



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

ALBİCANS DIŞI *CANDİDA* TÜRLERİNİN İSİMLENDİRİLMESİNDE İKİ FARKLI MALDİ-TOF MS YÖNTEMİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Leyla Teke

İSTANBUL/2020





T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE ETFAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

Dr. Leyla Teke

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu Bayraktar

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2020

TEŞEKKÜR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında geçirdiğim uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen eğitim sorumlumuz değerli hocam Doç. Dr. Banu Bayraktar'a teşekkürlerimi sunarım. Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana destek veren değerli hocam Doç. Dr. Elif Aktaş Sepetçi'ye teşekkür ederim. Tezimin çalışma ve yazım aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Ayşe Barış'a teşekkür ederim. Tezimin çalışma aşamasındaki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Deniz Turan, Özge Kurt ve Dr. Ahmet Suel'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince yapmış oldukları katkılarından dolayı Uzm. Dr. Emin Bulut'a, Uzm. Dr. Süleyman Pelit'e ve Uzm. Dr. Murat Öcal'a, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma, laboratuvarımızın tüm teknisyenlerine, personellerine, sekreterlerine ve hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini hissettiğim, her zaman yanımda olan tüm aileme çok teşekkür ederim**.**

Leyla Teke

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i

SİMGELER VE KISALTMALAR v

TABLOLAR vi

ŞEKİLLER vii

ÖZET viii

ABSTRACT x

GİRİŞ ve AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

MANTARLARIN SINIFLANDIRILMALARI VE İSİMLENDİRİLMELERİ 3

MAYALARIN EPİDEMİYOLOJİSİ VE KLİNİK ÖNEMİ 11

MAYALARIN LABORATUVAR TANISI 11

Örneklerin Direkt İncelenmesi 11

Kültür…… 12

Hif-Blastospor-Klamidospor Yapımı 12

Kromojenik Besiyerinde Üreme 13

Biyokimyasal Testler 13

Kütle Spektrometrisine Dayanan Yöntemler (MALDI-TOF MS) 14

Moleküler Yöntemler 15

GEREÇ VE YÖNTEMLER 16

ÇALIŞMAYA ALINAN İZOLATLAR 16

TİCARİ OTOMATiZE SİSTEMLER İLE İDENTİFİKASYON 17

MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) Yöntemi İle İdentifikasyon 17

VITEK MS (VITEK MS; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) Yöntemi İle İdentifikasyon…… 20

BD Phoenix Yeast ID Panel Sistemi (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, ABD) İle İdentifikasyon 21

DNA DİZİ ANALİZİ İLE İDENTİFİKASYON 22

İSTATİSTİKSEL ANALİZ 25

BULGULAR 26

İZOLAT ÖZELLİKLERİ 26

MALDI BIOTYPER İLE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI 27

VITEK MS İLE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI 30

DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI 33

MALDI BIOTYPER İLE VITEK MS KARŞILAŞTIRMALI SONUÇLARI 34

İKİ MALDI-TOF CİHAZININ PRATİKLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI 34

BD PHOENİX İLE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI 37

CİHAZLARIN İSTATİKSEL OLARAK UYUMLARI 42

TARTIŞMA 43

SONUÇLAR 53

KAYNAKLAR 54

ÖZGEÇMİŞ 63

EKLER 65

SİMGELER VE KISALTMALAR

° C: Santigrat Derece

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

BD : Becton, Dickinson and Company

BMX : bioMérieux

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CHCA: 4-hydroxy-α-cyanocinnamic asit

DNA : Deoksiribonükleik asit

ITS : Internal transcribed spacer

IVD : Invitro diagnostik

MALDI-TOF MS : Matriks assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry

MİK : Minimal inhibitör konsantrasyon

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

RUO : Research use only

SDA : Sabouraud dextrose agar

TABLOLAR

Tablo 1. Kullanılan qPZR programı 24
Tablo 2. Örneklere göre türlerin sayısal dağılımı (n) 26
Tablo 3. MALDI Biotyper çalışma sonuçları 28
Tablo 4. İzolatların MALDI Biotyper IVD ve MALDI Biotyper RUO kütüphanelerinde tanımlanma skorlarına göre sonuç verme oranları 30
Tablo 5. VITEK MS çalışma sonuçları 32
Tablo 6. VITEK MS'te iki farklı besiyerinden çalışılan izolatların sonuçları 33
Tablo 7: ITS Dizi analizi sonuçları 33
Tablo 8. Dizi analizi ve iki MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanan türlerin karşılaştırmalı sonuçları 34
Tablo 9. MALDI Biotyper ve VITEK MS'in pratiklik ve diğer teknik özelliklerinin karşılaştırılması 35
Tablo 10. İzolatların MALDI-TOF MS sistemi tanımlama sonuçlarının türlere göre dağılımı 36
Tablo 11. BD Phoenix ilk çalışma sonuçlarının MALDI-TOF MS sonuçlarına göre dağılımı 38
Tablo 12. BD Phoenix ikinci çalışma sonuçlarının MALDI-TOF MS sonuçlarına göre dağılımı 39
Tablo 13. Birinci çalışmada tanımlanamayan 38 izolatın birinci ve ikinci çalışma sonuçları 40
Tablo 14. BD Phoenix sisteminin türlere göre uyumluluk oranları 41
Tablo 15. Cihazların istatiksel olarak uyumları 42

ŞEKİLLER

Şekil 1. VITEK MS'ten elde edilmiş bir spektrum örneği 15
Şekil 2. MALDI Biotyper hedef plak 19
Şekil 3. MALDI Biotyper cihazı 19
Şekil 4. VITEK MS slaytı 20
Şekil 5. VITEK MS cihazı 21
Şekil 6. BD Phoenix cihazı 22
Şekil 7. MALDI Biotyper'da elde edilmiş *Candida inconspicua* spektrumu 29
Şekil 8. MALDI Biotyper'da elde edilmiş *Trichosporon asahii* spektrumu.. 29
Şekil 9. VITEK MS IVD'de elde edilmiş *Candida inconspicua* spektrumu . 31
Şekil 10. VITEK MS IVD'de elde edilmiş *Trichosporon asahii* spektrumu. 32

***Albicans* dışı *Candida* Türlerinin İsimlendirilmesinde İki Farklı MALDİ-TOF MS Yönteminin Karşılaştırılması**

ÖZET

Amaç: İnvaziv mantar enfeksiyonlarında, etkenin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanıp uygun antifungal tedaviye erken başlanması kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, *albicans* dışı *Candida* türleri ve nadir maya türlerinin hızlı tanımlanmasında iki MALDI-TOF MS sisteminin karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca BD Phoenix sisteminin performansı değerlendirildi.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada 23 maya türünü içeren 157 maya izolatı, MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), VITEK MS (bioMérieux) ve BD Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson) ile tanımlandı. İzolatlar için, iki MALDI-TOF MS sistemi ile (kabul edilebilir güven değerleri ve skorlarında) aynı isimlendirme sonuçları alınması doğru tanımlama olarak kabul edildi. Tanımlanamayan izolatlarda ve iki MALDI-TOF MS sisteminden alınan uyumsuz sonuçlarda ITS dizi analizi gerçekleştirildi.

Bulgular: MALDI Biotyper ile 155 (%98.7) izolat tanımlandı, iki (%1.3) izolat tanımlanamadı. VITEK MS ile 153 (%97.5) izolat tanımlandı, dört izolat (%2.5) tanımlanamadı. İki MALDI-TOF MS sistemi ile tanımlanan mayalar arasında 152 uyumlu ve beş uyumsuz sonuç alındı. Uyumsuz izolatlar ITS dizi analizi ile doğrulandı. VITEK MS sisteminin ITS dizi analizi sonrası *Meyerozyma caribbica* izolatını yanlış olarak tanımladığı saptandı ve böylece VITEK MS IVD ile doğru

tanımlanmış izolat sayısı 152 (%96.8) oldu. BD Phoenix sistemi ile nihai tür tanımına göre; 126 (%80.3) izolat doğru, 22 (%14) izolat yanlış olarak tanımlandı ve dokuz (%5.7) izolat da tanımlanamadı. Mayaların tanımlanmasında MALDI Biotyper, VITEK MS ve BD Phoenix'in doğru tanımlama oranları sırasıyla % 98.7, % 96.8 ve % 80.3 olarak bulundu.

Sonuç: Her iki MALDI-TOF MS sistemi de klinik maya izolatlarının tanımlanmasında hızlı ve yüksek performans gösterdi. *Meyerozyma caribbica*, MALDI-TOF MS sistemleri ile ya *Candida guillermondii* (yakın ilişkili türler) olarak yanlış tanımlandı ya da tanımlanamadı. Her iki MALDI-TOF MS sistemi de, klinik olarak yaygın olmayan maya türlerinin tanımlanmasında konvansiyonel otomatize tanımlama sistemine göre daha üstündür. MALDI-TOF MS sistemleriyle hızlı ve doğru tanımlama yapılarak, uygun tedaviye kısa sürede başlanması klinik başarının artmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *albicans* dışı *Candida*, MALDI-TOF MS, maya tanımlanması

Comparative Evaluation of the MALDI Biotyper and VITEK MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Systems for identification of Non-*albicans Candida*

ABSTRACT

Aim: Tailoring appropriate antifungal treatment based on rapid and accurate diagnosis is critically important for invasive and disseminated fungal infections. The present work aims to compare two MALDI-TOF MS systems for the rapid identification of non-*albicans Candida* and uncommon yeast species. Also the performance of the BD Phoenix system was evaluated.

Materials and Methods: This study includes 157 isolates representing 23 yeast species. All isolates were identified by MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), VITEK MS (bioMérieux) and BD Phoenix automated system (Becton Dickinson) An isolate was considered correctly identified if two MALDI-TOF MS systems yielded the same results with acceptable confidence values or scores. ITS sequencing was performed on isolates with "no identification" and discordant results by two MALDI-TOF MS systems.

Results: MALDI Biotyper identified 155 (98.7%) isolates, two (1.3%) isolates could not be identified. VITEK MS identified 153 (97.5 %) isolates, four (2.5%) isolates could not be identified. Two MALDI-TOF MS systems gave 152 concordant and five discrepant results which were further clarified by ITS sequencing.ITS sequencing revealed that VITEK MS IVD misidentified one *Meyerozyma caribbica* isolate so correctly identified isolate number dropped to

152 (96.8%). BD Phoenix automated system correctly identified 126 (80.3%) isolates with 22 (14%) misidentifications and nine (5.7%) no-identification. The sensitivities of MALDI Biotyper, VITEK MS and BD Phoenix in the identification of yeasts were 98.7%, 96.8%, and 80.3% respectively.

Conclusions: Both of the MALDI-TOF MS performed well in terms of rapid and accurate identification of clinical yeast isolates. *Meyerozyma caribbica* isolates either identified as *Candida guillermondii* (closely related species) or not identified at all by MALDI-TOF MS systems. Both of MALDI-TOF MS was superior to a conventional automated identification system for identification of clinically relevant uncommon yeast species and can improve the diagnosis of infection as well as the patient management.

Keywords: MALDI-TOF MS, non-*albicans Candida*, yeast identification

GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda tıp alanında; kemik iliği ve organ nakillerinin yaygınlaşması, yeni ve gelişmiş tedavi olanaklarıyla kanser ve yoğun bakım hastalarının yaşam sürelerinin uzaması, geniş spektrumlu antibiyotik, kortikosteroid, anti-kanser, immün baskılayıcı ilaç ve damar içi kateterlerin sık kullanılması gibi uygulamalar mantar enfeksiyonlarında artışa neden olmuş, saprofit olarak değerlendirilen birçok mantar türü fırsatçı etken olarak karşımıza çıkmıştır [1-3]. Fırsatçı etkenlerin başında *Candida albicans* gelmekle birlikte diğer *Candida* türleri ve *Cryptococcus, Trichosporon, Geotrichum, Rhodotorula, Saccharomyces* gibi diğer maya mantarlarıyla oluşan enfeksiyonların sıklığı da artmıştır [4]. Ayrıca bazı *Candida* türlerinde ve nadir mayalarda yüksek oranda antifungal direnç vardır. *Candida krusei* flukanazole, *Candida lusitaniae* amfoterisin B'ye ve bazı *Candida glabrata* ve *Candida krusei* izolatları da amfoterisin B'ye dirençlidir [5,6]. Son dönemde tanımlanan ve salgınlar yapabilen *Candida auris* türünde çoklu antifungal direnci görülmesi önemli bir sorundur. Etkenin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması, zamanında ve etkili antifungal tedaviye başlanabilmesi için önemlidir. Bu hızlı tanımlama terapötik seçeneklerin spektrumunu daraltacak, toksik antifungal ajanlarla tedaviyi azaltabilecek, sonuçları iyileştirecek ve maliyetleri azaltacaktır [2, 7].

Mayaların konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması 2-5 gün sürebilmektedir. Bu yöntemler ile bazı maya türleri tanımlanamazken, bazı türler yanlış tanımlanabilmektedir [2]. Maya tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen DNA dizi analizi yöntemi; iyi laboratuvar donanımı ve deneyimi gerektirmesi, yüksek maliyetli olması ve birçok mikrobiyoloji laboratuvarında yapılamaması nedeniyle rutin tanı için uygulanması zor olan bir yöntemdir [2]. Konvansiyonel yöntemler ve DNA dizi analizindeki bu kısıtlılıklarından dolayı, laboratuvarların birçoğu biyokimyasal analize dayanan ticari tanımlama sistemlerine başvurmaktadır [8]. Ayrıca yakın zamanda, mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında yeni bir yöntem olan Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) sistemleri kullanılarak mayalar hızlı ve kolay bir şekilde

tanımlanabilmektedir [9]. Bu sistemlerin maya identifikasyonunda kullanımına dair sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Mantarların tür tanımında; konvansiyonel temelli otomatize sistemler ile MALDI-TOF MS sistemlerinin sonuçlarının ve yaygın kullanılan MALDI-TOF MS sistemlerinin performanslarının karşılaştırılması önemlidir.

Bu çalışmada; klinik örneklerden izole edilen *albicans* dışı *Candida* türlerinin tanımlanmasında iki farklı MALDI-TOF MS sistemi [MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ve VITEK MS (VITEK MS; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)] ve BD Phoenix Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, ABD) sisteminin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

MANTARLARIN SINIFLANDIRILMALARI VE İSİMLENDİRİLMELERİ

Mantarlar ökaryotik, heterotrofik çok hücreli organizmalardır. Doğadaki tüm mantarlar Mycetae aleminde yer almakta olup, aşağıda gösterildiği şekilde Alexopulos tarafından 1979 yılında sınıflandırılmıştır. [10].

Alem : *Mycetae* (mantarlar)

Divizyon : *Mycota*

Altdivizyon-1 : *Myxomycota* (hücre duvarı olmayanlar)

Altdivizyon-2 : *Eumycota* (hücre duvarı olanlar)

Sınıf-1 : *Mastigomycotina* (zoosporlu olanlar)

Sınıf-2 : *Zygomycotina* (*Zygomycetes*)

Sınıf-3 : *Ascomycotina* (*Ascomycetes*)

Sınıf-4 : *Basidiomycotina* (*Basidiomycetes*)

Sınıf-5 : *Deuteromycotina* (*Deuteromycetes*, fungi imperfecti)

Candida albicans en sık izole edilen *Candida* türü olmasına rağmen, son zamanlarda *albicans* dışı *Candida* türlerinin sıklığında artış olduğu bildirilmektedir [11].

MAYA TÜRLERİ

Candida türleri; *Ascomycota, Saccharomycetales, Debaryomycetaceae* ailesindendir [12].

Candida parapsilosis Kompleks

Candida parapsilosis kompleks; su, toprak ve bitkilerden sıklıkla izole edilen, çevrede yaygın olarak bulunan mantarlardır [13]. Bu maya türleri deride, tırnaklarda (sağlık çalışanlarının elleri dahil) ve hastanede kullanılan tıbbi malzemelerin ve protezlerin yüzeylerinde sıkça bulunur. *Candida parapsilosis*

kompleks, fungemi, vajinit, endokardit, endoftalmit, septik artrit ve peritonit gibi enfeksiyonlara neden olabilen, sıklığı giderek artan fungal patojen olarak değerlendirilmektedir [14]. *Candida parapsilosis* suşları önceleri üç farklı gruba ayrılırken (Grup I, II, III), son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu grupların farklı türler olduğu tespit edilmiştir. Bu türler; *Candida parapsilosis* sensu stricto (Grup I), *Candida orthopsilosis* (Grup II) ve *Candida metapsilosis* (Grup III) olarak adlandırılmıştır. Bu türler fenotipik yöntemler ve biyokimyasal testlerle birbirinden ayırt edilemez [15]. *Candida parapsilosis* kompleks içindeki türlerin ayrımı için özgül olan sekonder alkol dehidrogenaz proteinini kodlayan genin (SADH) restriksiyon polimorfizm analizi uygulanmaktadır [16]. *Candida parapsilosis* kompleks türlerinin coğrafi dağılımları, antifungallere karşı in vitro duyarlılıkları, virülans faktörleri ve biyofilm oluşturma özellikleri farklılıklar gösterir. *Candida parapsilosis* sensu stricto'da ekinokandinlere karşı yüksek MİK değerleri saptanmaktadır ve azollere karşı duyarlılıkları düşük bulunmaktadır. *Candida. orthopsilosis* ve *Candida metapsilosis* türleri ise *Candida parapsilosis* sensu stricto'ya göre ekinokandinlere karşı daha duyarlı görünmektedir [17,18].

Candida tropicalis

Candida albicans'tan sonra gelen ikinci en virülan *Candida* türü olarak kabul edilmektedir. Güçlü biyofilmi, bukkal epitel ve endotel hücrelerine yapışma faktörü, proteinazlar, fosfolipazlar ve hemolizinler gibi çok çeşitli virülans faktörleri üretir [19]. *Candida tropicalis*'in, kan ve idrar kültürlerinden izole edilen *albicans* dışı *Candida'*lar arasında üçüncü sıklıkta (En sık *Candida parapsilosis*, ikinci *Candida glabrata*) izole edilmektedir [20]. *Candida tropicalis* antifungal ajanlara duyarlı görülmektedir ve intrinsik direnci nadir görülür veya yoktur [21].

***Candida glabrata* Kompleks**

Candida glabrata kompleks içinde yer alan bir mayadır [12]. Ağız boşluğunda ve sağlıklı bireylerin çoğunun gastrointestinal sistem gibi mukozal yüzeylerinde kolonize olabilmektedir [22]. *Candida glabrata*, psödohif oluşturmadığı için *Torulopsis* cinsinde sınıflandırılmış ve sinonim adlandırmasıdır.

Candida glabrata'nın polimorfik büyümesinin olmadığı ve sadece blastokonidya olarak büyüdüğü gösterildi [23]. *Candida albicans'*a karşı başarılı olduğu kanıtlanan azol grubu antifungal ajanların, *Candida glabrata*'ya karşı yetersiz kaldığı gösterilmiştir [24].

Candida lusitaniae

Telemorfu *Clavispora lusitaniae*'dır [25]. *Candida lusitaniae*, gastrointestinal sistem mikrobiyotasının üyesidir [26]. *Candida lusitaniae*, diğer mantar patojenlerinden farklı olarak, sık kullanılan antifungal ajan olan amfoterisin B'ye direnç geliştiren bir patojendir [5]. *Candida lusitaniae* enfeksiyonu flukonazol keşfinden önce ölümcül olarak kabul edilirdi. Günümüzde *Candida lusitaniae* tedavisinde flukonazol kullanılmaktadır [7].

