı gün geçtikçe yükselen, mortalitesi oldukça yüksek bir enfeksiyondür. Kandidemi kliniğinden en sık sorumlu mikroorganizma sıklıkla *Candida albicans*'tır fakat diğer türler de önem taşımaktadır. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarında erken tanıyı sağlamak ve mortalite oranını düşürmek için kısa sürede ve güvenilir sonuç veren yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmamızın amacı, çok daha kısa sürede etkenin identifikasyonunda otomatize/manuel birkaç yöntemin değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasıdır.

Yöntem: Araştırmada, pozitif kan kültürlerinden izole edilen 50 *Candida* suşunun kan kültür sisteminde pozitifleşme süre (KKP) ortalamaları türlere göre saptanmıştır. Tüm örnekler direkt kan kültür şişesinden germ tüp testi ve MALDI-TOF MS ile identifikasyon, saf kültür eldesi sonrası kültürden germ tüp testi ve MALDI-TOF MS ile identifikasyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Kan kültür sisteminde pozitifleşme süre ortalamaları olarak türlere göre; *C. albicans* için 36.1, *Candida parapsilosis* için 39.4, *Candida tropicalis* için 17.7 s, *Candida glabrata* için 50.5 saat olarak belirlenmiştir. Germ tüp testi ile direkt kan kültür şişesinden ve saf kültür eldesi sonrası yapılan işlemlerde 49 kökünde (%98) uyum bulunmuştur. Elli adet *Candida* türünün MALDI-TOF yöntemi ile direkt kan kültür şişesinden ve saf kültür eldesi sonrası yapılan identifikasyon işlemlerinde 37 kökünde (%74) uyum bulunmuştur.

Sonuç: KKP süreleri, kandidemili hastalar arasında nihai tür tanımlanmasından önce tür tahminine yönelik bir ipucu olabilir. Direkt GTT, *albicans/non-albicans Candida* türleri ayrımında kültürden bir gün önce tespitine yüksek doğruluk oranıyla olanak sağlamaktadır. Otuz yedi *Candida* türünde standart yöntemlerle %100 uyumlu olacak şekilde tanımlama yapılmış ve bu yöntemin saf kültür eldesi gerektiren MALDI-TOF MS yöntemine göre en az 48 saat avantaj sağladığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Candida spp*, germ tüp, kandidemi, matrix-yardımlı laser desorpsiyon-ionizasyon kütle spektrometrisi

ABSTRACT

Objective: Candidemia is an infection with a high mortality and increasing incidence day by day. *Candida albicans* is the most common microorganism responsible for clinical picture of candidemia but other species are also important. Therefore, in order to establish early diagnosis in fungal infections and decrease the mortality rate, methods which provide reliable results in a short time are needed. The objective of this study is to evaluate and compare several automated/manual methods in identification of the causative agent in a much shorter time.

Method: In the study, average time to become positive in blood culture system for 50 *Candida* strains which were isolated from positive blood culture samples sent to Sakarya University Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory between March 2018 and March 2019 was determined according to the species. All samples were subjected to germ tube test and identification with MALDI-TOF MS directly from blood culture bottles, and after obtaining pure culture, germ tube test and MALDI-TOF MS method were used for identification. The data obtained were comparatively evaluated.

Results: In the study, average time intervals elapsed to become positive in blood culture system in terms of species were determined to be 36.1 h for *C. albicans*, 39.4 h for *Candida parapsilosis*, 17.7 h for *Candida tropicalis* and 50.5 h for *Candida glabrata*. In the processes performed after germ tube test from direct blood culture bottle and obtaining pure culture, compatibility was found in 49 (98%) strains. Identification results according to MALDI TOF MS method from direct blood culture. In the identification processes performed after MALDI-TOF method from direct blood culture bottle and obtaining pure culture, compatibility was found in 37 (74%) strains.

