



# ***Candida* İzolatlarının Tür Düzeyinde Tanımlanmasında Altın Standart Yöntem Olan rDNA ITS1/2 Dizi Analizi ile VITEK 2 YEAST ID, API ID 32C ve MALDI-TOF MS Sistemlerinin Karşılaştırılması**

**Dilara Yıldırım<sup>1</sup>, Gülşen Hazırolan<sup>1</sup>, Zeynep Ceren Karahan<sup>2</sup>, Büşra Betül Özmen Çapın<sup>2</sup>, Altan Aksoy<sup>1</sup>, Neriman Aksu<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup>Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara, Türkiye**

**<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye**

Mikr. Uzm.

Dilara YILDIRAN

**GİRİŞ VE AMAÇ**

*Candida* türleri; cansız yüzeylerde, birçok hayvan ve insanın deri ve mukozasında yaşayan fırsatçı patojenler

Özellikle hastanede yatan immün sistemi zayıf hastalarda yüzeysel ve derin mikozlar



Transplantasyonlar da dahil büyük cerrahi girişimlerdeki artış

Bakım ve tedaviye yönelik yeni yaklaşımlar

Yoğun bakım ünitelerinde hastaların izlenme sürelerinin uzaması

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı

HIV ve AIDS hastalarının sayısında ve malign hastalıkların görülme sıklığındaki artış

Fungal enfeksiyonlarda hızlı ve doğru tanı koymak önemli

Riskli hasta gruplarında tanı öncesi ampirik ya da profilaktik tedavi

Antifungal tedavide en iyi başarı, erken ve doğru tanı

Geleneksel yöntemlerle mantar etkenlerinin saptanması günler hatta haftalar almakta

Bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü de düşük

Geleneksel bir yöntem olan kültür ile tanımlama zor

Geleneksel *Candida* tanımlamasında,  
makroskobik ve mikroskobik morfolojik  
karakterler;

Koloni rengi ve görünümü

Kromojenik agarda farklı  
renkte koloniler oluşurması

Hif veya yalancı hif üretimi

Çimlenme borusu  
oluşturması

Mısır unu-Tween 80 agarda  
(MUA) oluşturdukları  
morfolojik yapılar

Biyokimyasal özelliklerin  
değerlendirilmesi

Karbohidrat  
fermentasyon ve  
asimilasyonu

Nitrat asimilasyonu

Üre hidrolizi

## Ticari tanımlama panelleri

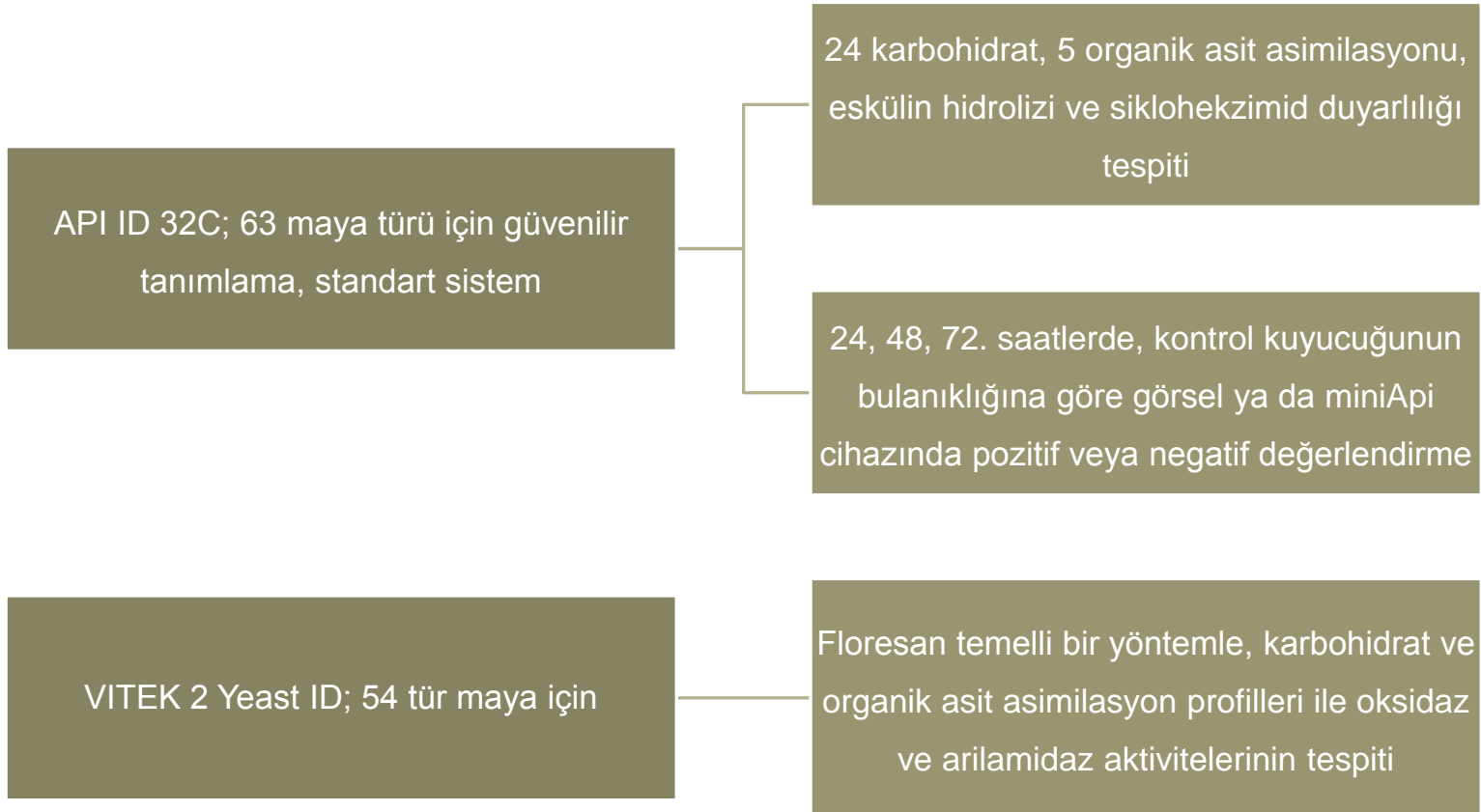
- API 20C AUX ve ID 32C
  - klasik yöntem gibi asimilasyon (48 saat)
- VITEK 2 Yeast ID, Phoenix Yeast ID
  - değişik karbohidratların asimilasyonu ve bazı enzimatik reaksiyonlar (24 saat)