Candida kefyr

Candida kefyr insan mikrobiyotasının bir bileşenidir ve ağız boşluğu, gastrointestinal sistem ve idrar yollarında kolonize olduğu bildirilmiştir [27]. *Candida kefyr*, (telemorf ismi *Kluvyeromyces marxianus*) "kefir" olarak isimlendirilen eski bir probiyotiktir. İlk kez 1909 yılında Jörgensen tarafından izole edilmiş ve *Saccharomyces'*e benzerliği nedeniyle, aynı cins sanılarak, *Saccharomyces marxianus* olarak isimlendirilmiştir [28]. *Candida kefyr* hemotolojik maligniteleri olan, özellikle indüksiyon kemoterapisi uygulanan lösemili hastalarda etken olabilecek önemli bir patojendir [29]. *Candida kefyr* tedavisinde; nötropenik hastalarda invaziv kandidiyaziste ekinokandinler ilk tercih edilen antifungaldir ve ayrıca lipozomal amfoterisin B ve flukonazole karşı da in vitro duyarlı olduğu gösterilmiştir [30].

***Meyerozyma guilliermondii* Kompleks**

Meyerozyma guilliermondii kompleksin içinde yer alan *Meyerozyma guilliermondii* (anamorfu *Candida guilliermondii*), *Meyerozyma caribbica* (anamorfu *Candida fermentati*), *Candida carpophila*, *Candida smithsonii*, *Candida athensensis*, *Candida elateridarum ve Candida glucosophila* yakın ilişkili türlerdir [31].

Konvansiyonel yöntemler ile bu kompleks içindeki türler ayrılamamaktadır ve yanlış tanımlamaktadır. Kompleks üyelerinden en sık etken olan tür *Meyerozyma guilliermondii'* dir [31]. *Meyerozyma guilliermondii* son zamanlarda yenidoğanlarda ve çocuklarda fungemi, endokardit, selülit, fungüri ve peritonit nedeni olarak tanımlanan, nadir görülen bir mayadır. Amfoterisin B, birinci basamak antifungal olarak önerilir [4]. *Meyerozyma guillermondii* izolatlarında ekinokandinlere karşı yüksek MİK değerleri saptanmaktadır ve azollere karşı da duyarlılıkları düşük bulunmuştur [18].

Candida dubliniensis

Candida dubliniensis önceleri fenotipik özelliklerindeki benzerlikler nedeniyle *Candida albicans*'ın atipik formu olarak sınıflandırılmış, ancak 1995 yılında Sullivan ve arkadaşları tarafından *Candida dubliniensis* olarak tanımlanmıştır [32]. *Candida dubliniensis*, özellikle HIV pozitif bireylerde oral kandidiyazise neden olmaktadır [33]. *Candida dubliniensis*, azol grubu antifungallere karşı *Candida albicans*'tan daha sık direnç geliştirmesi nedeniyle tür ayrımının yapılması önemlidir [34]. *Candida dubliniensis* izolatları 45°C'de üremezken, *Candida albicans* ürer. *Candida albicans* a-methyl-d-glucoside, trehalose, ve dxylose asimile ederken, *Candida dubliniensis* asimile etmez [35].

Candida auris

Candida auris ilk olarak 2009 yılında Japonya'da bir hastanın dış kulak akıntısı örneğinden tanımlanmıştır [36]. *Candida auris*, son birkaç yılda dünyanın dört bir yanındaki birçok salgından sorumlu olan ve geliştirilmiş birçok ilaca dirençli olan bir patojendir [37]. Ülkemizde şimdiye kadar izole edilmemiştir [38]. Çok ilaca dirençli olması, yüksek ölüm oranları, yatay geçiş ve çevresel yayılımı nedeniyle bu patojen, dünya çapında enfeksiyon kontrolü ve sağlık hizmetleri için gerçek bir sorun haline gelmiştir [18]. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) ve diğer araştırma gruplarının yaptığı çalışmalarda, tüm *Candida auris* izolatları flukonazole karşı dirençli bulunmuştur [36]. Ekinokandinler *Candida auris* tedavisi için tedavide ilk seçenek olarak kabul edilmiştir [18].

Pichiaceae türleri

Pichia cinsi*; Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetales, Pichiaceae* ailesindendir [12].

***Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*)**

Anamorfu *Candida krusei*'dir [39]. Çalışmalarda, epitel ve protez yüzeylere bağlanma, proteolitik gücü ve fosfolipaz üretimi açısından *Pichia kudriavzevii*'nin *Candida albicans*'tan daha az virülan olduğu görülmüştür [40]. *Pichia kudriavzevii* flukonazole doğal dirençlidir [6]. *Pichia kudriavzevii* enfeksiyonlarında amfoterisin B'nin de bazı olgularda yetersiz kalabilmesinden dolayı enfeksiyonların tedavisi ile ilgili önemli sorunlar ortaya çıkmaktadır [41]. in vitro çalışmalarda ekinokandinler, *Pichia kudriavzevii*'ye karşı fungisit etki göstererek oldukça iyi etki göstermektedir [42].

Pichia norvegensis (Candida norvegensis)

Candida krusei dışında, *Pichiaceae* familyasında bilinen diğer patojenler, *Pichia norvegensis* (sinonimi *Candida norvegensis*) ve *Pichia cactophila* (sinonim *Candida inconspicua*)'dır [43]. Buğday, mısır, yulaf gibi tarımsal ürünler *Candida norvegensis* için potansiyel kaynaktır [44]. *Candida inconspicua* ve *Candida norvegensis*, yüksek azol MİK değerleri ile benzer direnç paternlerine sahiptir [45].

Candida inconspicua (Pichia cactophila)

Candida inconspicua ilk önce *Torulopsis* olarak tanımlanmıştır [46]. *Candida cactophila* (*Pichia inconspicua)* olarak da bilinmektedir. *Pichiaceae* familyasında yer alan bir patojendir [43]. Birçok çalışma, *Candida inconspicua*'nın genellikle süt, peynir veya tereyağı gibi ürünlerde bulunabileceğini göstermiştir [37]. *Candida inconspicua* ve *Candida norvegensis'*in, invaziv enfeksiyonlarda daha sık izole edilmesi, flukonazole dirençli olması ve bu iki türü ayırt etmenin rutin tekniklerle zor olması endişeye neden olmaktadır [47]. Amfoterisin B, bu etkenlerin enfeksiyonlarında tedavi için tercih edilen ilaçtır [48,49].

Candida fabianii (Cyberlindnera fabianii, Lindnera fabianii)

Cyberlindnera cinsi; *Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetales, Saccharomycetaceae* ailesindendir [12]. *Cyberlindnera* cinsi mayalar, özellikle gıdalarda, fermentasyon ürünlerinde ve endüstriyel atıklarda olmak üzere çevrede geniş çapta yayılım göstermektedir [50]. *Cyberlindnera fabianii* yüksek derecede patojenik olmamasına rağmen, diğer bütün ascomycetous mayalar gibi, çeşitli virulans faktörlerine sahiptir [51]. *Cyberlindnera fabianii* enfeksiyonlarında, tedavi öncesindeki MİK değerlerinden bağımsız olarak tedavi sırasında potansiyel azol direncinin oluşabileceği raporlarda bildirilmiştir. [52].

Candida utilis

Cyberlindnera jadinii veya *Lindnera jadinii* olarak da bilinen *Candida utilis*, endüstriyel olarak önemli bir mayadır ve Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edilir [53]. Vitaminler, (β-karoten, riboflavin, piridoksin, vb.) *Candida utilis, Pichia farinosa, Saccharomyces cerevisiae* gibi mayalar ve *Mycobacterium smegmatis* gibi bakteriler tarafından üretilir [54]. *Candida utilis'i*n çeşitli metabolitleri gıda katkı maddesi olarak kullanılır [55]. *Candida utilis* ile enfekte hastalarda lipozomal amfoterisin B veya kaspofungin ile tedavi başarılı bulunmuştur [56].

Rhodotorula mucilaginosa

Rhodotorula cinsi; *Basidiomycota, Urediniomycetes, Sporidiales, Sporidiobolaceae* ailesindendir [12]. *Rhodotorula* cinsi, üç türü nadir insan patojeni olmak üzere 46 tür içerir. İnsan patojenleri olarak tanımlanan türleri: *Rhodotorula mucilaginosa* (*Rhodotorula rubra* olarak da bilinir), *Rhodotorula glutinis* ve *Rhodotorula minuta*'dır [4]. *Rhodotorula* mayaları, çevreden veya hastane ortamlarından izole edilmiş pembe, kapsüllü basidiomyceteslerdir [57]. Bu maya türleri, genellikle topraklarda, göllerde, okyanus suyunda, sütte ve meyve suyunda bulunur [58]. *Rhodotorula* ayrıca sağlık çalışanlarının ellerinde de bulunmuştur. Plastik yüzeylere yüksek bir afiniteyle yapışır ve biyofilm oluşturabilir. Bu nedenle;

endoskoplara, çeşitli mutfak eşyalarına ve tıbbi ekipmanlara kolayca yapışıp kolonize olabilir. *Rhodotorula* türleri oval, ince kapsüllü ve basit hifalar oluşturabilir, ancak ballistoconidia oluşturmaz, üreaz üretebilir ancak karbonhidratları fermente edemez [4]. *Rhodotorula* türlerinin en sık neden olduğu enfeksiyon fungemidir. Bunu göz enfeksiyonları, peritonit ve menenjit izler [59]. *Rhodotorula mucilaginosa* azoller ve ekinokandinler için yüksek MİK değerleri gösterir, bu nedenle antifungal tedavi olarak amfoterisin B veya flusitozin kullanılmaktadır [60].

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cinsi; *Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetales, Saccharomycetaceae* ailesindendir [12]. Anamorfu *Candida robusta*'dır [4]. *Saccharomyces* cinsi mayalar; bira, şarap, ekmek ve diğer fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır [61]. Genellikle patojen olmadığı düşünülse de ağızda pamukçuk, tekrarlayan vulvovajinit, ampiyem ve fungemi yaptığı bildirilmiştir [39]. *Saccharomyces'*in etken olduğu fungemili hastalarda Candida mannan antijen pozitifliği saptandığı bildirilmiştir. Bu nedenle bu testin tanıda kullanılabileceği düşünülmüştür [62]. Filogenetik olarak, *Saccharomyces cerevisiae* ile *Candida glabrata* yakın ilişkili olduğu için, klinik ve mikrobiyolojik özellikleri birbirine benzerdir [63]. İn vitro duyarlılık paterni *Candida glabrata'*ya benzer olup azollere karşı yüksek MİK değerlerine sahiptir. Ekinokandin MİK'leri *Candida albicans*'tan sadece birkaç dilüsyon daha yüksek, amfoterisin B ve flusitozin MİK'leri ise daha düşüktür [4].

Saprochaete (Magnusiomyces) türleri

Saprochaete capitata teleomorfu *Magnusiomyces capitatus*'tur ve önceden bilinen isimleri *Geotrichum capitatum, Trichosporon capitatum* ve *Blastoschizomyces capitatus*'tur. *Saprochaete capitata* kapsülü olmayan, üreaz negatif ascomycetous mayadır. *Saprochaete capitata* izolatları gerçek hif, psöohif, blastokonidya, artrokonidya ve annellokonidya üretir. Odun ve toprak gibi çevresel kaynaklarda bulunur. Ayrıca insan cildinin normal mikrobiyotasının bir parçasıdır

ve sağlıklı insanların balgam ve gastrointestinal sisteminden sık sık izole edilir. *Saprochaete capitata* nadir enfeksiyon etkeni olarak görülmesine rağmen rapor edilen hastaların %92'sinde ölümcül fungemiye sebep olmuştur. İn vitro duyarlılık verileri *Saprochaete capitata*'nın flusitozin, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazole karşı duyarlı olduğunu göstermektedir, fakat flukonazole karşı MİK'leri yüksektir. *Saprochaete capitata* ile yakından ilişkili olan *Saprochaete clavata* ise çok nadiren insanda enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmıştır [4].

Trichosporon **Türleri**

Trichosporon cinsi; *Basidiomycota, Agaricomycetes, Trichosporonales, Trichosporonaceae* ailesindendir [12]. *Trichosporon* türleri üreaz pozitif, eşeyli formu olmayan mayalardır [39]. Her ne kadar çoğu türü insan derisi ve gastrointestinal sistemde mikrobiyota üyesi olarak bulunsa da, son yıllarda hematolojik hastalarda ve solid organ nakli alıcıları gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyon etkeni olma sıklığı artış göstermektedir [64]. *Trichosporon* cinsi mayalar yeniden sınıflandırılmış olup 37 türü tanımlanmıştır. Ancak, sadece 16 türü insan enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Vakaların büyük çoğunluğunu *Trichosporon asahii* (%74) oluşturmaktadır. İnsanlarda *Trichosporon* beyaz piedra ile ilişkilidir. Ayrıca hipersensitivite pnömonisi, fungemi, endokardit, peritonit ve menenjit etkeni olarak da bildirilmiştir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda *Trichosporon* cinsinin, diğer invazif maya enfeksiyonları arasındaki sıklığı giderek artmaktadır ve ölüm oranları çok yüksektir [4]. Galaktomannan ve kriptokok antijen pozitifliğinin invaziv *Trichosporon* enfeksiyonu seyri sırasında da ortaya çıktığı ve potansiyel olarak yanlış teşhise, prognozun yanlış değerlendirilmesine ve yetersiz terapötik girişimlere yol açabildiği tespit edilmiştir [65]. Vorikonazol ve posakonazolün, *Trichosporon* türlerine in vitro olarak etkili olduğu; amfoterisin B için ise yüksek MİK değerleri bildirilmiştir [66].

Cryptococcus neoformans

Cryptococcus cinsi, *Basidiomycota, Agaricomycetes, Tremellales* ailesindendir [12]. *Cryptococcus*, 70 tür içeren anamorfik bir basidiomycetous maya türüdür. *Cryptococcus gattii* ve *Cryptococcus neoformans* türleri enfeksiyonlara neden olmaktadır [4]. *Cryptococcus neoformans* fakültatif hücre içi mikroorganizmadır [67]. Polisakkarit kapsül üretimi, melanin oluşumu ve çeşitli proteinlerin salgılanması gibi birçok virülans faktörü özellikle *Cryptococcus neoformans* ile ilişkilendirilmiştir [68]. Bu cins mayalar nonfermantatif, kapsüllü ve üreaz pozitiftir [4]. Ekinokandinler *Cryptococcus neoformans*'a karşı etkisizdir [69].

MAYALARIN EPİDEMİYOLOJİSİ VE KLİNİK ÖNEMİ

Candida türleri ağız boşluğu, gastrointestinal sistemi ve vajinanın normal mikrobiyotasında bulunabilir [23]. *Candida* türlerinin neden olduğu mantar enfeksiyonları, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda giderek daha yaygın görülmektedir [37]. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, kateter kullanımı, parenteral beslenme, immünosüpresyonun varlığı, mukozal bariyerlerin bozulması, kemoterapi ve radyoterapi kullanımı invaziv mantar enfeksiyonlarının artmasında en önemli predispozan faktörler olarak kabul edilmektedir [23]. Maya enfeksiyonlarının %50'sinden fazlasının etkeni *Candida albicans*'tır, ardından *Candida glabrata* ve *Candida parapsilosis* gelir [37]. Bununla birlikte, kandidemilerin etyolojisinin son yıllarda değiştiği ve nadir türlerin görülme sıklığının giderek arttığı tespit edilmiştir [36]. Candida türlerinin patojenitesinde; konak savunmasından kaçma yeteneği, adezyon veya biyofilm oluşumu (konak dokuda veya tıbbi cihazlarda) ve dokuya zarar veren proteazlar, fosfolipazlar ve hemolizinler gibi hidrolitik enzimlerin üretimi yer almaktadır [23].

MAYALARIN LABORATUVAR TANISI

Örneklerin Direkt İncelenmesi

Tanı için alınan örneklerde uygulanacak ilk işlem direkt incelemedir. Direkt mikroskobik incelemede; yaş preparat veya Gram, Giemsa, Wright, metilen mavisi, kalkoflor beyazı, laktofenol pamuk mavisi, periyodik asit-schiff (PAS), Masson

Fontana, çini mürekkebi ve methenamin gümüş boyası gibi boyalarla hazırlanan preparatlar kullanılabilir [39].

Kültür

Fungal enfeksiyonlarda, etiyolojik etkenin izole edilmesinde klinik örneklerin kültürü altın standart yöntemdir [70]. Klinik örneklerden mantarların izole edilmesinde Sabouroud dekstroz agar (SDA), beyin kalp infüzyon agar, Sabouraud beyin kalp infüzyon agar, patates dekstroz agar, hızlı trehaloz besiyeri, mycobiotic agar, asetat askospor agar, Christensen üre agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır [39]. Klinik örneklerdeki mantarların, üremesi için pH'ın yaklaşık olarak 5.6 olması uygundur ve bu pH kontaminasyona neden olabilecek bakteriler için de inhibe edicidir. Besiyerlerine bakteriyel inhibisyonu arttırmak için gentamisin veya kloramfenikol de eklenebilir [71]. Kültür için besiyerine ekilen örnekler oda ısısında ve 37°C' de inkübe edilir [39].

Hif-Blastospor-Klamidospor Yapımı

Tween 80'li mısır unlu agar, *Candida* türlerinin üretilmesinde ve miçelyum özelliklerinin değerlendirerek ayırt edilmesinde kullanılır. Septada üzüm benzeri blastokonidyumlar, klamidosporlar ile psödohiflerin varlığı *Candida albicans*; uzun ve ince dallanan yalancı hifler ve dev hücre olarak adlandırılan genişlemiş büyük hiflerin görülmesi *Candida parapsilosis*; miçel boyunca tek tek veya küçük gruplar halinde, karakteristik "çam ormanı düzenlemesi" şeklinde blastokonidyumlar ve bazen de yalancı hif uçlarında klamidospora benzer ancak ince duvarlı hücrelerin görülmesi *Candida tropicalis*; yalancı hifler ve yanlarında kibrit çöpü kümesi şeklinde dizilim gösteren blastosporlar *Candida krusei*; bol yalancı hif üretiminin yanında nehirde yüzen tomruk kümeleri görünümlü blastopsorlar *Candida kefyr*; az sayıda kısa yalancı hifler ve bunların septalarından çıkan küçük gruplar halinde blastokonidyumlar *Candida guillermondii*; ikili ve zincir halinde düzenlenmiş oval maya hücreleri, bol dallı kavisli yalancı hifler ve uzun blastokonidyumların görülmesi *Candida lusitaniae*; yalancı veya gerçek hif oluşturmayan, küçük, oval

tomurcuklanan blastokonidyumların görülmesi *Candida glabrata* lehine değerlendirilir [72].

Kromojenik Besiyerinde Üreme

CHROMagar Candida Medium mantarların izolasyonu için seçici ve ayırt edici bir besiyeridir. Özel olarak seçilen peptonlar CHROMagar Candida Medium'da mayaların üremesi için gerekli besinleri sağlar. Özel kromojen karışımı, spesifik enzimler ile degradasyon üzerine farklı renkli bileşikler ortaya çıkaran yapay substratlar (kromojenler) içerir. Bu, yalnızca belirli türlerin ayrıştırılmasına veya belirli organizma gruplarının saptanmasına olanak sağlar. Bu besiyerinin diğer bir avantajı, kolonilerin farklı renklerde görünmesinden dolayı karışık maya kültürlerinin ayırt edilmesini kolaylaştırmasıdır [71].