Conclusion: Time to get positive in blood culture may be a clue for prediction of species before final species identification among patients with candidemia. Direct GTT enables the detection of *albicans/non-albicans Candida* species the day before the culture with high accuracy. Thirty-seven *Candida* species were identified to be 100% compatible with standard methods, and this method was shown to provide at least 48 hours advantage over the MALDI-TOF MS method, that requires pure culture yield.

Keywords: *Candida spp*, Candidemia, germ tube, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry

Alındığı tarih / Received:

05.02.2021 / 05. February.2021

Kabul tarihi / Accepted:

28.04.2021 / 28. April.2021

Yayın tarihi / Publication date:

07.09.2021 / 07. September.2021

ORCID Kaydı

K. Yılmaz 0000-0002-1626-5172

N. Altanlar 0000-0003-2977-2269

✉ keremyilmaz1@hotmail.com

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY)

GİRİŞ

Kandidemi, bir veya birden fazla kan kültüründen *Candida* türlerinin üretilmesi ile tanı konulan klinik bir tablodur. Kandidemi, organ tutulumlarıyla ilerleyen invaziv kandidoza neden olması ve ciddi mortalite ile seyretmesi nedeniyle önemlidir. Tanıdaki her bir saatlik gecikme kandidemi ilişkili mortaliteyi %1.6 oranında arttırmaktadır. Ayrıca antifungal tedavi almayan ya da geç başlanan hastalarda, tedavi alanlara kıyasla ölüm oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır^(1,2).

Candida albicans kandidemi etkenleri arasında günümüzde hâlâ birinci sıradadır. Fakat yüzdesel olarak non-*albicans Candida*'ların görülme sıklığı tüm dünyada artış eğilimindedir⁽³⁾. Kandidemi etkenlerinin dağılımında *C. albicans*'tan sonra, Amerika'da *Candida glabrata*, Avrupa ve Türkiye'de *Candida parapsilosis* ve *Candida tropicalis*, izole edilme sıklığı artan non-*albicans Candida* türleridir⁽⁴⁾.

Non-*albicans Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların artışı ve antifungal ilaçlara direncin ortaya çıkması, kandidemi tedavisinde de zorluklar getirmektedir⁽⁵⁾. Non-*albicans Candida* türleri arasında *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'in, flukonazole ve azollere daha az duyarlı olduğu görülmektedir. *C. glabrata*'nın özellikle flukonazol olmak üzere antifungal ilaçlara karşı daha dirençli olduğu bildirilmektedir. *Candida krusei*, flukonazole karşı intrinsek dirençli olup, bu etkenlerin oluşturduğu klinik tablolar, eski antifungal tedavi ve hastanın nötropenik oluşu ile ilişkilendirilmektedir. Tüm kandidemi olgularının %1-2'sinden sorumlu tutulan *Candida lusitanae*'nin azollere duyarlı fakat amfoterisin B'ye karşı yüksek bir dirence sahip olduğu bildirilmektedir⁽⁶⁾.

Bu nedenle kandidemi enfeksiyonlarında erken tanıyı sağlamak ve mortalite oranını düşürmek için kısa sürede ve güvenilir sonuç veren yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu araştırmanın amacı, maya mantarlarının hızlı tanısında, direkt kan kültürü şişesinden ve pasaj kültüründen, germ tüp ile MALDI-

TOF MS yöntemlerinin performanslarının değerlendirilerek karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnekler: Mart 2018-Mart 2019 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen örnekler araştırmada kullanılmıştır. Kan kültüründe pozitif üreme sinyali olan şişelerden hazırlanan Gram boyalı preparatlarda maya hücresi saptanan, randomize, farklı servis, yaş ve cinsiyetteki hastalara ait 50 örnek çalışmaya alınmıştır. Sonraki işlemler için maya hücresi görülen şişlerden Sabouraud'un dekstrozu agar (SDA) besiyerine pasaj yapılmıştır. Ayrıca *Candida* türlerine ait 4 farklı standart suş (*C. albicans* 90028, *C. parapsilosis* 90018, *C. glabrata* 2001, *C. tropicalis* 750) germ tüp ve identifikasyon basamaklarını doğrulama amacıyla kullanılmıştır. Çalışmamızın etik kurul onayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih:28.02.2019 ve Karar No: 02-135-19).

Kan Kültür Sistemi: Çalışmamızda incelenen hastalardan elde edilen kan kültürü örnekleri Bact-Alert 3D (bioMérieux, Fransa) cihazında inkübe edilmiştir.

Candida Türlerinin Kan Kültür Sisteminde Pozitifleşme Sürelerinin Saptanması: Kan kültür cihazında pozitif sinyal verme süreleri otomatik olarak kaydedilmektedir. Bu süreler daha sonra kullanılmak üzere not edilmiştir.

Germ Tüp Testi: SDA besiyerinden üretilmiş kolonilerden germ tüp testi yapılmıştır⁽⁷⁾. Pozitif olan suşlar *C. albicans* olabileceği düşünülerek not edilmiştir (*Candida dubliniensis*, *Candida africana* türleri de germ tüp oluşturabileceği için identifikasyon işlemi sonrasında değerlendirilmiştir.).

Direkt Kan Kültür Şişesinden Germ Tüp Testi: Kan kültür şişesinden alınan 10 ml aspirat steril 15 ml'lik bir polipropilen tüpe aktarılmıştır. Santrifüj edildikten (4.000 g'de 10 dakika) sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibindeki çökeltiden 0.5 ml numune alınarak ve 0.5 ml insan plazması içeren bir

tüpe inoküle edilerek maya süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bir damla süspansiyon germ tüp oluşumunun varlığı açısından X40 büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmiştir.

MALDI TOF MS Yöntemi: MALDI-TOF MS yönteminde VITEK MS (bioMérieux, Fransa) sistemi kullanılmıştır. Önceden SDA'ya taze pasajı hazırlanan kolonilerden örnek tablasına çok az miktarda aktarılmıştır ve hücre duvar yapısını parçalamak ve protein ekstraksiyonunu elde etmek için tablaya 1 µl VITEK- MS-FA (Formik asit) eklenmiş ve çok az beklenilmiştir. Sonrasında yine tablaya matriks çözeltisi 1µl VITEK MS-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklenerek fiksasyonu ve kristalizasyonu sağlandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Plak cihaza yerleştirilerek identifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Analizler üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Analiz sonucu alınan spektrum sonuçları güncel IVD (*in vitro* diagnostik) VITEK MS V2.0 yazılımı kullanılarak sonuçlandırılmıştır.

Tanımlama analizinden önce MALDI-TOF kütle spektrumlarında gösterdiği karakteristik protein yapısı iyi bilinen, yeni pasaj alınmış *Escherichia coli* ATCC 8739 standart kökeniyle cihazda otomatize bir şekilde kalibrasyon, kontrol işlemleri yapılmıştır.

Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI TOF MS Yöntemi: Pozitif kan kültür şişelerinden, üretici firma yönergelerince uygun yöntemlerle hazırlanmış solüsyonlar ve kimyasallar ile hazırlık işlemi uygulandıktan sonra MALDI-TOF MS (Vitek-MS, BioMérieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapılmıştır.

Direkt kan kültür şişesinden identifikasyon işleminde, pozitif kan kültür şişesinden 8 ml örnek alınarak 10.000 rpm'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj işlemi yapılmıştır. İşlem sonrası süpernatant kısmı dökülerek dipteki pellet 2 defa 1 ml saf su ile yıkanmıştır. İkinci kez santrifüj işlemi yinelenerek pellet, %0.1 Tween 80 (1 ml) içinde süspanse edilmiş ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü bir santrifüjden sonra, pellet 2 defa 1

ml saf su ile yıkanmış tekrar santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet 300 µl saf su ve 900 µl kesin etanol içinde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyon yine santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet içine 30 µl %70 formik asit ve 30 µl saf asetronitril eklenerek karışım iyice vortekslenmiştir. Hazırlık aşamasının son safhasında karışıma 14.000 rpm, 2 dakika, oda sıcaklığında santrifüj işlemi yapılmıştır. Her örnek için elde edilen süpernatantlar ayrılıp çalışılıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır⁽⁸⁾.