Candida türlerinin CHROMagar besiyerlerindeki renkleri: *Candida albicans* yeşil, *Candida tropicalis* metalik mavi, *Candida krusei* gül renginde koloni [21]; *Candida parapsilosis* ve *Rhodotorula mucilaginosa* türleri pembe koloni [73]; *Candida glabrata* beyaz, pembe-mor koloni [20]; *Candida lusitaniae* lavanta pembe koloni [25]; *Trichosporon* türleri kirli yeşil koloni [4]; *Candida dubliniensis* koyu yeşil koloni [33]; *Candida guilliermondii* soluk pembe-mor koloni; *Candida inconspicua* beyaz pembe koloni; *Candida kefyr* pembe-mor koloni; *Candida norvegensis* beyaz-soluk pembe koloni; *Candida utilis* pembe-mor koloni; *Cryptococcus neoformans* gri-soluk pembe koloni; *Geotrichum spp*. soluk pembe-mor koloni*; Sacclcaromyces cerevisiae* beyaz-mor koloni [74]; *Candida auris*, krem renkli beyaz koloniler [75] oluşturur.

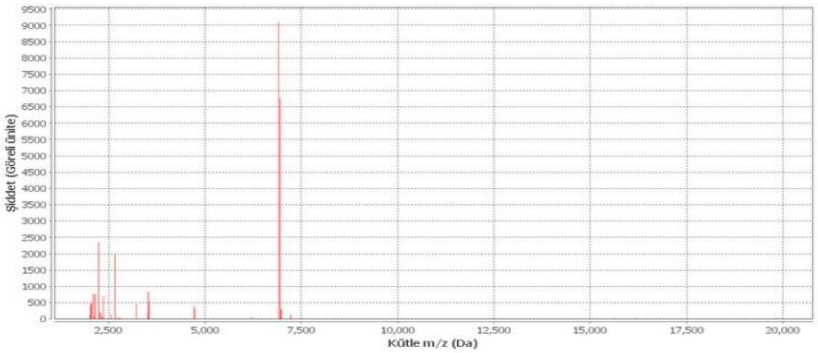
Biyokimyasal Testler

Candida türleri, belirli bir karbonhidratı, oksijenli ortamda (asimilasyon) veya oksijensiz ortamda (fermentasyon) tek karbon kaynağı olarak kullanabilme özelliklerine göre ayrılabilmektedir [76]. *Candida guilliermondii* dulsitolü (galaktitolü), *Candida kefyr* ise laktozu asimile eden tek türdür [39]. *Candida glabrata* yalnızca glikoz ve trehalozu asimile eder [23]. *Candida tropicalis* sakkaroz ve maltoz fermente ve asimile eder [20].

Kütle Spektrometrisine Dayanan Yöntemler (MALDI-TOF MS)

Son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanan, otomatize identifikasyon sistemi olan MALDI-TOF MS sistemleri, mikroorganizmaların kendilerine özgü proteomik parmak izi pik kalıplarını saptayarak tanımlama yapmaktadır [77]. Bu tanımlama; identifiye edilmek istenen koloni slayta yayılarak, üzerine öncelikle formik asit, ardından matriks solüsyonu eklenerek ve cihaza yerleştirilip lazer atışlarına maruz bırakılmasıyla yapılmaktadır. Matriks, örnek moleküllerinin iyonlaşması için gerekli enerjinin lazer ışığından örnek moleküllerine iletilmesini sağlayan bir aracı olarak görev yapar. Mikroorganizma-matriks kompleksinde lazer aracılığıyla mikro patlamalar meydana gelir. Ardından matriksle birlikte mikroorganizmalara ait protein, şeker, peptid gibi biyomoleküller ve polimer, dendrimer, makromolekül gibi büyük organik moleküller iyonize olur. Cihaz içindeki elektrot sayesinde elektrik potansiyeline maruz kalan iyonize moleküller dedektöre doğru hızlanırlar. Spektrofotometredeki vakum, mikroorganizmaya ait iyonlarla hava moleküllerinin çarpışmasını engeller. İyonlar kütleleriyle ters orantılı olarak hız kazanarak dedektöre farklı zamanda çarpmaları ile kaydedilen sinyaller proteinlerin kütle spektrumlarını oluşturur. Bir MALDI-TOF MS spektrumunda **x** ekseni proteinlerin kütle/yük (m/z) oranını gösterirken **y** ekseni de bu proteinlerin yoğunluğunu gösterir (Şekil 1). MALDI TOF-MS yöntemi ile tanımlama yapan sistemler, yeni ortaya çıkan spektrumu mevcut veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak cins ve tür düzeyinde tanımlama yapmaktadır [77-80]. Bu yüzden MALDI TOF-MS sistemlerinin veri tabandaki mikroorganizma sayısı çok önemlidir.

Sonucun güvenilirliği bazı sistemlerde bir skorlama değeri (MALDI Biotyper gibi) ile bazı sistemlerde yüzde değeri (VITEK MS gibi) ile belirlenir [81]. MALDI-TOF MS sistemleri bakterilerin, mantarların tanımlanmasında ayrıca virulans faktörlerinin araştırılmasında ve gıda kalite kontrolü amaçları için de kullanılmaktadır.



Şekil 1. VITEK MS'ten elde edilmiş bir spektrum örneği

Moleküler Yöntemler

Moleküler tanımlama yöntemleri; ya direkt klinik materyaldeki mayaların varlığının tanımlamasında ya da klinik örneklerden izole edilen mayaların tanımlanmasında güvenilir testler olarak geliştirilmiştir. Moleküler testlerin duyarlılığı rutinde uygulanan testlere göre daha yüksektir. Moleküler yöntemler aynı zamanda ilaç direncini saptama ve epidemiyolojik tiplendirme amacı ile de kullanılabilir. Dizi analizine dayalı moleküler yöntemler, mantarların tanımlanmasında kullanılan diğer yöntemlere göre daha güvenilirdir. Fakat tüm moleküler yöntemlerin yüksek maliyet gerektirmeleri ve özel laboratuvar koşulları gerektirmeleri nedeniyle rutinde kullanımları kısıtlıdır. Bu metotlar daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır. En sık kullanılan moleküler yöntemler; Nested PZR, Klasik PZR ve son yıllarda duyarlılık ve özgüllük açısından öne çıkan Gerçek Zamanlı PZR'dır [39, 76].

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ÇALIŞMAYA ALINAN İZOLATLAR

Çalışmamıza, 2012-2018 yılları arasında, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na rutin olarak gönderilmiş örneklerden elde edilen 118 klinik izolat, 14 dış kalite kontrol izolatı, dört standart standart suş ve dış merkezlerden gelen 21 izolat olmak üzere toplam 157 izolat dahil edilmiştir. İzolatların dağılımı; *Candida parapsilosis* (n=41), *Candida tropicalis* (n=27), *Candida glabrata* (n=24), *Candida lusitaniae* (n=9), *Trichosporon asahii* (n=9), *Candida kefyr* (n=8), *Candida krusei* (n=5), *Candida guilliermondii* (n=4), *Candida dubliniensis* (n=4), *Saccharomyces cerevisiae* (n=4), *Candida inconspicua* (n=3), *Rhodotorula mucilaginosa* (n=3), *Cyberlindnera fabianii* (n=2), *Saprochaete clavata* (n=2), *Candida orthopsilosis* (n=2), *Cryptococcus neoformans* (n=2), *Meyerozyma caribbica* (n=2), *Candida metapsilosis* (n=1), *Trichosporon inkin* (n=1), *Candida auris* (n=1), *Candida norvegensis* (n=1), *Geotrichum capitatum* (n=1) ve *Candida utilis* (n=1) şeklindedir.

118 klinik izolatın 113'ü kan ve steril vücut sıvısından, dördü (üç izolat *Trichosporon asahii*, bir izolat *Candida utilis*) idrardan, biri (*Cyberlindnera fabianii*) konjuktiva örneğinden izole edildi. Aynı hastanın tekrarlayan üremeleri çalışmadan dışlandı.

Tüm izolatlar laboratuvarımızda -80°C'de, gliserol içeren stok besiyerinde saklandı. İzolatların SDA (Becton Dickinson, ABD) besiyerine yapılan pasajları 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi.

Çalışmamızda BD (Becton Dickinson, ABD) ve BMX (bioMérieux, Fransa) marka hazır SDA besiyerleri kullanıldı. Her iki besiyerinin içeriğinde; litrede, 5 gr kazeinin pankreatik dijesti, 5gr hayvan dokularının peptik dijesti, 40 gr dekstroz ve 15 gr agar bulunmaktadır.

TİCARİ OTOMATiZE SİSTEMLER İLE İDENTİFİKASYON

Ticari yöntem olarak; MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany), VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ve BD Phoenix Yeast ID Panel (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, ABD) sistemleri kullanılarak izolatların identifikasyonları yapıldı. İki MALDI-TOF MS sistemiyle uyumlu olarak tanımlanan izolatların tür tanımı doğru olarak kabul edildi. MALDI Biotyper ve VITEK MS ile farklı sonuçlar gözlendiğinde altın standart yöntem olan DNA dizi analizi ile moleküler tanımlama yapıldı.

MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) Yöntemi İle İdentifikasyon

MALDI Biotyper sistemi için hedef plak hazırlanması, üretici firma önerisiyle direkt formik asit metodu ve etanol-formik asit ekstraksiyon metodu olmak üzere iki şekilde yapıldı.

a) Direkt formik asit ekstraksiyonu: Besiyerine pasajlanan izolatların 24 saatlik inkübasyon sonrası oluşan kolonilerinden alınarak paslanmaz çelik hedef plağa (Şekil 2) yayıldı. Üzerine hücre duvarını parçalayarak protein ektraksiyonunu sağlamak amacıyla 1 µL %70 formik asit (Cat no:27001,Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra üzerine analiti iyonize etmek için 1 µl matriks çözeltisi (Bruker Daltonics GmbH HCCA = α- Siyano- 4- hidroksisinnamik asit) eklendi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

b) Etanol-Formik asit ekstraksiyonu: Aşağıda bu yöntemin aşamaları ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

1) 1.5 ml'lik ependorf tüpün içine 300 µL deiyonize su eklendi, yaklaşık 1-3 koloni tüpe aktarıldı. Pipetle karıştırıldı ve vortekslendi.

2) 900 µL etanol (Cat No:100986, Merck, Almanya) eklendi ve vortekslendi.

3) 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, dipte kalan pellete zarar verilmeyecek şekilde üst fazı atıldı, yeniden santrifüj edildi. Kalan etanol pipet yardımıyla atıldı ve etanolün uçması için 2-3 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

4) Pellet miktarına göre 20-30 µL %70 formik asit (Cat no:27001, Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi ve vortekslendi.

5) Eklenen formik asit ile aynı miktarda Asetonitril (ACN) (Cat no:34851, Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi.

6) 2 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi.

7) Üst fazdan 1 mikrolitre alındı ve plağa yayıldı. Kuruması beklendi.

8) 1 µL matriks eklendi. Kuruması beklendi.

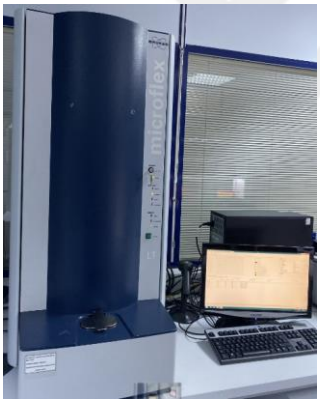
Hedef plak cihaza yerleştirildi ve analiz başlatıldı. Spektrumların elde edilmesi için her bir numunenin ölçümünde, toplamda 240 olacak şekilde 40'arlı paketlerden oluşan lazer atışları gerçekleştirildi. Mikroorganizmalara ait proteinler, lazer atışları ile iyonize olup vakumlu elektromanyetik uçuş tüpünde uçuşa geçer. İyonlar kütleleriyle ters orantılı olarak hız kazanarak dedektöre farklı zamanda çarpmaları ile kaydedilen sinyaller proteinlerin kütle spektrumlarını oluşturur. Spektrumlar flexAnalysis 3.4 yazılımı ile elde edildi. 2.000 ila 20.000 Da kütle arasında değişen kütle spektrumları, Bruker Biotyper 3.1 yazılımı ile hem **RUO Versiyon 8 (DB-7854 MSP)** hem de **IVD Versiyon 8 (DB-7712 MSP)** kütüphanelerinde kullanılarak analiz edildi. MALDI Biotyper IVD veri tabanında 444 cins, 2666 tür; MALDI Biotyper RUO veri tabanında 471 cins, 2748 tür bulunmaktadır. Elde edilen skor değerleri 2.0'ın üzerinde ise sonuç tür düzeyinde güvenilir (A düzeyi / yeşil renk) ve 1.7-1.99 arasında ise cins düzeyinde güvenilir (B düzeyi / sarı renk) olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin 1.7'nin altında olması ise güvenilir olmayan identifikasyon (C düzeyi / kırmızı renk) olarak kabul edilmektedir. Bakteri identifikasyonu için bu skorlar kabul görürken, maya identifikasyonunda >1.7 tür düzeyinde güvenilir sonuç olarak kabul edilmektedir [48, 82-85] Çalışmamızda da mayaların tür tayini için ≥1.7 skor tür düzeyinde güvenilir sonuç olarak kabul edildi.

İzolatların, ilk olarak direkt formik asit metoduyla MALDI Biotyper (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Şekil 3) tanımlamaları yapıldı. Skoru 2.0'nin altında kalan mayalara firma önerisi doğrultusunda etanol-formik asit ekstraksiyonu yapılarak tanımlamaları yapıldı. Etanol- formik asit metodu

sonrasında skoru 1.7'nin altında kalan mayalar ikinci kez etanol-formik asit ekstraksiyonu uygulanarak tanımlamaları yapıldı.



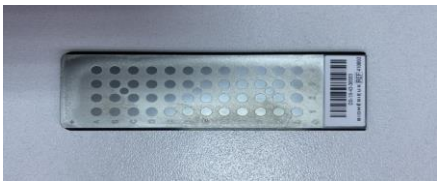
Şekil 2. MALDI Biotyper hedef plak



Şekil 3. MALDI Biotyper cihazı

VITEK MS (VITEK MS; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) Yöntemi İle İdentifikasyon

VITEK MS (Şekil 4) tanımlama slaytına (tek kullanımlık slayt) 24 saatlik maya kolonisinden alınarak yayıldı. Üzerine 0.5 µl %25 formik asit (bioMérieux, Fransa) eklendi. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 1 µl matriks solüsyonu CHCA (bioMérieux, Fransa, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Slayt cihaza yerleştirildi (Şekil 5). İdentifikasyon işlemine başlamadan önce kütle spektrumlarında gösterdiği karakteristik peptit ve protein profili iyi bilinen, *E. coli* ATCC 8739 standart suşu kullanılarak cihazın otomatik kalibrasyonu ve kontrolü yapıldı. Ardından identifikasyon işlemi başladı. Slayttaki bir noktaya beş atış yapılarak bir profil elde edildi. Toplamda 100 profil elde edildiğinde başarılı olarak bir spektrum elde edilmiş oldu. Elde edilen 2.000 ila 20.000 Da kütle arasında değişen kütle spektrumları güncel **IVD (invitro diagnostik) VITEK MS V.3.2** yazılımı kullanılarak analiz edildi. VITEK MS IVD veri tabanında ise 1316 tür bulunmaktadır. Sonuçlar renkli bir indekse göre değerlendirildi. Yeşil renk ≥%90'ı, sarı renk %85-89.9'u ve beyaz renk <%85'i temsil etmektedir. Skorun %90'dan büyük olması güvenilir olarak kabul edildi [2].



Şekil 4. VITEK MS slaytı



Şekil 5. VITEK MS cihazı

BD Phoenix Yeast ID Panel Sistemi (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, ABD) İle İdentifikasyon

BD Phoenix Panelleri fermentasyon, oksidasyon, degredasyon ve hidroliz gibi yöntemleri kullanarak tanımlama yapan, kurutulmuş biyokimyasal substratlarla kaplı 47 kuyu ve 3 kontrol kuyusu içerir. Üretici firma önerileri doğrultusunda 24 saatlik inkübasyon sonunda SDA besiyerinden alınan maya kolonisinden BD Phoenix ID broth içine 2.00–2.40 McFarland'lık süspansiyonları hazırlandı. BD Phoenix AST broth içerisine, hazırlanan süspansiyondan 25 µl eklendi ve üzerine bir damla "Phoenix AST Indicator" damlatılarak Phoenix Yeast test paneline dağıtıldı. Panel Phoenix cihazına (Şekil 6) yüklendi. Sonuçlar 16-24 saat sonunda değerlendirildi. Phoenix sistemi ile % 90'nın üstündeki tanımlama sonuçları güvenilir olarak kabul edildi [8].



Şekil 6. BD Phoenix cihazı

DNA DİZİ ANALİZİ İLE İDENTİFİKASYON

Fungal DNA izolasyonu, gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), PZR ürününün saflaştırılması ve filogenetik analiz Bioeksen AR-GE Teoknolojileri Limited Şirketi tarafından; ITS dizi analizi Makrogen Inc Hollanda tarafından yapıldı. DNA dizi analizi basamakları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

1-Fungal DNA İzolasyonu Protokolü

DNA İzolasyonu için Biospeedy® Fungal DNA izolasyon kiti kullanıldı. Kit protokolü aşağıdaki gibidir.

1. Bir mikrofüj tüpüne 600 µL parçalama tamponu eklenerek içerisine katı besiyerinden alınan yaklaşık 200 mg bakteri kolonisi ilave edildi.
2. Numune, homojenizatörde 2 dakika 6000 rpm'de homojenizasyon işleminden sonra 95°C'de 10 dakika inkübe edildi.
3. Tüp 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edildi. Elde edilen üst sıvı hacmi kadar isopropanol, üst sıvı hacminin 2 katı kadar bağlama tamponu eklenerek vorteksle karıştırıldı.

4. Karışım DNA kolonu'na eklendi, 14000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alt sıvı atıldı.

5. Kolona 500 µL inhibitör eleme tamponu eklenerek 14000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi ve alt sıvı atıldı.

6. Kolona 500 µL yıkama tamponu eklenmiş, 14000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi ve alt sıvı atıldı. Bu adım iki defa daha tekrarlandı.

7. Kolon 14000 rpm' de 1 dakika boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirildi, 100 µL çözücü tampon eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 14000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildi ve DNA izolatı elde edildi.

8. Elde edilen DNA -20°C'de saklandı.

2- Gerçek Zamanlı PZR (qPZR)

Fungal çeşitliliği belirlemek için Biospeedy® Fungal Çeşitlilik Çalışma Kiti kullanıldı. Fungi Genomik DNA'sında ITS1-5.8S-ITS2 bölgesine özgü olan ileri primer (TCCTCCGCTTATTGATATGC) ve geri primer (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) çifti kullanıldı [86]. Bütün reaksiyonlarda Biorad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Amerika) Real Time PZR cihazı kullanılmıştır. Reaksiyon; 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen, 4 ng/µl kalıp cDNA ve her bir primerden 0.5 µM içermektedir. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyon sağlanmış aşağıdaki ısı döngüsü programı uygulanmıştır (Tablo 1). qPZR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapıldı. qPZR Biorad CFX Connect Software 3.0'da analiz edildi.