Elde edilen her örnekten 1 µl, MALDI-TOF MS tanımlama tablasına aktarılmıştır. Konulan yaklaşık 1 damla örnek kuruduktan sonra üzerine 1 µl VITEK MS-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında kurumaya sağlanmıştır. Daha sonra plak cihaz içine yerleştirilerek identifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Tüm *Candida* izolatları için kan kültür sisteminde ortalama pozitifleşme süresi 25.9 saat olarak belirlenmiştir. *C. albicans* için 36.1 saat, *C. parapsilosis* tür kompleksi için 39.4 saat, *C. tropicalis* için 17.7 saat ve *C. glabrata* için 50.5 saat kan kültür sisteminde ortalama pozitifleşme süreleri belirlenmiştir. *C. glabrata* için kan kültür sisteminde pozitifleşme süresi diğer üç türe göre daha uzun olarak saptanmıştır. Bunun aksine, *C. tropicalis*'in kan kültür sisteminde pozitifleşme süresi ise diğer üç türden daha kısa olarak saptanmıştır.

Direkt kan kültür şişesinden 50 *Candida* türü için yapılan germ tüp testi sonuçları SDA kültürü sonrası yapılan germ tüp testi ile 49/50 (%98) oranında tutarlı olarak saptanmıştır. Sadece 1 *C. albicans* kökeninde direkt kan kültür şişesinden yapılan germ tüp testi hatalı negatif olarak saptanmıştır.

Direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS ile 50 *Candida* türünün 37'si (%74) kültürden yapılan MALDI-TOF MS ile tutarlı olarak tanımlanmıştır. Bu 37 tür, kültür sonrası identifiye edilen 50 tür ile kendi arasında tür bazında kıyaslandığında, bunların 20'si

Tablo 1. Direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS ile identifikasyon ve klasik kültür sonrası MALDI-TOF MS ile identifikasyon sonuçları.

	Örnek Sayısı	Direkt kan kültüründen MS ile identifikasyon	Klasik kültür bazlı MS ile identifikasyon
<i>Candida albicans</i>	25	20	25
<i>Candida parapsilosis</i>	12	8	12
<i>Candida tropicalis</i>	10	7	10
<i>Candida glabrata</i>	3	2	3
Toplam	50	37	50

(20/25; %80) *C. albicans*, 8'i (8/12; %66.6) *C. parapsilosis* tür kompleksi, 7'si (7/10; %70) *C. tropicalis*, 2'si (2/3; %66.6) *C. glabrata*, olarak tanımlanmıştır. İdentifiye edilemeyen 13 *Candida* türü spektrum yetersizliği nedeni ile tanımlanamamıştır. Bu şişelerden ikinci kez çalışıldığında da benzer sonuçlar alınmıştır. Kültürden ve direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS ile identifikasyon sonuçları Tablo 1'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Spektrum yetersizliği nedeni ile identifiye edilemeyen türler; *C. albicans* (5/25; %20.0), *C. parapsilosis* tür kompleksi (4/12; %33.3), *C. tropicalis* (3/10; %30.0) ve *C. glabrata* (1/3; %33.3) şeklindedir.

Spektrum yetersizliği gözlenen 13 suşun üretildiği kan kültür şişelerinde, Gram boyamada maya hücreleri yoğunluğunun diğer şişelere oranla göreceli olarak düşük olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda mantar enfeksiyonlarının özellikle yatan hastalarda ciddi oranda artış göstermekte olduğu bildirilmektedir⁽⁹⁾. Kandidemiye bağlı mortalite oranı diğer mikrobiyal etkenlerin neden olduğu sepsise bağlı mortaliteden çok daha yüksek olup, bu hastalarda mortalite oranları %5 ile %71 arasında değişebilmektedir⁽¹⁰⁻¹²⁾. Bu ciddi oranlar 24 saat içinde uygun tedavi başlanmadığında daha da artarak %97.6'lara kadar çıkmaktadır^(8,13).