Tablo 1. Kullanılan qPZR programı

Tespit Formatı		**Reaksiyon Hacmi**		
SYBR Green		10 µL		
Programlar				
Program İsmi	**Döngü Sayısı**	**Analiz Modu**		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	40	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	**Okuma Modu**	**Bekletme (hh:mm:ss)**	**Hız (°C/s)**	**Okuma (°C başına)**
Ön İnkübasyon				
95		00:10:00	4,8	–
Çoğalma				
95		00:00:15	4,8	–
52		00:00:15	2,5	–
72	Tek	00:00:30	4,8	–
Erime Eğrisi				
95		00:00:05	–	–
65		00:00:05	–	–
98	Sürekli	–	0,5	10
Soğuma				
40	Tek	00:00:30	2,5	–

3- PZR Ürününün Saflaştırılması

Elde edilen qPZR amplikonları, DNA dizi analizi öncesi primerler ve diğer qPZR bileşenlerinden Biospeedy® PZR ürün saflaştırma kiti kullanılarak temizlendi. Kitin protokolü aşağıdaki şekilde uygulandı:

1. PZR ürünleri bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. Ardından üzerine birinci aşamadaki toplam hacmin 3 katı kadar bağlama tamponu eklendi.
3. Ardından 10 saniye boyunca vorteks (maksimum hızda) yapıldı.
4. Ardından birinci adımdaki toplam hacim kadar 2-propanol eklendi.
5. 10 saniye boyunca maksimum hızda vorteks yapıldı.
6. DNA kolonu toplama tüpüne yerleştirildi ve karışım DNA kolonuna eklendi.
7. 14.000 g'de 1 dakika santrifüjlendi ve toplama tüpündeki sıvı atıldı.

8. DNA kolonuna 500 µL yıkama solüsyonu eklenerek 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı atıldı.

9. Ardından DNA kolonu 14.000 g'de 1 dakika boş olarak santrifüj edildi ve DNA kolonu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne takıldı.

10. DNA kolonununa 50 µL elüsyon çözeltisi (MGW) eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında (+15°C ile +25°C arası) inkübe edildikten sonra 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

4- Dizi Analizi

Elde edilen Fungal amplikonların sekans dizileri ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ile ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlendi.

5- Filogenetik Analiz

Her bir fungal örnek için elde edilen sekans dizileri **Chromas software package version 1.45'de** (http://www.technelysium.com/au/chromas.html) analiz edildi. Elde edilen diziler, NCBI DNA databankasında ITS bölgesi dizileri bilinen fungal türler ile karşılaştırılmış (BLAST- (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ve en çok benzeyen türler, benzerlik oranları ve sekans accession numaraları belirlenmiştir.

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi: Times New Roman, 12 nk

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımlı ikiden çok grupta oranlar Cochran Q Testi ile karşılaştırıldı. İkiden çok grupta sonuçların uyumu Cohen Kappa katsayısı ile incelendi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

İZOLAT ÖZELLİKLERİ

Çalışmamıza; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na rutin olarak gönderilmiş örneklerden elde edilen 118 klinik izolat, laboratuarımıza gelen 14 dış kalite kontrol izolatı, dört standart suş ve dış merkezlerden temin edilen 21 izolat olmak üzere toplam 157 maya izolatı dahil edildi. Klinik izolatların; 96'sı kan, 13'ü periton, dördü idrar, üçü BOS, biri plevra ve biri de konjunktiva örneğinden üredi. Aynı hastanın tekrarlayan üremeleri çalışmadan dışlandı. Klinik örneklerden elde edilen 118 izolatın örneklere göre dağılımı Tablo 2 'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Örneklere göre türlerin sayısal dağılımı (n)

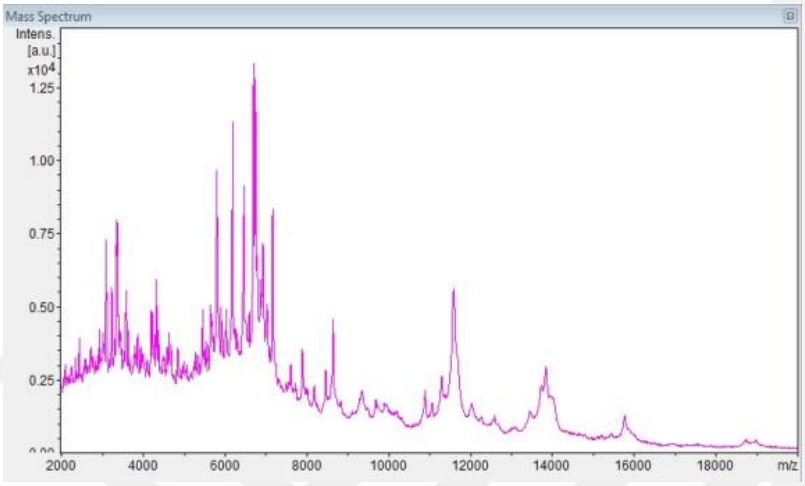
İzolat Türü	Kan	Periton	İdrar	BOS	Plevra	Konjuktiva	Toplam
Candida parapsilosis	36	1		1			38
Candida tropicalis	15	6		1	1		23
Candida glabrata	19	3					22
Candida lusitaniae	7	1					8
Trichosporon asahii			3				3
Candida kefyr	7	1					8
Candida guilliermondii	2	1					3
Candida dubliniensis	2						2
Saccharomyces cerevisiae	2						2
Cyberlindnera fabianii						1	1
Saprochaete clavata (Geotrichum clavatum)	2						2
Candida orthopsilosis	2						2
Cryptococcus neoformans	1			1			2
Candida metapsilosis	1						1
Candida utilis			1				1
Toplam	96	13	4	3	1	1	118

MALDI BIOTYPER İLE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI

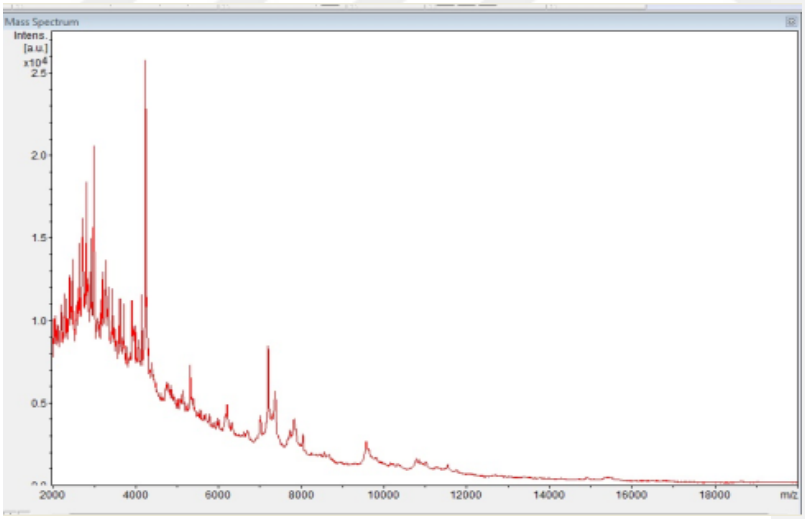
Mayaların tür düzeyinde tanımlanması üretici firmanın önerileri doğrultusunda MALDI Biotyper ver. 8.0 yazılımı ile **RUO (DB-7854 MSP)** ve **IVD (DB-7712 MSP)** kütüphaneleri kullanılarak gerçekleştirildi. SDA (Becton Dickinson, ABD) besiyerine pasajlanan mayalar direkt formik asit (FA) metodu ile çaşıldı. Direkt formik asit (FA) metodu ile skoru 2'nin altında kalan izolatlara etanol-formik asit ekstraksiyon metodu uygulandı. Etanol-formik asit ekstraksiyon metodu ile tanımlama skoru 1.7'nin altındaki izolatlara ikinci kez ekstraksiyon yapıldı. Direkt formik asit metoduyla 1.7-1.999 arasında sonuç veren iki izolat (bir *Cyberlindnera fabianii* ve bir *Candida kefyr*) etanol -formikasit ekstraksiyon metoduyla 1.7 altında tanımlama skoru verdi. Bu izolatlar ikinci kez etanol-formik asit ekstraksiyon metodu ile çalışıldığında >2 skorları ile tanımlandı. Tüm izolatlar BD (Becton Dickinson) marka SDA besiyerindeki pasajlarından çalışıldı. Bu çalışmaların sonuçları Tablo 3'te özetlendi. MALDI Biotyper yöntemiyle elde edilen kütle spektrum örnekleri Şekil 7-8' da gösterildi.

Tablo 3. MALDI Biotyper çalışma sonuçları

			MALDI Biotyper Skoru		
Sistem	**Metot**	**İzolat sayısı**	**≥2**	**1.7–1.999**	**<1.7**
MALDI Biotyper RUO (DB-7854 MSP)	Direkt Formik asit metodu	157	48	64	45
	İlk Etanol-Formik asit ekstraksiyonu	109 (64+45)	77	24	8
	İkinci Etanol Formik asit ekstraksiyonu	8	3	3	2
	TOPLAM	**157**	**126**	**29**	**2**
MALDI Biotyper IVD (DB-7712 MSP)	Direkt Formik asit metodu	157	54	72	31
	İlk Etanol-Formik asit ekstraksiyonu	103 (72+31)	78	19	6
	İkinci Etanol Formik asit ekstraksiyonu	6	0	4	2
	TOPLAM	**157**	**132**	**23**	**2**



Şekil 7. MALDI Biotyper'da elde edilmiş *Candida inconspicua* spektrumu



Şekil 8. MALDI Biotyper'da elde edilmiş *Trichosporon asahii* spektrumu

MALDI Biotyper **RUO** (DB-7854 MSP) ve MALDI Biotyper **IVD** (DB-7712 MSP) kütüphanelerinde izolatların tanımlanma skorlarına göre toplam sonuç verme oranları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. İzolatların MALDI Biotyper IVD ve MALDI Biotyper RUO kütüphanelerinde tanımlanma skorlarına göre sonuç verme oranları

Skor	**MALDI Biotyper IVD (n:157) n (%)**	**MALDI Biotyper RUO (n:157) n (%)**
≥1.7 (%)	155 (98.7)	155 (98.7)
≥2 (%)	132 (84.1)	125 (79.6)

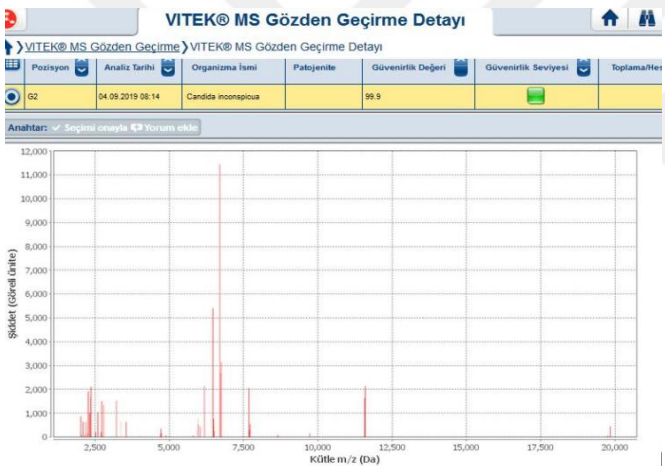
VITEK MS İLE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI

SDA BD (Becton Dickinson, ABD) besiyerine pasajlanan mayalar, direkt formik asit metoduyla çalışılarak **VITEK MS (bioMérieux, Fransa) IVD V.3.2** yazılımı ile değerlendirildi. VITEK MS sisteminde etanol-formik ekstraksiyon metodu kullanılmamaktadır. VITEK-MS yöntemiyle elde edilen kütle spektrum örnekleri Şekil 9-10' da gösterilmiştir.

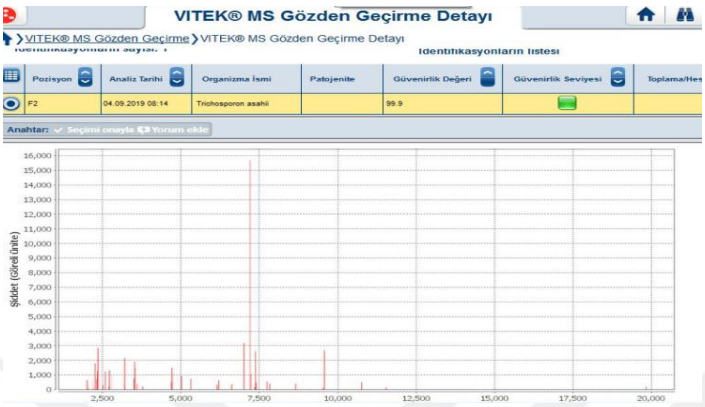
İlk çalışmada güvenilirlik değeri <%85 olup tanımlanamayan izolatlar tekrar çalışıldı. Yine tanımlanamayan izolatlar için üçüncü kez çalışma tekrarlandı. 22 izolat BD (Becton Dickinson) marka SDA besiyerindeki pasajlarından üç ayrı çalışma yapılmasına rağmen tanımlanamadı. Toplamda üç kez çalışılıp tanımlanamayan izolatlar üretici firma önerisiyle bioMérieux marka SDA besiyerine yapılan pasajlarından tekrar çalışıldı. BioMérieux marka SDA besiyerinden yapılan çalışma sonucu 22 izolatın 18'i tanımlandı. Böylelikle VITEK MS ile toplam 157 izolattan 153'ü tanımlandı (Tablo 5). Tanımlanan 153 izolattan biri *Candida guilliermondii* olarak yanlış tanımlandı. Bu suşla ilgili detaylar sekanslama sonuçlarında görülmektedir.

VITEK MS sisteminde BD (BD Becton Dickinson, ABD) marka SDA besiyeri kullanılarak tanımlanamayan izolatların BMX (bioMérieux, Fransa) marka

SDA besiyeri kullanılarak tanımlanabilme nedeninin, besiyeri kaynaklı mı, yoksa cihazın kalibrasyonu gibi başka faktörlere mi bağlı olduğunu araştırmak amacıylaVITEK MS ve MALDI Biotyper ile tanımlanamayan toplam 23 izolat aynı anda hem BD (BD Becton Dickinson, ABD) marka hem de BMX (bioMérieux, Fransa) marka SDA besiyerine pasajlandı ve VITEK MS IVD kütüphanesinde çalışıldı. VITEK MS IVD çalışma sonuçları Tablo 6'da gösterilmiştir. İki besiyeri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p<0.05$).



Şekil 9. VITEK MS IVD'de elde edilmiş *Candida inconspicua* spektrumu



Şekil 10. VITEK MS IVD'de elde edilmiş *Trichosporon asahii* spektrumu

Tablo 5. VITEK MS çalışma sonuçları

Metot	**>%90**	**%85-89.9**	**<%85**
1.çalışma (n:157) (SDA BD besiyeri)	76	0	81
2. çalışma (n:81) (SDA BD besiyeri)	47	0	34
3. çalışma (n:34) (SDA BD besiyeri)	12	0	22
4.çalışma (n:22) (SDA BMX besiyeri)	18	0	4
Toplam (n:157)	**153**	**0**	**4**

Tablo 6. VITEK MS'te iki farklı besiyerinden çalışılan izolatların sonuçları

Sistem	Metot	Doğru Tanımlanan izolat sayısı* (%)	Yanlış tanımlanan izolat sayısı* (%)	Tanımlanamayan izolat sayısı (%)
VITEK MS BD besiyeri (N:23)	**Direkt Formik asit metodu**	**4** (17.4)	**0**	**19** (82.6)
VITEK MS BMX besiyeri (N:23)	**Direkt Formik asit metodu**	**15** (65.2)	**1**** (4.3)	**7** (30.4)

* Tanımlanan ve yanlış tanımlanan izolatların VITEK MS IVD skorlarının hepsi % 99.9'dur
***Cyberlindnera(Pichia) fabianii'yı Alternaria alternata* olarak tanımlamıştır

DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

MALDI-TOF MS sistemleri ile identifikasyonları sonuçlandırılamayan beş izolatın DNA dizi analizi sonuçları Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: ITS Dizi analizi sonuçları

İzolat No	Tür adı	Benzerlik	Sekans
1	*Meyerozyma caribbica* (CBS 9966)	587/587 (%100)	NR 149348.1
2	*Meyerozyma caribbica* (CBS 9966)	584/584 (%100)	NR 149348.1
3	*Candida dubliniensis* (CBS 7987)	466/473 (%98)	NR 119386.1
4	*Cyberlindnera fabianii* (CBS 5640)	604/605 (%99)	NR 149345.1
5	*Cyberlindnera fabianii* (CBS 5640)	593/594 (%99)	NR_149345. 1

ITS Dizi analizi ile nihai tanımlaması yapılmış olan 5 izolatın sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 8'de görülmektedir.

MALDI Biotyper ile beş izolatın üçü (bir *Candida dubliniensis,* iki *Cyberlindnera (Pichia) fabianii)* doğru tanımlandı, iki *Meyerozyma caribbica* suşu veri tabanında olmadığı için tanımlanamadı. VITEK MS IVD ile beş suştan dördü tanımlanamadı, biri yanlış tanımlandı. İki *Cyberlindnera fabianii* suşunu VITEK MS IVD ver.3.2 veri tabanında olmadığı için tanımlayamadı.

Tablo 8. Dizi analizi ve iki MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanan türlerin karşılaştırmalı sonuçları

No	**ITS Dizi Analizi**	**MALDI Biotyper**	**VITEK MS IVD**
1	*Meyerozyma caribbica**	Tanımlanamadı	*Candida guilliermondii*
2	*Meyerozyma caribbica**	Tanımlanamadı	Tanımlanamadı
3	*Candida dubliniensis*	*Candida dubliniensis*	Tanımlanamadı
4	*Cyberlindnera fabianii***	*Cyberlindnera fabianii*	Tanımlanamadı
5	*Cyberlindnera fabianii***	*Cyberlindnera fabianii*	Tanımlanamadı

**Meyerozyma caribbica* MALDI Biotyper ver.8 veri tabanında yoktur. VITEK MS IVD ver.3.2 veri tabanında *Meyerozyma caribbica* (anamorfu *Candida fermentati* şeklinde) vardır

** *Cyberlindnera fabianii* VITEK MS IVD ver.3.2 veri tabanında yoktur

İKİ MALDI-TOF CİHAZININ PRATİKLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

MALDI Biotyper tezgahüstü yerleştirilebilen, laboratuvarda daha az yer kaplayan ve hedef plakların yerleştirmesi daha pratik olan bir cihazdır. Öte yandan, VITEK MS, daha fazla yer kaplayan zemine monte edilmiş bir cihazdır ve slayt yerleştirme yerinin konumundan dolayı, personelin slaytları yerleştirirken eğilmesi gerekir (Şekil 3, 5). MALDI Biotyper ile yayma hazırlama VITEK MS ile karşılaştırıldığında daha az titizlik ve daha az deneyim gerektirmektedir. MALDI

Biotyper ile tekrar kullanılabilen hedef plakların ve laboratuvarda hazırlanan matriks solusyonunun kullanımı maliyet etkin bulunurken, VITEK MS için tek kullanımlık slaytların ve hazır matriks solüsyonunun olması (analiz öncesi hazırlık gerektirmemesi nedeniyle) olası hataları azaltması açısından avantajdır. MALDI Biotyper, vakumlama işlemleri ve örnekleri tanımlanma süresi açısından daha hızlıydı. Öte yandan, VITEK MS'de, maya tanımlanmadan önce ek ekstraksiyon adımlarının olmaması nedeniyle gecikmelere neden olmadı. Her iki sistem de benzer şekilde yüksek satın alma maliyetlerine sahiptir. Bununla birlikte MALDI Biotyper reaktanları ve bakımı, VITEK MS'ten daha ucuzdur. MALDI Biotyper ve VITEK MS'in pratiklik ve diğer teknik özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. MALDI Biotyper ve VITEK MS'in pratiklik ve diğer teknik özelliklerinin karşılaştırılması

	MALDI Biotyper	**VITEK MS**
Uçuş tüpü boyutu	1.05 m	1.20 m
Tek kullanımlık slayt/hedef plak	Yok	Var
Kullanıma hazır matriks solüsyonu	Yok	Var
Bir çalışmada örnek kapasitesi	96	4x48
Vakum süresi	3 dk	6 dk
Sonuç verme zamanı	Bir örnek tanımlandıktan sonra	16 örnek tanımlandıktan sonra
Ekstraksiyon süresi	20 dk	0
Kalibrasyon	Her 96 okutmada bir	Her 16 okutmada bir

Tablo 7. İzolatların MALDI-TOF MS sistemi tanımlama sonuçlarının türlere göre dağılımı

	Toplam İzolat Sayısı	**Doğru Tanımlanan İzolat Sayısı**			**Tanımlanamayan veya Yanlış Tanımlanan İzolat Sayısı**		
		MALDI Biotyper RUO	**MALDI Biotyper IVD**	**VITEK MS IVD**	**MALDI Biotyper RUO**	**MALDI Biotyper IVD**	**VITEK MS IVD**
Candida parapsilosis	41	41	41	41	0	0	0
Candida tropicalis	27	27	27	27	0	0	0
Candida glabrata	24	24	24	24	0	0	0
Candida lusitaniae	9	9	9	9	0	0	0
Trichosporon asahii	9	9	9	9	0	0	0
Candida kefyr	8	8	8	8	0	0	0
Candida guilliermondii	4	4	4	4	0	0	0
Candida krusei	5	5	5	5	0	0	0
Candida dubliniensis	4	4	4	3	0	0	1*
Saccharomyces cerevisiae	4	4	4	4	0	0	0
Candida inconspicua	3	3	3	3	0	0	0
Rhodotorula mucilaginosa	3	3	3	3	0	0	0
Cyberlindnera fabianii	2	2	2	0	0	0	2**
Saprochaete clavata (Geotrichum clavatum)	2	2	2	2	0	0	0
Candida orthopsilosis	2	2	2	2	0	0	0
Cryptococcus neoformans	2	2	2	2	0	0	0
Meyerozyma caribbica	2	0	0	0	2**	2**	2***
Candida metapsilosis	1	1	1	1	0	0	0
Trichosporon inkin	1	1	1	1	0	0	0
Candida auris	1	1	1	1	0	0	0
Candida norvegensis	1	1	1	1	0	0	0
Geotrichum capitatum	1	1	1	1	0	0	0
Candida utilis	1	1	1	1	0	0	0
TOPLAM	**157**	**155**	**155**	**152**	**2***	**2***	**5****

* *Candida dubliniensis'i tanımlayamamıştır*

**Veri tabanında olmadığı için tanımlayamamıştır

*** *Meyerozyma caribbica* olan iki izolatın birini *Candida guilliermondii olarak yanlış tanımlamış, biri de tanımlanamamıştır*

BD PHOENİX İLE İDENTİFİKASYON SONUÇLARI

BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, ABD) cihazı ile çalışılan 157 izolatın 119'u doğru, 24 izolat yanlış tanımlanmış ve 14 izolat tanımlanamamıştır (Tablo 11). Yanlış tanımlanan veya hiç tanımlanamayan toplam 38 izolat ikinci kez çalışılmıştır (Tablo 12). İkinci çalışmada 38 izolatın yedisi doğru tanımlanmış, 17'si yanlış tanımlanmış ve 14'ü tanımlanamamıştır. Bu 38 izolatın birinci ve ikinci çalışma sonuçları Tablo 13 de gösterilmiştir. İlk çalışmada yanlış tanımlanan 24 izolatın ikinci çalışmada dördü doğru,15'i yanlış tanımlanmış olup, beşi tanımlanamamıştır. İlk çalışmada tanımlanamayann 14 izolatın ikinci çalışmada üçü doğru, ikisi yanlış tanımlanmış olup, dokuzu tanımlanamamıştır. Toplamda iki BD Phoenix çalışma sonucunda 126 izolat doğru tanımlanmış, 22'si yanlış tanımlanmış ve dokuzu tanımlanamamıştır. İki çalışma sonucunun toplamı ve maya izolatlarına göre BD Phoenix sisteminin uyumluluk oranları Tablo 14'de gösterilmiştir.

İzolatlardan *Cyberlindnera fabianii* (n=2), *Meyerozyma caribbica* (n=2) ve *Candida auris* (n=1) BD Phoenix (Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, ABD) veri tabanında yoktur. *Candida parapsilosis* kompleks grubunda yer alan alt türler (*Candida metapsilosis* ve *Candida orthopsilosis)* veri tabanında olmadığı için *Candida parapsilosis* kompleks olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle bu türlerin tanımlanmasında BD Phoenix için *Candida parapsilosis* kompleks doğru tanımlama olarak kabul edildi.

Tablo 8. BD Phoenix ilk çalışma sonuçlarının MALDI-TOF MS sonuçlarına göre dağılımı

		BD Phoenix		
MALDI-TOF MS	**Toplam İzolat Sayısı**	**Doğru Tanımlanan İzolat Sayısı**	**Yanlış Tanımlanan İzolat Sayısı**	**Tanımlanamayan İzolat Sayısı**
Candida parapsilosis* kompleks	44	43	1**	
Candida tropicalis	27	27		
Candida glabrata	24	24		
Candida lusitaniae	9	4	4	1
Trichosporon asahii	9	1	2	6
Candida kefyr	8	5	3	
Candida guilliermondii	4	2	1	1
Candida krusei	5	5		
Candida dubliniensis	4		4	
Saccharomyces cerevisiae	4	3	1	
Candida inconspicua	3	1		2
Rhodotorula mucilaginosa	3		2	1
Cyberlindnera fabianii	2		2	
Meyerozyma caribbica	2			2
Saprochaete clavata (Geotrichum clavatum)	2		2	
Cryptococcus neoformans	2	2		
Trichosporon inkin	1			1
Candida auris	1		1	
Candida norvegensis	1		1	
Geotrichum capitatum* ***(Magnusiomyces capitatus)***	1	1		
Candida utilis	1	1		
Toplam	**157**	**119**	**24**	**14**

**Candida metapsilosis* (n:1) ve *Candida orthopsilosis* (n:2) veri tabanında olmadığı için *Candida parapsilosis* kompleks olarak tanımlanmaktadır

** *Candida parapsilosis* kompleks, *Candida sake olarak yanlış tanımlandı*

****Geotrichum capitatum* BD Phoenix sisteminde telemorfu *Magnusiomyces capitatus* olarak tanımlandı

Tablo 9. BD Phoenix ikinci çalışma sonuçlarının MALDI-TOF MS sonuçlarına göre dağılımı

		BD Phoenix		
MALDI-TOF MS	**Test edilen izolatların sayısı**	**Doğru Tanımlanan İzolat Sayısı**	**Yanlış Tanımlanan İzolat Sayısı**	**Tanımlanamayan İzolat Sayısı**
Candida lusitaniae	5	1	2	2
Trichosporon asahii	8	1		7
Candida kefyr	3		3	
Candida guilliermondii	2		2	
Candida dubliniensis	4	1	3	
Meyerozyma caribbica	2			2
Saccharomyces cerevisiae	1	1		
Candida inconspicua	2		1	1
Rhodotorula mucilaginosa	3	1	2	
Cyberlindnera fabianii	2		2	
Saprochaete clavata (Geotrichum clavatum)	2			2*
***Candida parapsilosis* kompleks**	1	1		
Trichosporon inkin	1	1		
Candida auris	1		1	
Candida norvegensis	1		1	
TOPLAM	**38**	**7**	**17**	**14**

**Saprochaete clavata* olan iki izolatı BD Phoenix sistemi *Geotricum species* olarak tanımlamıştır

Tablo 10. Birinci çalışmada tanımlanamayan 38 izolatın birinci ve ikinci çalışma sonuçları

MALDI-TOF MS	BD Phoenix 1.Çalışma	BD Phoenix 2.Çalışma
Trichosporon asahii	*tanımlanamadı*	*Trichosporon asahii*
Trichosporon asahii	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Trichosporon asahii	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Trichosporon asahii	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Trichosporon asahii	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Trichosporon asahii	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Trichosporon asahii	*Trichosporon inkin*	*tanımlanamadı*
Trichosporon asahii	*Trichosporon inkin*	*tanımlanamadı*
Candida lusitaniae	*Candida melibiosica*	*Candida lusitaniae*
Candida lusitaniae	*Candida melibiosica*	*Candida melibiosica*
Candida lusitaniae	*Candida pulcherrima*	*tanımlanamadı*
Candida lusitaniae	*Candida melibiosica*	*Candida pulcherrima*
Candida lusitaniae	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Candida dubliniensis	*Candida albicans*	*Candida dubliniensis*
Candida dubliniensis	*Candida albicans*	*Candida albicans*
Candida dubliniensis	*Candida albicans*	*Candida albicans*
Candida dubliniensis	*Candida albicans*	*Candida albicans*
Candida kefyr	*Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces cerevisiae*
Candida kefyr	*Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces cerevisiae*
Candida kefyr	*Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces cerevisiae*
Rhodotorula mucilaginosa	*tanımlanamadı*	*Rhodotorula mucilaginosa*
Rhodotorula mucilaginosa	*Cryptococcus terreus*	*Sporobolomyces salmonicolor*
Rhodotorula mucilaginosa	*Cryptococcus albidus*	*Cryptococcus terreus*
Cyberlindnera fabianii	*Candida pelliculosa*	*Candida pelliculosa*
Cyberlindnera fabianii	*Candida pelliculosa*	*Candida pelliculosa*
Candida inconspicua	*tanımlanamadı*	*Prototheca wickerhamii*
Candida inconspicua	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Candida guilliermondii	*tanımlanamadı*	*Candida albicans*
Candida guilliermondii	*Candida albicans*	*Candida albicans*
Meyerozyma caribbica	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Meyerozyma caribbica	*tanımlanamadı*	*tanımlanamadı*
Saprochaete clavata	*Trichosporon mucoides*	*tanımlanamadı*
Saprochaete clavata	*Trichosporon mucoides*	*tanımlanamadı*
Candida auris	*Candida haemulonii*	*Candida haemulonii*
Candida norvegensis	*Prototheca zopfii*	*Candida inconspicua*
Trichosporon inkin	*tanımlanamadı*	*Trichosporon inkin*
Candida parapsilosis kompleks	*Candida sake*	*Candida parapsilosis* kompleks
Saccharomyces cerevisiae	*Zygosaccharomyces bailii*	*Saccharomyces cerevisiae*

Kırmızı renk: Yanlış tanımlama; Sarı renk: Tanımlanamadı; Yeşil renk: Doğru tanımlama

Tablo 11. BD Phoenix sisteminin türlere göre uyumluluk oranları

		BD Phoenix			
İzolat Türü	**İzolat Sayısı**	**Doğru Tanımlanan İzolat Sayısı**	**Yanlış Tanımlanan İzolat Sayısı**	**Tanımlanamayan İzolat Sayısı**	**Yüzde %**
***Candida parapsilosis* kompleks**	**44**	44			100
Candida tropicalis	**27**	27			100
Candida glabrata	**24**	24			100
Candida lusitaniae	**9**	5	3	1	55.6
Trichosporon asahii	**9**	2	2	5	22.2
Candida kefyr	**8**	5	3		62.5
Candida krusei	**5**	5			100
Candida guilliermondii	**4**	2	2		50
Candida dubliniensis	**4**	1	3		25
Saccharomyces cerevisiae	**4**	4			100
Candida inconspicua	**3**	1	1	1	33.3
Rhodotorula mucilaginosa	**3**	1	2		33.3
Cyberlindnera fabianii	**2**		2		-
Saprochaete clavata (Geotrichum clavatum)	**2**		2		-
Cryptococcus neoformans	**2**	2			-
Meyerozyma caribbica	**2**			2	-
Trichosporon inkin	**1**	1			-
Candida auris	**1**		1		-
Candida norvegensis	**1**		1		-
Geotrichum capitatum	**1**	1			-
Candida utilis	**1**	1			-
TOPLAM	**157**	**126**	**22**	**9**	**80.3**

Tüm izolatların iki MALDI-TOF-MS ve BD Phoenix tanımlama sonuçları ekler bölümünde yer verildi (Ek 1).

CİHAZLARIN İSTATİKSEL OLARAK UYUMLARI

Analitik dereceli puanlama anahtarı kullanılarak yapılan puanlamada Kappa istatistiğine ilişkin bulgular Tablo 15'de özetlenmiştir. κ değeri;

< 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 anlamına gelmektedir [87].

Tablo 12. Cihazların istatiksel olarak uyumları

		Kappa İstatistiği Değeri (κ)
MALDI Biotyper IVD-RUO ≥1.7	VITEK MS IVD	0.419*
	BD Phoenix	0.095*
VITEK MS IVD	BD Phoenix	0.132*

*p<0.05

TARTIŞMA

Çalışmamızda, *albicans* dışı *Candida* ve nadir maya türlerinin hızlı tanımlanması için iki MALDI-TOF MS sistemi karşılaştırılmış, BD Phoenix otomatize sisteminin performansı değerlendirilmiştir. MALDI Biotyper, VITEK MS IVD ve BD Phoenix sistemlerinin doğru tanımlama oranları sırasıyla %98.7, %96.8 ve %80.3 bulunmuştur.

Çalışmada 157 izolatın Biotyper ile 155'i (%98.7), VITEK IVD ile 152'si (%96.8) doğru olarak tanımlamıştır. Biotyper ve VITEK yaygın olarak görülen türlerin (*Candida parapsilosis , Candida tropicalis, Candida glabrata ve Candida krusei*) %100'ünü doğru tanımlarken; nadir görüler 19 türden oluşan 60 izolatın Biotyper ile %96.7'si, VITEK ile %91.7'sini doğru tanımlamıştır. İki MALDI-TOF sisteminin tür tanımlamaları birbiriyle uyumlu bulunmuştur.

MALDI Biotyper sisteminde iki izolat (aynı tür) veri tabanında olmadığı için tanımlanamamıştır. VITEK MS IVD sistemi ile dört izolat tanımlanamamış ve bir izolat yanlış tanımlanmıştır. VITEK MS IVD sisteminde tanımlanamayan 4 izolattan aynı tür olan iki izolat veri tabanında olmadığı için tanımlanamamıştır. BD Phoenix sistemi ise dokuz izolat tanımlanamazken, 22 izolat yanlış tanımlanmıştır.

Son yıllarda tanı ve tedavi alanındaki gelişmelere paralel olarak mantar enfeksiyonlarının insidansında dünya genelinde artış gözlenmektedir [88]. Mantar enfeksiyonlarından, en sık *Candida* türleri sorumludur [89, 90]. İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının en yaygın görülen şekli kandidemi olup yatan hastalarda önemli bir morbidite ve mortalitenin nedenidir [91]. *Candida* türleri kan dolaşım enfeksiyonu etkenleri arasında ABD'de dördüncü sırada yer almaktadır [92].

Candida türleri, tüm sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların %15'i, tüm sağlık bakımı ile ilişkili mantar enfeksiyonlarının %72'si ve sağlık bakımı ile ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarının %8-15' inde etken olarak görülmektedir [89].

Birçok maya türü halen yaygın olarak kullanılan antifungallere karşı duyarlıdır. Ancak bazı türlerde belli antifungallere karşı azalmış duyarlılık veya direnç varlığı bilinmektedir. *Candida krusei'* nin flukonazole doğal dirençli olması, *Candida lusitaniae*'nın amfoterisin B'ye dirençli olması, *Candida glabrata'* nın triazol grubuna karşı duyarlılığında azalma ve hızlı direnç gelişimi, *Candida parapsilosis* ve *Candida guillermondii'*de ekinokandinlere karşı duyarlılıkta azalma görülmektedir [92]. Son dekatta dünyanın dört bir *yanındaki birçok salgından sorumlu olan ve çoklu ilaç direnci göstren bir patojen olan Candida auris*, yüksek mortalitesi ve kolay yayılabilmesi nedeniyle enfeksiyon kontrolü ve sağlık hizmetleri için gerçek bir sorun haline gelmiştir [18, 37] İnvaziv maya enfeksiyonlarında etkenin tür düzeyinde hızlı tanımlanması, etkili antifungal tedavinin en kısa sürede başlanabilmesi açısından oldukça önemlidir [93].

Fungal etkenlerin geleneksel yöntemlerle tür tanımı; zaman alıcı olup yoğun emek gerektirmektedir. Ayrıca nadir veya yeni ortaya çıkan *Candida* türlerini tanımlayamadığı için günümüzde rutin laboratuvarlarda tercih edilmemektedir [3,94]. Altın standart DNA dizi analizi yöntemi ise; maliyetinin yüksek olması, iyi laboratuvar donanımı ve deneyimi gerektirmesi ve birçok mikrobiyoloji laboratuvarında yapılamaması nedeniyle rutin laboratuvarlar için uygulaması zor olan bir yöntemdir. Ayrıca, mayaların sınıflandırılmasındaki gelişmeler ve yeni/yakın ilişkili türlerin tanımlanmasında daha fazla gen bölgesinin incelenmesine ihtiyaç duyulması tanımlamayı daha da zorlaştırmaktadır [2, 3].

Geleneksel yöntemler ve DNA dizi analizindeki bu kısıtlılıklardan dolayı, rutin laboratuvarlarda ticari tanımlama sistemleri tercih edilmektedir.

Son yıllarda bakteri ve mantar enfeksiyonlarının tanısında MALDI-TOF MS sistemleri ile kolay, ucuz, güvenilir ve hızlı sonuç alındığına dair çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ticari olarak sadece VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) sistemlerinin klinik tanı amaçlı FDA (Food and Drug Administration) onayı vardır [95]. Sonucun güvenilirliği, VITEK MS sisteminde yüzde değeri ile MALDI Biotyper sisteminde ise bir skorlama değeri ile ifade edilmektedir [81]. VITEK MS sisteminde yüzde değerin ≥%90'ın üstünde olması güvenilir olarak kabul edilmektedir [2]. MALDI

Biotyper sisteminde ise elde edilen skor değerleri 2.0'ın üzerinde ise sonuç tür düzeyinde güvenilir ve 1.7-1.99 arasında ise cins düzeyinde güvenilir olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin 1.7'nin altında olması ise güvenilir olmayan identifikasyon olarak kabul edilmektedir. Bakteri identifikasyonu için bu skorlar kabul görürken, literatürde maya identifikasyonunda >1.7 tür düzeyinde güvenilir sonuç olarak kabul edilmektedir [2, 3, 8, 48, 82-85, 96-99]. Bununla ilgili yapılan 13 merkezli bir çalışmada, toplam 5.460 izolatın MALDI Biotyper sonucu Receiver Operating Characteristic (ROC) eğrisi analizleri kullanılarak incelenmiştir. Bu analizler sonucunda MALDI Biotyper sisteminde maya tanımlanması için eşik değerin 1.7 seviyesine düşürülmesi önerilmiştir [82]. Çalışmamızda tür düzeyinde maya tanımlanmasında 1.7 skoru eşik değer olarak kabul edilmiştir.