Küresel boyutta invaziv kandidoz ve kandidemilerin hemen hemen tamamından sorumlu olan türler bizim çalışmamızda da üzerinde durduğumuz; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* şeklindedir. *C. albicans*, kandidemilerde izole edilen *Candida* türleri arasında günümüzde hala en yaygın saptanan etkidir. Fakat non-*albicans*

Candida türlerinin izolasyon sıklığı da giderek artmaktadır⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Kan kültür cihazında pozitiflik (KKP) süresi klinik alanda daha az tartışılmıştır, ancak *Candida* türlerinin saptanması için ortalama sürenin türler arasında değiştiği genel olarak kabul edilmektedir⁽¹⁷⁾.

2012'de yapılan 171 kandidemi olgusu ile ortalama KKP süreleri incelenmiş ve *C. albicans* için 34.2 saat, *C. parapsilosis* için 38.9 saat, *C. tropicalis* için 16.9 saat ve *C. glabrata* için 56.5 saat olarak saptanmıştır. Ayrıca *C. glabrata* için KKP süresi anlamlı olarak diğerlerinden daha yüksek bulunmuştur⁽¹⁸⁾.

2015 yılında Taiwan'da 410 kandidemi tanılı hastanın ortalama KKP sürelerinin incelendiği bir çalışmada, *C. albicans* için 58.4 saat, *C. parapsilosis* için 71.3 saat, *C. tropicalis* için 50.6 saat ve *C. glabrata* için 90.7 saat olarak saptanmıştır⁽¹⁷⁾.

Bizim çalışmamızda da literatürlerdeki çalışmalar ile benzer olarak ve *C. tropicalis* için en düşük KKP, *C. glabrata* için en yüksek KKP süreleri saptanmıştır.

Birçok konvansiyonel yöntem arasında *C. albicans*'ın diğer türlerden ayrımında laboratuvarlarda en sıklıkla tercih edilen yöntem germ tüp testidir (GTT)⁽¹⁹⁾. GTT oldukça güvenilir bir testtir. Fakat aynı zamanda GTT için kan kültürlerinde üreme saptandıktan sonra katı besiyerine yapılan pasaj sonrası üretilen kolonilerden test gerçekleştirilebilmektedir. Bu yüzden, sonuçlandırma için ekstradan 24 saat daha süreye gereksinim duyulmaktadır. Bu zaman kaybının ekarte edilebilmesi ve *C. albicans*'ın hızlı tanımlanabilmesi için, maya olduğu saptanan kan kültür şişelerinden direkt GTT uygulanması üzerine çalışmalar yapılmıştır⁽¹⁹⁻²¹⁾.

2013 yılında yapılan bir araştırmada, direkt GTT ile SDA'dan pasaj sonrasında gerçekleştirilen GTT arasında %100 uyum saptanmıştır. Ayrıca her izolat API 20 C AUX kullanımı ile identifiye edilerek araştırma kontrol edilmiştir⁽²²⁾.

2016 yılında ülkemizde maya pozitif olduğu saptanan kan kültür şişelerinden yapılan bir araştırmada, direkt şişeden GTT pozitif bulunan 80 kan örneğinin tamamında *C. albicans/C. dubliniensis* varlığı belirlenmiş, yanlış pozitiflik saptanmamıştır. Direkt şişeden GTT negatif bulunan 92 örnekten 11'inde (%12) yanlış negatiflik saptanarak *C. albicans/C. dubliniensis* saptanmıştır⁽¹⁹⁾.

Çalışmamızda da *C. albicans* olduğunu sonrasında saptamış olduğumuz 25 örnekten 24'ü direkt GTT pozitif olarak saptanmıştır. Bir adet *C. albicans* örneği yanlış negatif olarak değerlendirilmiştir. Klasik GTT ile 25 *C. albicans* türünün hepsi pozitif olarak saptanmıştır. Non-*albicans Candida* türlerinin ise tamamı her iki GTT ile de negatif olarak, doğru ve %100 uyumlu olarak saptanmıştır. Tüm izolatlar değerlendirildiğinde 49/50 %98 gibi yüksek bir doğruluk oranıyla her iki test irdelenmiştir.

Direkt GTT, *albicans/non-albicans Candida* türleri ayrımının kültürden bir gün önce tespitine olanak sağlayan, ucuz, özel ekipman gerektirmeyen ve en önemlisi konvansiyonel tanı testleri ile yüksek uyum oranı gösteren bir testtir. Çok düşük oranda da olsa yanlış negatif sonuçlar alınabileceği unutulmamalıdır.

Konvansiyonel yöntemlerle identifikasyona göre çok daha avantajlı olan MALDI-TOF MS ile identifikasyon özellikle sepsis/fungemi gibi dakikaların bile önemi olduğu durumlar için kullanılmak üzere geliştirilmiş ve kültürde üretme basamağı atlanarak direkt kan kültür şişesinden patojenlerin identifikasyonunu sağlayan adaptasyonlar yapılmıştır⁽²³⁾.

2012 yılında yalnızca *Candida* türlerinin direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS ile identifikasyonunun hedeflendiği, özel yıkama ve santrifüj protokollerinin ilave edildiği bir araştırmada tanımlama sonuçları *C. albicans*'ın %95.9'u (187/195) ve non-

albicans Candida türlerinin %86.5'i (128/148) için geleneksel kültüre dayalı yöntemin sonuçlarıyla uyumlu olarak saptanmıştır⁽⁸⁾.

2016 yılında 405 adet pozitif kan kültür şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile bakteri ve mantarları başarıyla tanımlamışlardır. Tür veya cins düzeyinde 365 patojen doğru olarak tanımlanmıştır⁽²⁴⁾.

Bizim çalışmamızda da direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS ile 50 *Candida* türünün 37'si (%74) kültürden yapılan MALDI TOF MS ile tutarlı ve literatürlerle paralel olarak tanımlanmıştır. Bu 37 tür, kültür sonrası identifiye edilen 50 tür ile kendi arasında tür bazında kıyaslandığında; bunların 20'si (20/25; %80) *C. albicans*, 8'i (8/12; %66.6) *C. parapsilosis*, 7'si (7/10; %70) *C. tropicalis*, 2'si (2/3; %66,6) *C. glabrata* olarak saptanmıştır. Direkt klinik örnekten MALDI-TOF MS ile identifikasyon için farklı protokoller ve farklı doğru identifikasyon oranları mevcuttur. Saptanan bu oranlar ön işlemler ile daha saf ve daha konsantre patojenin elde edilmesine ve kandaki mantar yüküne bağlanmaktadır⁽⁸⁾. Çalışmamızda identifiye edilemeyen 13 *Candida* türü spektrum yetersizliği nedeni ile tanımlanamamıştır. Bu 13 hastanın kanındaki fungal yükün daha düşük olduğu bu nedenle saflaştırma ve konsantre etme aşamasında yeterli maya komponenti eldesi sağlanamadığı düşünülmektedir. Ayrıca klasik kültür bazlı MALDI-TOF MS ile identifikasyona göre yaklaşık 48 saat süre avantajı sağladığı belirlenmiştir.

Uygun ampirik antifungal tedavinin başlanamaması veya tedavide uygun dozun kullanılmaması nozokomiyal kaynaklı invaziv mantar enfeksiyonlarında mortalite oranlarında artışa neden olan etkenlerdir⁽²⁵⁾. Doğru antifungal seçimi için tanıda kullanılan konvansiyonel yöntemler gerek hız gerekse duyarlılık ve özgüllük açısından kısıtlılıklara sahiptir. Konvansiyonel yöntemlerde karşılaşılan bu güçlüklerin giderilmesi için daha hassas, daha spesifik olan ve en önemlisi daha kısa inkübasyon süresi sağlayan alternatif testlere gereksinim doğmuştur. Bu doğrultuda MALDI-TOF MS klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında referans aracı olarak ortaya çıkmış, hem hız hem de doğruluk açısından eski tanımlama yöntemlerini aşmıştır⁽²⁶⁾.