Mayaların sert bir hücre duvarına sahip olmaları nedeniyle MALDI- TOF MS yöntemiyle tanımlanmadan önce iyonizasyonda gereken biyomoleküllerin erişilebilirliğini arttırmak için lizise uğratılmaları gerekmektedir. Bu nedenle bakterilerde uygulanan slayta direk yayma yöntemi kullanılmamaktadır [77]. Lizis işlemi; VITEK MS sisteminde daha hızlı olan ve daha az el işçiliği gerektiren 'direkt formik asit' metodu ile yapılırken, MALDI Biotyper sisteminde direkt formik asit metodu veya etanol-formik asit ekstraksiyon metodu uygulanarak yapılabilmektedir. MALDI Biotyper sisteminde referans veri tabanları hazırlanırken kullanılan lizis yönteminin, rutin çalışmalar yapılırken de kullanılması iyi sonuçlar alınması açısından tercih edilmelidir. MALDI Biotyper sistemi için bu yöntem etanol-formik asit ekstraksiyon metodudur [100]. Bir çalışmada MALDI Biotyper sisteminde direkt formik asit metodu kullanıldığında identifikasyon oranı %89.3 iken, etanol-formik asit ekstraksiyonu kullanıldığında oranın %98.1'e yükselmiştir [101]. Bir başka çalışmada ise MALDI Biotyper sistemiyle direkt formik asit metodu kullanıldığında, 210 izolatın %91'i doğru adlandırılmıştır [96]. Lee ve ark. [84] 309 izolatın direk formik asit yöntemiyle %82.5 'ini tanımlamışlar, tanımlanamayan izolatlara tekrar direk formik asit yöntemi uygulandıklarında bu oran %87.4'e çıkmıştır. Direk formik asit yöntemi ile tanımlayamadıkları izolatlara etanol-formik asit ekstraksiyon metodu uyguladıklarında ise oran %93.2'ye yükselmiştir [84]. Çalışmamızda; MALDI Biotyper sisteminde 157 izolatın bir defa direk formik asit

yöntemi uygulanarak IVD kütüphanesinde %80.3 'ü, RUO kütüphanesinde %71.3 'ü tanımlanmıştır. Tanımlanamayan izolatlara etanol-formik asit ekstraksiyon metodu uygulandığında ise bu oran her iki kütüphanede de %98.7'ye çıkmıştır. Rutin uygulamada; öncelikle direkt formik asit metodunun kullanılması, tanımlanamayan izolatlara etanol formik asit metodunun uygulanması zaman ve iş yükü açısından avantaj sağlayacaktır.

MALDI-TOF MS tabanlı sistemlerinin performanslarının araştırıldığı çalışmalarda tanımlama oranları oldukça yüksek bulunmuştur. MALDI Biotyper sistemi ile yapılan çalışmalarda; Fraser ve ark. [98] 71 farklı maya türünü içeren 6343 maya izolatının %99.8'ini, Lacroix ve ark. [3] ise 1383 *Candida* izolatının %97' sini doğru olarak tanımlamıştır. VITEK MS sistemi ile yapılan çalışmalarda; Westblade ve ark. [102] 31 farklı maya türünü içeren 852 maya izolatının, Won ve ark. [103] ise 533 maya izolatının %96' sını doğru olarak tanımlamıştır. Dhiman ve ark. [99] MALDI Biotyper 2.0 Microflex LT sistemininde 138 yaygın ve 103 nadir maya izolatını değerlendirdikleri çalışmada tür düzeyinde doğru tanımlama oranlarını sırasıyla %96 ve %85 olarak saptamışlardır. Çalışmalarda rutinde sık izole edilen (yaygın) türlerde doğru tanımlama oranlarının daha yüksek olduğu, nadir izole edilen türlerde tanımlama oranlarının düştüğü görülmektedir.

Ticari MALDI-TOF MS sistemlerinin identifikasyon için kullandığı veri tabanları firmaların kendileri tarafından geliştirilmiş olup, değişik sayıda cins ve tür içermektedir. MALDI-TOF MS tabanlı sistemlerin performanslarının değerlendirilmesinde aynı izolatların kullanıldığı karşılaştırmalı çalışmalar önemlidir. Mancini ve ark. [9] mayaların belirlenmesi için MALDI Biotyper MS **(Versiyon 3.0)** ve VITEK MS **(Versiyon 1.2.0)** sistemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında; tür düzeyinde doğru tanımlama oranları sırasıyla %90 ve %84 olarak belirlemiştir. Chen ve ark. [104] 78 izolat *Candida* cinsi maya ve 20 izolat *Candida* dışı maya olmak üzere toplam 98 maya izolatını VITEK MS **(Versiyon 2.0)** ve MALDI Biotyper **(Versiyon 1.0)** sistemlerinde değerlendirmişlerdir. *Candida* cinsi mayaların tanımlanmasında, VITEK MS %87.2'sini MALDI Biotyper %96.2'sini; *Candida* dışı mayaların tanımlanmasında ise VITEK MS %35'ini MALDI Biotyper

%90'ını doğru tanımlamıştır [104]. Chao ve ark. [105] 200 maya izolatını VITEK MS **(Versiyon 3.2)** ve MALDI Biotyper **(Versiyon 3.1)** sistemlerinde değerlendirerek, doğru tanımlama oranlarını sırasıyla %79.5 ve %92.5 olarak saptamışlardır [105]. Pence ve ark. [83] çalışmasında DNA dizi analizi altın standart yöntem kabul edilerek VITEK MS IVD **(Versiyon 2.0)** ve MALDI Biotyper **(Versiyon 3.1)** sistemlerinde altı cins ve 18 türden oluşan 117 izolat değerlendirilmiştir. VITEK MS ile 113 (%96.6) izolat doğru, bir izolat yanlış tanımlanırken; MALDI Biotyper ile 111'i (%94.9) doğru tanımlanmış, 3'ü (%2.6) yanlış tanımlanmıştır. Lee ve ark. [84] yaptıkları çalışmada MALDI Biotyper **(Versiyon 3.1)** ve VITEK MS **(Versiyon 3.2)** sistemlerini kullanarak 42 maya türünü içeren 309 klinik izolatın MALDI Biotyper ile %93.2'ünü, VITEK MS ile %89'unu doğru olarak tanımlamıştır. Ayrıca VITEK MS ile üç izolat MALDI Biotyper ile iki izolat yanlış tanımlanmıştır [84]. Çalışmalarda VITEK MS sisteminde MALDI Biotyper sisteminden daha fazla yanlış tanımlama oranları bildirilmiştir [77].

Çin 'de yapılan çok merkezli bir çalışmada 41 farklı maya türünü içeren 2683 maya izolatı MALDI Biotyper **(Versiyon 3.1)** ve VITEK MS **(Versiyon 2.0)** sistemlerinde karşılaştırılmıştır [48]. VITEK MS sistemiyle izolatların %95.4'ü (2559 izolat) doğru tanımlanmış, %1.8'i (48 izolat) yanlış tanımlanmış olup, % 2.8'i ise (76 izolat) tanımlanamamıştır. MALDI Biotyper sistemiyle izolatların % 98.8'i (2.651 izolat) doğru tanımlanmış, % 0.4'ü (10 izolat) yanlış tanımlanmış ve % 0.8'i ise (22 izolat) tanımlanamamıştır [48]. Bu iki cihazdan elde edilen uyumsuz identifikasyon sonuçları için ITS dizi analizi yöntemi kullanılarak maliyet azaltılmaya çalışılmıştır. Araştırmacılar bu yaklaşımı "integre altın standart" yöntemi olarak adlandırmışlardır [48]. Çalışmamızda da benzer nedenlerden sadece uyumsuz veya tanımlanamayan izolatlara dizi analizi yapılmıştır.

Türkiye' de henüz MALDI-TOF MS sistemlerinin karşılaştırıldığı yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda albicans dışı Candida türleri ve nadir görülen maya izolatlarında MALDI-TOF MS sistemi karşılaştırılmış olup MALDI Biotyper için % 98.7; VITEK MS için %96.8 doğru tanımlama oranları saptanmıştır. VITEK MS ile bir izolat yanlış tanımlanırken Biotyper sisteminde

yanlış tanımlanan izolat bulunmamaktadır. MALDI Biotyper Ver.8 *Meyerozyma caribbica* (n:2), VITEK MS IVD V.3.2 'de *Cyberlindnera fabianii* (n:2) veri tabanında olmadığı için tanımlanamamıştır. Ayrıca VITEK MS IVD'de *Meyerozyma caribbica* (n:1), *ve Candida dubliniensis* (n:1) izolatları veri tabanında yer almasına rağmen tanımlanamamıştır.

Jamal ve ark. [2] 188 maya izolatını değerlendirdikleri çalışmalarında ise VITEK MS **(Versiyon 2.0)** ve MALDI Biotyper **(Versiyon 3.3)** ile doğru tanımlama oranları sırasıyla %93.0 (175/188) ve %92.6 (174/188) olarak belirlemiştir. Çalışmada kullanılan VITEK MS sisteminde *Candida ortopsilosis* veri tabanında bulunmadığı için dokuz *Candida ortopsilosis* izolatı C*andida parapsilosis* olarak yanlış tanımlanmıştır [2]. *Candida parapsilosis* türünde görülen genetik heterojenite nedeniyle önceleri üç farklı gruba ayrılırken (Grup I, II, III), son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu gruplar farklı türler olarak; *Candida parapsilosis* sensu stricto (Grup I), *Candida orthopsilosis* (Grup II) ve *Candida metapsilosis* (Grup III) olarak adlandırılmıştır. Bu türler fenotipik yöntemler ve biyokimyasal testlerle birbirinden ayırt edilememektedir [15,16]. Çalışmamızda VITEK MS sisteminin veri tabanı olan IVD **(Versiyon 3.2),** *Candida orthopsilosis* gibi birçok yeni türü içerdiği için tanımlama oranımız bu çalışmaya göre daha yüksek (%96.8) bulunmuştur.

Çalışmamıza dış merkezden *Candida guilliermondii* olarak gönderilen iki izolat MALDI Biotyper ile identifiye edilemezken, VITEK MS ile sadece biri *Candida guilliermondii* olarak isimlendirilmiştir. Bu suşlar ITS dizi analiziyle *Meyerozyma caribbica* (anamorfu *Candida fermentati*) olarak tanımlanmıştır. *Meyerozyma caribbica,* MALDI Biotyper veri tabanında yoktur; VITEK MS IVD veri tabanında ise *Candida fermentati* olarak bulunmaktadır. Literatürde de MALDI Biotyper ve VITEK MS sistemlerinin *M. guilliermondii* kompleks içinde yer alan *Meyerozyma caribbica* ve *Meyerozyma guilliermondii* türlerinin ayrımını yapamadığı bildirilmiştir [48]. *Meyerozyma caribbica* (anamorfu *Candida fermentati*), *Meyerozyma guilliermondii (*anamorfu *Candida guilliermondii) ile birlikte Meyerozyma (Candida) guilliermondii* kompleks içerisinde yer alan türlerden biridir. Bu kompleks içindeki türler fenotipik olarak birbirlerinden ayırt edilemezler ve birbirleri ile yakın ilişkilidirler [31, 106, 107]. Laboratuvarda yanlış olarak identifiye

edilebilirler [31]. Lockhart ve ark. [108] 149 global *Candida guilliermondii* izolatı içinde *Candida fermentati* varlığını araştırdıkları çalışmalarında 13 suşun *Candida fermentati* olduğunu göstermişlerdir. *Candida guilliermondii albicans* dışı *Candida'* lar içinde kan dolaşımı enfeksiyonlarının %1-5'inde etken olan yeni ortaya çıkan (emerging) patojenlerden biridir [31]. *Candida guilliermondii* flukonazole azalmış duyarlılık ve ekinokandinler için nispeten yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan klinik olarak önemlidir [108].

Mizusawa ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada *Candida auris'*in veri tabanlarındaki eksikliklerinden dolayı MALDI Biotyper ve VITEK MS sistemlerinin IVD kütüphaneleriyle tanımlanamayıp, RUO kütüphaneleriyle tanımlandığını bildirmişlerdir [109]. Ama bizim çalışmamızda bir *Candida auris* izolatı iki MALDI-TOF MS sisteminin IVD kütüphanesi ile doğru tanımlanmıştır. Taksononomik gelişmeler ışığında veri tabanlarının güncellenmesi doğru tanımlama oranlarını arttıracaktır.

MALDI-TOF MS sistemlerinde uygulanan lizis yöntemi, kullanılan besiyeri, inkübasyon süreleri gibi faktörlerin sistemin performansında etkili olabildiği gösterilmiştir [84,110, 111] Wang ve ark. [110] *225 Candida tropicalis* izolatını her iki MALDI TOF MS sisteminde, yedi farklı besiyerinden (kanlı agar, SDA, CHROMagar, Mac Conkey, vb) izole ederek tanımlamış ve farklı kültür ortamlarının sonuçları etkilediğini göstermişlerdir. Çalışmamızda BD besiyeri kullanılarak VITEK MS sisteminde tanımlanamayan 22 izolat; firma önerisi üzerine BMX besiyerinden tekrar çalışılmış ve 18 izolatın tanımlanabildiği görülmüştür. Bunun üzerine bu 22 izolata ek olarak MALDİ Biotyper sisteminde tanımlanamayan bir izolat dahil edilerek şartların optimizasyonu için aynı gün, aynı inkübasyon koşullarında BD ve BMX besiyerlerinden elde edilen pasajlarından VITEK MS sisteminde tekrar çalışılmıştır. VITEK MS sisteminde firma önerisi olan BMX besiyerinden yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek tanımlama oranları saptanmıştır. MALDI-TOF MS sistemleri kullanılırken üretici firma önerilerilerinin dikkate alınması, sistemin yüksek performans gösterebilmesinde etkili olmaktadır.

Ülkemizde MALDI-TOF MS sistemlerinin ve moleküler yöntemlerin, maliyetinin yüksek olmasından dolayı kullanımı sınırlıdır. Rutin laboratuvarlarda genellikle biyokimyasal testleri (asimilasyon, fermentasyon testleri) temel alan ticari kitler, otomatize ve yarı otomatize sistemler kullanılmaktadır [76]. Türkiye'de Özcan ve ark. [80] ; *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida glabrata* türlerinden oluşan toplam 164 izolat ile 26S rDNA dizi analizi temel alarak, API ID 32C ve VITEK MS yöntemlerinin duyarlılık ve maliyet etkinliklerini araştırmışlardır. VITEK MS ve API ID 32C sonuçları %100 uyumlu bulunmuş ve kültürden sonraki tanımlama süreleri API ID 32C, VITEK MS ve 26S rDNA D1/D2 dizi analizi için sırasıyla '24-48 saat', '3-5 dk' ve '6.5'saat olarak saptanmıştır. Bir kökenin tanımlama maliyeti API ID 32C için 6€, VITEK MS için 1€, 26S rDNA dizi analizi için 25€ olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak VITEK MS sistemi, maya tanımlamasında kolay, ucuz, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak önerilmiş olup diğer sistemlerin de VITEK MS sistemi kadar güvenilir olduklarını saptamışlardır [80]. Başka bir çalışmada Barış ve ark. [76] yaygın görülen sekiz türden oluşan 100 *albicans* dışı *Candida i*zolatınn tanımlanmasında fenotipik konvansiyonel yöntemler (kromojenik besiyeri, API 20C AUX sistemi), VITEK MS yöntemi ve ITS dizi analizini değerlendirmiştir. Çalışmada VITEK MS yöntemi ile %98, konvansiyonel yöntemlerle %95 oranında doğru tanımlama yapıldığı, zaman açısından yapılan değerlendirmede MALDİ-TOF MS sisteminin diğer yöntemlere kıyasla en avantajlı yöntem olduğu belirtilmiştir [76]. Bir başka çalışmada ise Erdem ve ark. [112] DNA dizi analizini altın standart yöntem kabul edilerek 27 *Candida* izolatını API ID 32C maya tanımlama sistemi ve MALDI Biotyper sistemiyle tanımlayarak duyarlılıklarını sırasıyla %78 ve % 81 olarak belirlemiştir. Marucco ve ark. [8] yaptığı çalışmada ise dokuz tür içeren 192 maya izolatının tanımlanmasında BD Phoenix ve MALDI Biotyper sistemleri arasında %95 oranında uyum saptamıştır. BD Phoenix sistemi ile 10 izolat (%5) yanlış isimlendirilmiştir. BD Phoenix sisteminin *Candida* cinsinin ana türlerini tanımlamak için basit, güvenilir ve etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir [8]. Çalışmamızda ticari sistemlerden BD Phoenix sisteminin performansı değerlendirilmiştir. MALDI TOF MS sistemi ve dizi analizi sonuçları temel alındığında BD Phoenix sisteminde 126 izolat doğru

tanımlanmış, 22 izolat yanlış tanımlanmış ve dokuz izolat tanımlanamamıştır. Çalışmamızda BD Phoenix ve MALDI-TOF MS sistemlerinin uyumu %80.3 olarak bulunmuştur. Çalışmada *Candida tropicalis, Candida glabrata, Candida krusei* gibi sık izole edilen türlerde tanımlama oranı %100 iken, duyarlılığın daha düşük bulunmasının nedeninin çalışmamızda nadir görülen türlerin bulunmasından kaynaklanabileceğini düşünüyoruz.

Biyokimyasal temelli ticari sistemlerin karşılaştırılmasında; 211 maya izolatı API ID 32C (bioMerieux, Fransa) ve BD Phoenix ticari sistemlerinde uyum %75.4 olarak (159/211) saptanmıştır [113]. Sistemler arasındaki uyumsuz sonuçlar, izolatların morfolojik özellikleri dikkate alınarak çözümlenmeye çalışılmıştır. Çalışmalarında, BD Phoenix sisteminin API ID 32C'ye göre daha kısa sürede sonuç verdiği, sık izole edilen türlerde uyumun yüksek olması ve maliyetinin daha düşük olması gibi nedenlerle rutin laboratuvarlarda kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir [113]. Posteraro ve ark. [1] 250 maya izolatının (140 *Candida albicans*- 110 diğer maya türleri) BD Phoenix ve VITEK 2 tanımlama sistemlerinde sırasıyla %96.3 ve %91.4'ünü doğru şekilde tanımlamışlardır.Çalışmada 26 nadir maya izolatının tanımlanmasında BD Phoenix'in performansı %61.5 (16/26) bulunmuştur. Her iki sisteminde klinik maya türlerinin tanımlanmasındaa iyi performans gösterdiğini ve BD Phoenix'in VITEK 2 sisteminden daha üstün olduğun belirtmişlerdir. [1]. Bir başka çalışmada Kim ve ark. [85] BD Phoenix sistemiyle 55 maya izolatının 40'ının (%72.7) doğru, sekizinin (%14.5) yanlış olarak tanımlandığını, yedi (%12.7) izolatın tanımlanamadığını bildirmiştir. Çalışmada yanlış tanımlanan izolatlardan iki *Candida auris* izolatının biri *Candida catenulata* diğeri *Candida haemulonii* olarak, iki *Candida lusitaniae* izolatı ise *Candida melibiosica* olarak yanlış tanımlamıştır. Çalışmamızda BD Phoenix sistemi ile sık görülen (*Candida parapsilosis* kompleks, *Candida glabrata, Candida tropicalis* ve *Candida krusei)* izolatların tümü doğru tanımlanırken nadir görülen 57 maya izolatının %45.6'sını tanımlanabilmiştir.Çalışmamızda Kim ve ark (85) çalışmasına paralel olarak; bir *Candida auris* izolatı *Candida haemulonii* olarak, üç *Candida lusitaniae* izolatı *Candida melibiosica* olarak yanlış tanımlamıştır. *Candida auris* Phoenix sisteminin veri tabanında yoktur. BD Phoenix sistemi ile sık görülen maya izolatlarında yüksek

tanımlama oranları görülmektedir. Ancak nadir görülen izolatların klinik önemi gün geçtikçe arttığı için veri tabanlarının genişletişmesi fayda sağlayacaktır.

Yapılan çalışmalarda, her iki MALDI-TOF MS sisteminin de (MALDI Biotyper ve VITEK MS) maya izolatlarının %90'ından fazlasını kısa sürede ve doğru olarak tanımlayabilen yüksek performanslı sistemler olduğu belirtilmiştir. Dezavantajı ise veri tabanında bazı türlerin bulunmaması veya yakın ilişkili türleri ayıramamasıdır [114]. MALDI-TOF MS sistemlerinin nadir maya türlerinin tanımlanmasında taksonomik yeni gelişmelere paralel olarak veri tabanlarının genişletilmesiyle duyarlılıkları artacaktır.

MALDI-TOF MS yönteminin maliyet incelemesine bakıldığında başlangıçta cihaz maliyeti yüksek olsa da, sarf maliyeti ihmal edilebilecek düzeydedir. Klinik açıdan bakılacak olursa tanı ve tedavideki gecikmenin hastanede kalış süresini uzatması ve ampirik olarak kullanılan ilaçların tüketimini arttırması da maliyeti önemli olarak etkilemektedir [115].

MALDI-TOF MS sistemleri ile mikrobiyolojik tanının hızlı olarak sonuçlanmasının, özellikle azollere duyarlı olmayan türlerle gelişen enfeksiyonların insidansındaki artış göz önünde bulundurulduğunda uygun tedaviye kısa sürede başlanarak hem klinik başarıyı arttırmasına hem de gereksiz harcamaların önlenmesine katkısı olacağını düşünüyoruz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda VITEK MS, MALDI Biotyper ve BD Phoenix için tanımlama oranları sırasıyla %96.8, %98.7 ve %80.3 olarak bulunmuştur.

BD Phoenix sistemi ile sık görülen maya izolatlarında yüksek tanımlama oranları görülürken, klinik önemleri gün geçtikçe artan nadir izolatlar için veri tabanlarının genişletilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Çalışmamızda MALDI-TOF MS (VITEK MS ve MALDI Biotyper) sistemlerinin hem sık görülen hem de nadir görülen klinik maya izolatlarının rutin tanımlanmasında hızlı ve duyarlılığı yüksek sistemler olduğu görülmüştür.

MALDI-TOF MS sistemlerinin taksonomik gelişmelere paralel olarak veri tabanlarının gün geçtikçe gelişmesi ile tanımlama oranlarının daha da yükselecektir.

VITEK MS sisteminde; firmanın maya tanımlanmasında önerdiği BMX marka SDA besiyerinde çalışılması ile istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek tanımlama oranları tespit edilmiştir. MALDI-TOF MS sistemleriyle çalışılırken firma önerilerine tamamen uyulması tanımlama oranlarını yükseltecektir.

Türkiye'de şimdiye kadar izole edilmemiş olan, çoklu ilaca direnç gösteren yeni bir *Candida* türü olan *Candida auris* iki MALDI-TOF MS sistemiyle de tanımlanabilmiştir.

Ülkemizde MALDI-TOF MS sistemleri sınırlı laboratuvarlarda kullanılan yeni bir sistem olduğu için mayaların incelendiği çalışma sayısı azdır. Bulgularımız, ülkemizde maya identifikasyonunda MALDI-TOF MS sistemleri ile ilgili sınırlı bilgiye katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. B. Posteraro *et al.*, "Comparative Evaluation of BD Phoenix and Vitek 2 Systems for Species Identification of Common and Uncommon Pathogenic Yeasts," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 11, pp. 3841–3845, Nov. 2013.
2. W. Y. Jamal, S. Ahmad, Z. U. Khan, and V. O. Rotimi, "Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 26, pp. 167–170, 2014.
3. C. Lacroix *et al.*, "Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of Candida species," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 2, pp. 153–158, 2014.
4. Arendrup, M. C., Boekhout, T., Akova, M., Meis, J. F., Cornely, O. A., Lortholary, O., & ESCMID EFISG study group and ECMM. (2014). ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*, 76-98..
5. L. Y. Young, C. M. Hull, and J. Heitman, "Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in Candida lusitaniae," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 47, no. 9, pp. 2717–2724, 2003.
6. "Candida glabrata Learn more about Candida Glabrata Autoregulation of Eukaryotic Transcription Factors Microbiology , Inflammation , and Viral infections," no. 73, 1998.
7. S. Wawrysiuk, T. Rechberger, K. Futyma, and P. Miotła, "Candida lusitaniae – A case report of an intraperitoneal infection," *Prz. Menopauzalny*, vol. 17, no. 2, pp. 94–96, 2018.
8. A. P. Marucco, P. Minervini, G. V. Snitman, A. Sorge, L. I. Guelfand, and L. L. Moral, "Comparison of the identification results of Candida species obtained by BD Phoenix™ and Maldi-TOF (Bruker Microflex LT Biotyper 3.1)," *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 50, no. 4, pp. 337–340, Oct. 2018.
9. N. Mancini *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.*, vol. 51, no. 7, pp. 2453–2457, 2013.
10. Arda. Mustafa. 'www.mikrobiyoloji.org 23.10.2019'
11. Wu, Y. M., Huang, P. Y., Lu, J. J., Shie, S. S., Ye, J. J., Wu, T. S., & Huang, C. T. (2018). Risk factors and outcomes of candidemia caused by Candida parapsilosis complex in a medical center in northern Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *90*(1), 44-49.
12. ' http://www.clinicalfungi.org/ 14.09.2019'

13. A. Lupetti *et al.*, “Horizontal transmission of Candida parapsilosis candidemia in a neonatal intensive care unit,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 7, pp. 2363–2369, 2002.
14. J. Nosek, Z. Holesova, P. Kosa, A. Gacser, and L. Tomaska, “Biology and genetics of the pathogenic yeast Candida parapsilosis,” *Curr. Genet.*, vol. 55, no. 5, pp. 497–509, 2009.
15. S. Neji *et al.*, “Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among Candida parapsilosis kompeks isolates recovered from clinical specimens,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–16, 2017.
16. A. Tavanti, A. D. Davidson, N. a R. Gow, M. C. J. Maiden, and F. C. Odds, “Candida parapsilosis Groups II and III,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 1, pp. 284–292, 2005.
17. S. Neji *et al.*, “Molecular study of the Candida parapsilosis kompeks in Sfax, Tunisia,” *Med. Mycol.*, vol. 55, no. 2, pp. 137–144, 2017.
18. A. L. Colombo, J. N. D. A. Júnior, and J. Guinea, “Emerging multidrug-resistant Candida species,” *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 30, no. 6, pp. 528–538, 2017.
19. D. L. Zuza-Alves, W. P. Silva-Rocha, and G. M. Chaves, “An update on Candida tropicalis based on basic and clinical approaches,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. OCT, pp. 1–25, 2017.
20. S. Silva, M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams, and J. Azeredo, “Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 36, no. 2, pp. 288–305, 2012.
21. L. Y. Ann Chai, D. W. Denning, and P. Warn, “Candida tropicalis in human disease,” *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 36, no. 4, pp. 282–298, 2010.
22. L. Kasper, K. Seider, and B. Hube, “Intracellular survival of Candida glabrata in macrophages: Immune evasion and persistence,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 15, no. 5, pp. 1–12, 2015.
23. C. F. Rodrigues, S. Silva, and M. Henriques, “Candida glabrata: A review of its features and resistance,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 33, no. 5, pp. 673–688, 2014.
24. J. Corcoran, “Living with mental disorder: insights from qualitative research,” vol. 12, no. 1, pp. 80–96, 2016.
25. T. Strain, C. Albicans, and C. Lusitaniae, “Candida Lusitaniae Learn more about Candida Lusitaniae,” no. 2002, pp. 2–6, 2011.
26. Z. Khan, S. Ahmad, N. Al-Sweih, S. Khan, and L. Joseph, “Candida lusitaniae in Kuwait: Prevalence, antifungal susceptibility and role in neonatal fungemia,” *PLoS One*, vol. 14, no. 3, pp. 1–14, 2019.
27. Z. Khan, S. Ahmad, K. Al-Obaid, L. Joseph, and R. Chandy, “Candida kefyr as a cause of bloodstream infection and adjunctive role of biomarkers in its diagnosis,” *J. Mycol. Med.*, vol. 25, no. 1, pp. 71–75, 2015.
28. T. Cuhadar and A. Kalkanci, “Onem Kazanan Patojen: Candida kefyr (Kluvyeromyces marxianus),” *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 51, no. 4, pp. 387–395, 2017.

29. S. F. Dufresne *et al.*, "Epidemiology of Candida kefyr in patients with hematologic malignancies," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 52, no. 6, pp. 1830–1837, 2014.
30. M. Sanchis, A. Martin-Vicente, J. Capilla, and J. Guarro, "Antifungal therapies in murine infections by Candida kefyr," *Mycoses*, vol. 59, no. 4, pp. 253–258, 2016.
31. Romi, W., Keisam, S., Ahmed, G., & Jeyaram, K. (2014). Reliable differentiation of Meyerozyma guilliermondii from Meyerozyma caribbica by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC microbiology*, *14*(1), 52.
32. D. J. Sullivan, T. J. Westerneng, K. A. Haynes, D. E. Bennett, and D. C. Coleman, "Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals," *Microbiology*, vol. 141, no. 7, pp. 1507–1521, 1995.
33. D. Sullivan and D. Coleman, "Candida dubliniensis: Characteristics and identification," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 329–334, 1998.
34. S. Perea *et al.*, "Molecular mechanisms of fluconazole resistance in Candida dubliniensis isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, no. 6, pp. 1695–1703, 2002.
35. A. Sebti *et al.*, "Candida dubliniensis at a Cancer Center," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 32, no. 7, pp. 1034–1038, 2001.
36. M. Kordalewska, Y. Zhao, S. R. Lockhart, A. Chowdhary, I. Berrio, and D. S. Perlin, "Rapid and accurate molecular identification of the emerging multidrug-resistant pathogen Candida auris," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, no. 8, pp. 2445–2452, 2017.
37. V. Mixão, A. P. Hansen, E. Saus, T. Boekhout, C. Lass-Florl, and T. Gabaldón, "Whole-genome sequencing of the opportunistic yeast pathogen candida inconspicua uncovers its hybrid origin," *Front. Genet.*, vol. 10, no. APR, pp. 1–11, 2019.
38. 'https://www.ekmud.org.tr/ 23.12.2019'
39. Murray, Patrick R., ed. *Manual of clinical microbiology. 2*. ASM Press, 2003.
40. Y. H. Samaranayake and L. P. Samaranayake, "Candida krusei: Biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen," *J. Med. Microbiol.*, vol. 41, no. 5, pp. 295–310, 1994.
41. B. Sancak, D. Menemenlioğlu, N. Gürkan Aydin, S. Ergüven, and S. Arikan, "Molecular typing of clinical candida Krusei isolates by using restriction endonuclease analysis of genomic DNA and polymerase chain reaction," *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 42, no. 4, pp. 635–644, 2008.
42. M. A. Pfaller *et al.*, "Candida krusei, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 2, pp. 515–521, 2008.
43. A. P. Douglass *et al.*, "Population genomics shows no distinction between pathogenic Candida

krusei and environmental Pichia kudriavzevii: One species, four names," *PLoS Pathog.*, vol. 14, no. 7, pp. 1–27, 2018.

44. O. Ruiz *et al.*, "Effects of Candida norvegensis live cells on in vitro oat straw rumen fermentation," *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, vol. 29, no. 2, pp. 211–218, 2016.
45. A. Pérez-Hansen *et al.*, "Antifungal susceptibility profiles of rare ascomycetous yeasts," *J. Antimicrob. Chemother.*, no. i, pp. 1–8, 2019.
46. D. Yarrow and S. A. Meyer, "Proposal for amendment of the diagnosis of the genus Candida Berkhout nom. cons.," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 28, no. 4, pp. 611–615, 1978.
47. J. Guitard *et al.*, "Candida inconspicua and candida norvegensis: New insights into identification in relation to sexual reproduction and genome organization," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 5, pp. 1655–1661, 2015.
48. H. Wang *et al.*, "A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 54, no. 5, pp. 1376–1380, Feb. 2016.
49. J. Guitard *et al.*, "Invasive infections due to Candida norvegensis and Candida inconspicua: Report of 12 cases and review of the literature," *Med. Mycol.*, vol. 51, no. 8, pp. 795–799, 2013.
50. N. Al-Sweih, S. Ahmad, S. Khan, L. Joseph, M. Asadzadeh, and Z. Khan, "Cyberlindnera fabianii fungaemia outbreak in preterm neonates in Kuwait and literature review," *Mycoses*, vol. 62, no. 1, pp. 51–61, 2019.
51. H. Hof, V. Amann, C. Tauber, and A. Paulun, "Peritonitis in a neonate due to Cyberlindnera fabianii, an ascomycetic yeast," *Infection*, vol. 45, no. 6, pp. 921–924, 2017.
52. M. Fernández-Ruiz *et al.*, "Fungemia due to rare opportunistic yeasts: Data from a population-based surveillance in Spain," *Med. Mycol.*, vol. 55, no. 2, pp. 125–136, 2017.
53. W. Watanasrisin *et al.*, "Identification and characterization of Candida utilis multidrug efflux transporter CuCdr1p," *FEMS Yeast Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 1–12, 2016.
54. W. C. Huang and I. C. Tang, "Bacterial and Yeast Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications," *Bioprocess. Value-Added Prod. from Renew. Resour.*, pp. 185–223, 2007.
55. C. Buerth, D. Tielker, and J. F. Ernst, "Candida utilis and Cyberlindnera (Pichia) jadinii: yeast relatives with expanding applications," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 16, pp. 6981–6990, 2016.
56. A. Lukic-Grlić, E. Mlinarić-Missoni, I. Škaric, V. Važic-Babić, and I. K. Svetec, "Candida utilis candidaemia in neonatal patients," *J. Med. Microbiol.*, vol. 60, no. 6, pp. 838–841, 2011.
57. H. Biology, J. Yockey, L. Andres, M. Carson, J. J. Ory, and A. J. Reese, "Cell Envelope Integrity and Capsule Characterization of Rhodotorula mucilaginosa Strains from Clinical and Environmental Sources," pp. 1–18.

58. H. M. Gan *et al.*, “Whole genome sequencing of Rhodotorula mucilaginosa isolated from the chewing stick (Distemonanthus benthamianus): insights into Rhodotorula phylogeny , mitogenome dynamics and carotenoid biosynthesis,” no. 2017.
59. J. M. Nunes, F. C. Bizerra, R. Carmona E Ferreira, and A. L. Colombo, “Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental Rhodotorula species isolates,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 1, pp. 382–389, 2013.
60. I. Falces-romero, E. Cendejas-bueno, H. Universitario, L. Paz, H. Universitario, and L. Paz, “Isolation of Rhodotorula mucilaginosa from blood cultures in a tertiary care hospital,” pp. 0–1.
61. M. A. Eldarov, S. A. Kishkovskaia, T. N. Tanaschuk, and A. V Mardanov, “Genomics and Biochemistry of Saccharomyces cerevisiae Wine Yeast Strains,” vol. 81, no. 13, pp. 1650–1668.
62. H. Tada, E. Nemoto, H. Shimauchi, and T. Watanabe, “Saccharomyces cerevisiae - and Candida albicans - Derived Mannan Induced Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by Human Monocytes in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner,” vol. 46, no. 7, 2002.
63. H. Ho, K. Haynes, S. Road, and D. Ex, “Candida glabrata : new tools and technologies — expanding the toolkit INTRODUCTION TO CANDIDA SPECIES : A,” pp. 1–14, 2009.
64. C. Duarte-Oliveira, F. Rodrigues, S. M. Gonçalves, G. H. Goldman, A. arvalho, and C. Cunha, “The cell biology of the Trichosporon-host interaction,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. APR, pp. 1–8, 2017.
65. J. Dylewski, “Nucleic Acid Amplification Testing for the Diagnosis of Tuberculosis: Not for All,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 49, no. 9, pp. 1456–1457, 2009.
66. V. Rastogi, P. Honnavar, S. M. Rudramurthy, U. Pamidi, A. Ghosh, and A. Chakrabarti, “Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical Trichosporon isolates in India,” *Mycoses*, vol. 59, no. 8, pp. 528–534, 2016.
67. H. B. and J. B. Esmer Jongedijk1, Katarina Cankar1, 2, Jorn Ranzijn1, Sander van der Krol1, “Capturingofthemonoterpeneolefinlimoneneproduced in Saccharomyces cerevisiae .,” *Yeast*, vol. 26, no. 10, pp. 545–551, 2009.
68. J. A. Alspaugh, “Virulence mechanisms and Cryptococcus neoformans pathogenesis,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 78, pp. 55–58, 2015.
69. W. Huang *et al.*, “Lipid flippase subunit Cdc50 mediates drug resistance and virulence in Cryptococcus neoformans,” *MBio*, vol. 7, no. 3, pp. 1–13, 2016.
70. A. Pitarch, C. Nombela, and C. Gil, “Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard Methods to Promising Leading-edge Technologies,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 18, no. 16, pp. 1375–1392, 2018.

71. 'http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=22902 23.12.2019'
72. S. C. Deorukhkar, “Identification of Candida Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis,” *Ann. Microbiol. Immunol.*, vol. 1, no. 1, p. 1002, 2018.
73. B. Willinger, C. Hillowoth, B. Selitsch, and M. Manafi, “Performance of candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of Candida species, in comparison to CHROMagar Candida,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, no. 10, pp. 3793–3795, 2001.
74. F. C. Odds and R. Bernaerts, “CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 32, no. 8, pp. 1923–1929, 1994.
75. A. Kumar, A. Sachu, K. Mohan, V. Vinod, K. Dinesh, and S. Karim, “Diferenciación sencilla y de bajo coste de Candida auris del complejo Candida haemulonii con el empleo del medio CHROMagar Candida enriquecido con medio de Pal,” *Rev. Iberoam. Micol.*, vol. 34, no. 2, pp. 109–111, 2017.
76. Barış, A. (2014) Klinik örneklerden izole edilen *albicans* dışı *Candida* türlerinin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler, MALDI-TOF-MS ve dizi analizi yöntemlerinin araştırılması (Yandal Uzmanlık Tezi)
77. Patel, Robin. "A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification." *Journal of Fungi* 5.1 (2019): 4.
78. Lévesque, Simon, et al. "A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory." *PLoS One* 10.12 (2015): e0144878.
79. Porte, Lorena, et al. "Head-to-head comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in Chile." *PloS one* 12.5 (2017): e0177929.
80. Özcan, E. *Candıda* türlerinin tanımlanmasında 26s rDNA dizi analizi temel alınarak ‘API ID 32C’ ve ‘MALDI TOF MS’ yöntemlerinin duyarlılık ve maliyet etkinliklerinin araştırılması (Uzmanlık tezi)
81. M. Reich, “Species Identification of Bacteria and Fungi from Solid and Liquid Culture Media by MALDI-TOF Mass Spectrometry,” *J. Bacteriol. Parasitol.*, vol. 01, no. S5, 2013.
82. Vlek, Anneloes, et al. "Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry using a yeast test panel." *Journal of clinical microbiology* 52.8 (2014): 3023-3029.
83. M. A. Pence, E. McElvania TeKippe, M. A. Wallace, and C. A. D. Burnham, “Comparison and optimization of two MALDI-TOF MS platforms for the identification of medically relevant yeast species,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 33, no. 10, pp. 1703–1712, 2014.