Tür çeşitliliğinin az olması, çalışmaya dâhil edilen örnek sayısının az olması araştırmamızın kısıtlamalarındandı.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 28.01.2019 ve Karar No. 02-135-19).

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

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Ankara University Ethics Committee (01.28.2019-02-135-19).

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

KAYNAKLAR

1. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al. 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;23(1):317-22. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1103-y>
2. Seyedmousavi S, İlikit M, Durdu M, et al. *Candida* ve Kandidoz: Epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2015;45(1):1-11. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2015.001>
3. Tümbay T. *Candida* türleri, In: Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş, Günel M, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö. (eds.). Güneş kitabevi, Ankara. 1999:1081-6.
4. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;13(10):95-105. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>
5. Pereira GH, Müller PR, Szeszs 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. <https://doi.org/10.3109/1369378090358012>
6. Cruciani M, Serpelloni G. Management of *Candida* infections in the adult intensive care unit. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(2):175-91. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.2.175>
7. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical Importance. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). 9th ed. ASM Press, Washington. 2010:1762-88.
8. 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>
9. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit rev Microbiol.* 2010; 36(1):1-53. <https://doi.org/10.3109/10408410903241444>
10. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Clinical Mycology. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (eds). Elsevier Health Sciences. 2009:197-229
11. Sofair AN, Lyon GM, Huie-White S, et al. Epidemiology of community-onset candidemia in Connecticut and Maryland. *Clin Infect Dis.* 2006;43(1):32-9. <https://doi.org/10.1086/504807>
12. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis.* 2005;41(9):1232-9. <https://doi.org/10.1086/496922>
13. 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(12):e114834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114834>
14. Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol.* 2012;30(3):270-8. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.99484>
15. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl 4):5-24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x>
16. Rodloff C, Koch D, Schaumann R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res.* 2011;16(4):187-95. <https://doi.org/10.1186/2047-783x-16-4-187>
17. Chen LY, Yang SP, Chen TL, et al. Clinical significance of time to positivity for yeast in candidemia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48(4):425-30. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.11.002>
18. Lai CC, Wang CY, Liu WL, Huang YT, Hsueh PR. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt

- 5):701-4.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.038166-0>
19. Doğan Ö, Gülmez D, Arıkan Akdağlı S. Fungemi olgularında hızlı bir ön tanımlama testi: Pozitif kan kültürü şişesinden yapılan doğrudan germ tüp (çimlenme borusu) testinin değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 2016;30(3):102-8.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2016.102>
20. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2008;46(10):3508-9.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01113-08>
21. Terlecka JA, Du Cros PA, Orla Morrissey C, Spelman D. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-albicans species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles. Mycoses. 2007;50(1):48-51.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01307.x>
22. Saad U, Siddiqui S, Jamil N, Jamil S, Hafiz S. Detection of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. Int J Pathol. 2013;11(2):54-7.
23. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. J Food Drug Anal. 2019;27(2):404-14.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
24. Chien JY, Lee TF, Du SH, et al. Applicability of an in-house saponin-based extraction method in Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of bacterial and fungal species in positively flagged blood cultures. Front Microbiol. 2016; 7: 1432.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01432>
25. Milkulska M, Del Bono V, Rotto S, Viscoli C. Occurrence presentation and treatment of candidemia. Expert Rev Clin Immunol. 2012;8(8):755-65.
<https://doi.org/10.1586/eci.12.52>
26. Arca-Suárez J, Galán-Sánchez F, Marin-Casanova P, Rodríguez-Iglesias MA. Direct identification of microorganisms from thioglycolate broth by MALDI-TOF MS. PLoS One. 2017;12(9): e0185229.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185229>