84. H. S. Lee *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.*, vol. 37, no. 3, pp. 223–230, 2017.
85. T. H. Kim, O. J. Kweon, H. R. Kim, and M. K. Lee, “Identification of uncommon Candida species using commercial identification systems,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 12, pp. 2206–2213, Dec. 2016.
86. Schoch, Conrad L., et al. "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi." Proceedings of the National Academy of Sciences109.16 (2012): 6241-6246.
87. Kılıç, Selim. "Kappa Testi." *Journal of Mood Disorders* 5.3 (2015)
88. Akalın H. Kandidemide risk faktörleri ve risk değerlendirmesi. ANKEM Derg 2008;22(ek 2):270-74
89. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. Clinical Mycology. New York: Oxford University Press. 2003;141-188.
90. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC,Woods GL. Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edn. Philadelphia: PA Lippincott Co. 2006;1151-1242.
91. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Jpn J Med Mycol 2007;48:1-12.
92. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a Persistent public health problem. Clini Microbiol Rev 2007;20(1):133-163.
93. Mikulska M, Del Bono V, Rotto S, Viscoli C. Occurrence presentation and treatment of candidemia. Expert Rev Clin Immunol 2012;8(8):755-765.
94. Pincus DH, Orenga S, Chatellier S. Yeast İdentification-Past, Present, and Future Methods. Med Mycol 2007;45:97-121.
95. Sanguinetti, Maurizio, and Brunella Posteraro. "Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry." *Journal of clinical microbiology* 55.2 (2017): 369-379.
96. Hamprecht, A., Christ, S., Oestreicher, T., Plum, G., Kempf, V. A., & Göttig, S. (2014). Performance of two MALDI-TOF MS systems for the identification of yeasts isolated from bloodstream infections and cerebrospinal fluids using a time-saving direct transfer protocol. *Medical microbiology and immunology*, *203*(2), 93-99.
97. S. Q. Van Veen, E. C. J. Claas, and E. J. Kuijper, “High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 900–907, 2010.

98. M. Fraser, Z. Brown, M. Houldsworth, A. M. Borman, and E. M. Johnson, "Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database," *Med. Mycol.*, 2016.

99. Dhiman, N.; Hall, L.; Wohlfiel, S.L.; Buckwalter, S.P.; Wengenack, N.L. 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, 1614–1616.

100. Bader, Oliver. "MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology." *Proteomics* 13.5 (2013): 788-799.

101. Cassagne, C., Cella, A. L., Suchon, P., Normand, A. C., Ranque, S., & Piarroux, R. (2013). Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Medical mycology*, *51*(4), 371-377.

102. Westblade, L.F.; Jennemann, R.; Branda, J.A.; Bythrow, M.; Ferraro, M.J.; Garner, O.B.; Ginocchio, C.C.; Lewinski, M.A.; Manji, R.; Mochon, A.B.; et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. J. Clin. Microbiol. **2013**, 51, 2267–2272

103. Won, E.J.; Shin, J.H.; Lee, K.; Kim, M.N.; Lee, H.S.; Park, Y.J.; Joo, M.Y.; Kim, S.H.; Shin, M.G.; Suh, S.P.; et al. Accuracy of species-level identification of yeast isolates from blood cultures from 10 university hospitals in South Korea by use of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based Vitek MS system. J. Clin. ü Microbiol. **2013**, 51, 3063–3065

104. Chen, J. H., Yam, W. C., Ngan, A. H., Fung, A. M., Woo, W. L., Yan, M. K., ... & Yuen, K. Y. (2013). Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. *Journal of clinical microbiology*, *51*(12), 3981-3987.

105. Chao, Q. T., Lee, T. F., Teng, S. H., Peng, L. Y., Chen, P. H., Teng, L. J., & Hsueh, P. R. (2014). 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*, *9*(10), e109376

106. Merseguel, Karina Bellinghausen, et al. "Genetic diversity of medically important and emerging Candida species causing invasive infection." *BMC infectious diseases* 15.1 (2015): 57.

107. De Marco, Leone, et al. "The genomes of four Meyerozyma caribbica isolates and novel , insights into the Meyerozyma guilliermondii species complex." *G3: Genes, Genomes, Genetics* 8.3 (2018): 755-759

108. Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2009). Identification and susceptibility profile of Candida fermentati from a worldwide collection of Candida

guilliermondii clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, *47*(1), 242-244.

109. Mizusawa, M., Miller, H., Green, R., Lee, R., Durante, M., Perkins et al. (2017). Can multidrug-resistant Candida auris be reliably identified in clinical microbiology laboratories?. *Journal of clinical microbiology*, *55*(2), 638-640.

110. Wang, H., Li, Y., Fan, X., Chiueh, T. S., Xu, Y. C., & Hsueh, P. R. (2019). Evaluation of Bruker Biotyper and Vitek MS for the identification of Candida tropicalis on different solid culture media. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *52*(4), 604-611.

111. Cassagne, Carole, et al. "Routine identification and mixed species detection in 6,192 clinical yeast isolates." *Sabouraudia* 54.3 (2015): 256-265.

112. Erdem, H., Erganiş, S., Evren, E., Aksakal, F. N., Çağlar, K., & Kalkancı, A. Candida cinsi mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırmalı analizi.

113. GAYIBOVA, Ü., CİLO, B. D., Harun, A. Ğ. C. A., & Beyza, E. N. E. R. (2014). Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida Türlerinin Tanımlanmasında Phoenix™ Yeast ID Panel ile API® ID 32C Ticari Sistemlerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*, *48*(3), 438-448.

114. C. G. Taverna, M. Mazza, N. Refojo, and G. Davel, "A Comprehensive Analysis of MALDI-TOF MS and Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Clinical Yeasts," *Current Fungal Infection Reports*, vol. 11, no. 4. Current Medicine Group LLC 1, pp. 184–189, 01-Dec-2017.

115. Bader, Oliver. "MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology." *Proteomics* 13.5 (2013): 788-799.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Leyla Teke

Doğum yeri ve tarihi: Avusturya 04.02.1990

Uyruğu: T. C.

Medeni durumu: Bekar

Askerlik durumu:

İletişim adresi ve telefonu: Meşrutiyet Mahallesi Suna Kıraç Sokak Kavuşer Apt.

No:6 Kat:2 Şişli/İstanbul leyla_teke@hotmail.com 0554 592 22 75

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2015-2019: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü

2011-2014: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

2008-2011: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi

2004-2008: Denizli Anadolu Lisesi

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2014-2016: Pratisyen Dr.

2016: Asistan Dr.

IV- Mesleki Deneyimi

Denizli Devlet Hastanesi (Pratisyen Dr.)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (TMC)

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: (Ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap/kitap bölümü vb.)

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

-Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

-Geçmişten Günümüze PZT ve Yeni Nesil DNA Dizi Analizi Kursu-Ankara Mikrobiyoloji Derneği, Malatya 2018

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri

EKLER

EK 1

No	MALDI Biotyper	MALDI Biotyper RUO	MALDI Biotyper IVD	VITEK MS IVD	BD PHOENİX
1	*Candida tropicalis*	2.05	2.079	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
2	*Candida glabrata*	2.243	2.233	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
3	*Candida orthopsilosis*	1.823	1.943	*Candida orthopsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
4	*Kodamaee ohmeri*	2.052	1.962	*Candida guilliermondii*	***Candida albicans***
5	*Candida tropicalis*	1.801	1.859	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
6	*Candida parapsilosis*	2.177	2.287	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
7	*Candida lusitaniae*	2.256	2.002	*Candida lusitaniae*	*Candida lusitaniae*
8	*Candida parapsilosis*	2.239	2.363	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
9	*Candida parapsilosis*	2.27	2.337	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
10	*Candida glabrata*	2.181	2.133	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
11	*Candida orthopsilosis*	1.882	1.979	*Candida orthopsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
12	*Candida kefyr*	2.115	2.129	*Candida kefyr*	*Candida kefyr*
13	*Candida parapsilosis*	2.348	2.33	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
14	*Candida glabrata*	2.148	2.144	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
15	*Candida glabrata*	2.153	2.042	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
16	*Candida glabrata*	2.194	2.137	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
17	*Candida parapsilosis*	2.256	2.307	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
18	*Candida parapsilosis*	2.027	2.01	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
19	*Candida parapsilosis*	2.193	2.335	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
20	*Candida parapsilosis*	2.15	2.332	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
21	*Candida kefyr*	1.861	1.928	*Candida kefyr*	***Saccharomyces cerevisiae***
22	*Candida parapsilosis*	2.212	2.262	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
23	*Candida parapsilosis*	2.226	2.348	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
24	*Candida kefyr*	2.041	2.135	*Candida kefyr*	*Candida kefyr*
25	*Candida tropicalis*	2.125	2.131	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*

26	*Candida dubliniensis*	2.141	1.935	*Candida dubliniensis*	***Candida albicans***
27	*Candida tropicalis*	1.953	1.853	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
28	*Candida glabrata*	2.241	2.109	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
29	*Candida glabrata*	2.244	2.249	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
30	*Candida metapsilosis*	2.077	2.232	*Candida metapsilosis*	***Candida sake***, *Candida parapsilosis kompeks*
31	*Candida glabrata*	2.19	2	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
32	*Candida tropicalis*	2.119	2.18	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
33	*Candida glabrata*	2.148	2.12	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
34	*Kodamaee ohmeri*	2.047	2.128	*Candida guilliermondii*	***Candida albicans***
35	*Candida parapsilosis*	2.076	2.264	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
36	*Candida parapsilosis*	2.235	2.323	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
37	*Candida glabrata*	2.12	2.069	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
38	*Candida parapsilosis*	2.267	2.349	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
39	*Candida glabrata*	2.07	2.188	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
40	*Candida glabrata*	2.149	2.258	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
41	*Candida parapsilosis*	2.276	2.022	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
42	*Candida kefyr*	2.029	2.019	*Candida kefyr*	*Candida kefyr*
43	*Candida kefyr*	1.993	2.05	*Candida kefyr*	*Candida kefyr*
44	*Candida glabrata*	2.018	2.297	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
45	*Candida lusitaniae*	2.089	2.058	*Candida lusitaniae*	**tanımlanamadı**
46	*Candida lusitaniae*	2.052	2.137	*Candida lusitaniae*	***Candida pulcherrima***
47	*Candida parapsilosis*	2.047	2.029	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
48	*Candida parapsilosis*	2.141	2.084	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
49	*Candida parapsilosis*	2.306	2.254	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
50	*Candida glabrata*	2.172	2.152	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
51	*Candida tropicalis*	2.192	2.02	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
52	*Candida lusitaniae*	2.043	2.157	*Candida lusitaniae*	***Candida melibiosica***
53	*Candida lusitaniae*	1.801	2.044	*Candida lusitaniae*	*Candida lusitaniae*
54	*Candida kefyr*	2.07	2.174	*Candida kefyr*	*Candida kefyr*
55	*Cryptococcus neoformans*	2.199	2.187	*Cryptococcus neoformans*	*Cryptococcus neoformans*
56	*Candida parapsilosis*	2.292	2.376	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
57	*Candida glabrata*	2.192	2.026	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*

58	*Candida parapsilosis*	2.314	2.277	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
59	*Candida parapsilosis*	2.408	2.239	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
60	*Candida guilliermondii*	2.117	2.332	*Candida guilliermondii*	*Candida guilliermondii*
61	*Candida parapsilosis*	2.009	2.131	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
62	*Candida parapsilosis*	2.169	2.135	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
63	*Candida parapsilosis*	1.748	1.881	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
64	*Candida tropicalis*	2.013	2.076	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
65	*Candida tropicalis*	2.181	2.212	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
66	*Candida tropicalis*	1.774	1.784	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
67	*Candida lusitaniae*	2.185	1.919	*Candida lusitaniae*	*Candida lusitaniae*
68	*Candida tropicalis*	2.125	2.149	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
69	*Candida parapsilosis*	2.074	2.086	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
70	*Candida parapsilosis*	2.213	2.013	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
71	*Candida tropicalis*	1.766	1.89	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
72	*Candida lusitaniae*	2.131	2.172	*Candida lusitaniae*	***Candida melibiosica***, *Candida lusitaniae*
73	*Candida parapsilosis*	2.178	2.04	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis*
74	*Candida tropicalis*	2.234	2.275	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
75	*Candida parapsilosis*	2.207	2.09	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
76	*Candida parapsilosis*	2.336	2.288	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
77	*Candida tropicalis*	2.082	2.103	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
78	*Candida parapsilosis*	2.137	2.27	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
79	*Candida parapsilosis*	2.222	2.008	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
80	*Candida parapsilosis*	2.277	2.233	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
81	*Candida tropicalis*	1.934	2.051	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
82	*Candida glabrata*	2.062	2.265	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
83	*Candida parapsilosis*	2.279	2.019	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
84	*Candida tropicalis*	1.944	2.025	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
85	*Candida lusitaniae*	1.972	2.084	*Candida lusitaniae*	***Candida melibiosica, Candida pulcherrima***
86	*Candida glabrata*	2.219	2.204	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
87	*Candida parapsilosis*	2.201	2.023	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
88	*Candida parapsilosis*	2.223	2.289	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
89	*Candida parapsilosis*	2.322	2.268	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*

90	*Candida tropicalis*	2.145	2.183	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
91	*Candida tropicalis*	1.961	2.062	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
92	*Candida tropicalis*	1.899	1.924	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
93	*Candida parapsilosis*	2.167	2.077	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
94	*Candida tropicalis*	2.058	2.146	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
95	*Candida glabrata*	2.113	2.298	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
96	*Candida kefyr*	1.866	1.934	*Candida kefyr*	***Saccharomyces cerevisiae***
97	*Candida glabrata*	2	2.154	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
98	*Candida parapsilosis*	2.268	2.261	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
99	*Candida glabrata*	2.034	2.047	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
100	*Candida krusei*	2.05	2.08	*Candida krusei*	*Candida krusei*
101	*Candida guilliermondii*	2.021	2.122	*Candida guilliermondii*	*Candida guilliermondii*
102	*Candida tropicalis*	2.05	2.135	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
103	*Candida tropicalis*	2.178	2	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
104	*Candida krusei*	2.1	2.2	*Candida krusei*	*Candida krusei*
105	*Candida lusitaniae*	2.025	2.121	*Candida lusitaniae*	*Candida lusitaniae*
106	*Candida parapsilosis*	2.279	2.261	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
107	*Candida tropicalis*	2.158	2.056	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
108	*Candida krusei*	2.192	2.086	*Candida krusei*	*Candida krusei*
109	*Trichosporon inkin*	2.103	2.12	*Trichosporon inkin*	*Trichosporon inkin*
110	*Candida parapsilosis*	2.286	2.319	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
111	*Candida krusei*	2.016	1.935	*Candida krusei*	*Candida krusei*
112	*Candida tropicalis*	2.134	2.212	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
113	*Candida dubliniensis*	2.01	2	*Candida dubliniensis*	***Candida albicans***, *Candida dubliniensis*
114	*candıda auris*	2.088	2.162	*candıda auris*	***Candida haemulonii***
115	*Candida krusei*	2.259	2.283	*Candida krusei*	*Candida krusei*
116	*Candida dubliniensis*	1.802	1.811	*Candida dubliniensis*	***Candida albicans***
117	*Candida tropicalis*	2.048	2.027	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
118	*Candida glabrata*	2.235	2.274	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
119	*Candida parapsilosis*	2.101	2.13	*Candida parapsilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
120	*Candida tropicalis*	2.102	2.026	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
121	*Candida tropicalis*	2.17	2.147	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*

122	*Candida tropicalis*	2.034	2	*Candida tropicalis*	*Candida tropicalis*
123	*Candida glabrata*	2.298	2.344	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
124	*Trichosporon asahii*	2.093	2.076	*Trichosporon asahii*	***Trichosporon inkin***
125	*Trichosporon asahii*	2.341	2.028	*Trichosporon asahii*	**tanımlanamadı**
126	*Candida utilis*	2.088	2.014	*Candida utilis*	*Candida utilis*
127	*Trichosporon asahii*	2.345	2.358	*Trichosporon asahii*	**tanımlanamadı**
128	*Cryptococcus neoformans*	2.201	2.136	*Cryptococcus neoformans*	*Cryptococcus neoformans*
129	*Saprochaete clavata*	1.827	1.905	*Saprochaete clavata*	***Trichosporon mucoides,*** *Geotricum species*
130	*Saprochaete clavata*	1.823	1.86	*Saprochaete clavata*	***Trichosporon mucoides,*** *Geotricum species*
131	*Saccharomyces cerevisiae*	1.813	1.781	*Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces cerevisiae*
132	*Saccharomyces cerevisiae*	2.025	2.069	*Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces cerevisae*
133	*Candida kefyr*	2.041	2	*Candida kefyr*	***Saccharomyces cerevisiae***
134	*Candida glabrata*	2.093	2.107	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
135	*Candida parapisilosis*	2.168	2.161	*Candida parapisilosis*	*Candida parapsilosis kompeks*
136	*Candida glabrata*	2.177	2.241	*Candida glabrata*	*Candida glabrata*
137	*Trichosporon asahii*	1.735	1.878	*Trichosporon asahii*	**tanımlanamadı**
138	*Candida inconspicua*	1.825	1.884	*Candida inconspicua*	***Prototheca wickerhamii***
139	*Saccharomyces cerevisiae*	2.032	2.105	*Saccharomyces cerevisiae*	***Zygosaccharomyces bailii,*** *Saccharomyces cerevisiae*
140	*Rhodotorula mucilaginosa*	2.128	2.174	*Rhodotorula mucilaginosa*	*Rhodotorula mucilaginosa*
141	*Candida inconspicua*	2.307	2.029	*Candida inconspicua*	**tanımlanamadı**
142	*Meyerozyma caribbica*	**tanımlanamadı**	**tanımlanamadı**	***Candida guilliermondii***	**tanımlanamadı**
143	*Trichosporon asahii*	1.857	2.08	*Trichosporon asahii*	***Trichosporon inkin***
144	*Meyerozyma caribbica*	**tanımlanamadı**	**tanımlanamadı**	**tanımlanamadı**	**tanımlanamadı**
145	*Geotrichum capitatum*	2.241	2.257	*Geotrichum capitatum*	*Magnusiomyces capitatus*
146	*Trichosporon asahii*	1.891	1.953	*Trichosporon asahii*	**tanımlanamadı**
147	*Trichosporon asahii*	1.837	2.062	*Trichosporon asahii*	*Trichosporon asahii*
148	*Saccharomyces cerevisiae*	1.808	1.907	*Saccharomyces cerevisiae*	*Saccharomyces cerevisiae*
149	*Trichosporon asahii*	2.048	2.14	*Trichosporon asahii*	**tanımlanamadı**
150	*Candida inconspicua*	1.966	2.01	*Candida inconspicua*	*Candida inconspicua*
151	*Candida dubliniensis*	2.182	2.185	**tanımlanamadı**	***Candida albicans***
152	*Trichosporon asahii*	2.13	2.066	*Trichosporon asahii*	*Trichosporon asahii*
153	*Cyberlindnera fabianii*	1.847	1.95	**tanımlanamadı**	***Candida pelliculosa***

154	*Rhodotorula mucilaginosa*	1.993	2.017	*Rhodotorula mucilaginosa*	***Cryptococcus albidus, Cryptococcus terreus***
155	*Candida norvegensis*	2.113	2.078	*Candida norvegensis*	***Prototheca zopfii, Candida inconspicua***
156	*Rhodotorula mucilaginosa*	2	1.857	*Rhodotorula mucilaginosa*	***Cryptococcus terreus, Sporobolomyces***
157	*Cyberlindnera fabianii*	2.135	2.135	**tanımlanamadı**	***Candida pelliculosa***