Mayaları hızlı tanımlama amacıyla geliştirilen en yeni teknoloji, "Matrix assisted laser desorption-time of flight mass spectrofotometry" (MALDI-TOF MS)

- Referans veri tabanında yer alan organizmaya özgü kütle spektrumu ya da "protein parmak izi"

# CANDIDA TÜRLERİNİN TANIMLANMASI

## Ticari tanımlama panelleri





## **CANDIDA TÜRLERİNİN TANIMLANMASI**

### **Kütle spektrometrisi temelli yöntemler (MALDI-TOF MS)**

MALDI-TOF MS'te metal bir plaka üzerine damlatılan örnek ve matriks solüsyonu kurutulur. Cihaza yerleştirilen metal plakaya lazer ışınları ile vuruşlar yapıldıktan sonra, matriks ışığı emerek ilgilenilen molekül (proteinler) haline dönüştürür.

Mikroorganizmaya ait proteinlerin dedektöre çarpma zamanına göre kütle spektrumu oluşturulur ve mevcut veritabanındaki spektrumlarla karşılaştırılır.

# CANDIDA TÜRLERİNİN TANIMLANMASI

## Moleküler tanı yöntemleri

Direkt klinik örnekten ve kültürden izole edilen mayaların tanımlanmasında hızlı, güvenilir, duyarlılığı yüksek testler

- Özel laboratuvar koşulları ve yüksek maliyet
- Son yıllarda gen dizi analizine dayalı moleküler yöntemler ilk sırada
- En sık kullanılanlar; elektroforetik karyotip analizi, RFLP, Multipleks PZR, Nested PZR, Klasik PZR ve gerçek zamanlı PZR (duyarlılık ve özgüllük açısından önde)

PZR reaksiyonu; denatürasyon, hibridizasyon ve polimerizasyon sikluslarının belirli sayıda tekrarlanması

- Spesifik primerler örnekler üzerinde direkt kullanılabilir, diğer mikroorganizmalar veya konak DNA'sı amplifiye edilmiyor

# CANDIDA TÜRLERİNİN TANIMLANMASI

## Moleküler tanı yöntemleri

---

<b><i>Candida</i> türlerinin ayırımında birçok hedef gen bölgesi</b>	<p>En sık rRNA operonunun çoğaltılmasına dayalı yöntemler (bazı bölgelerinin korunmuş, bazı bölgelerinin aşırı değişken olmasından dolayı)</p> <hr/> <p>En yaygın ITS bölgeleri ve 28S rRNA D1/D2 bölgesi kullanılmakta</p> <hr/> <p>PZR ürünlerinin jel elektroforezi ile görüntülenmesi, direkt dizi analizi ya da genomun restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi sonucu RFLP yöntemi</p>
<b>DNA dizi analizleri: DNA birincil yapılarının tayini ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesi</b>	<p>Bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır</p> <hr/> <p>Radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme</p> <hr/> <p>Çeşitli gen bankalarının veritabanlarında yer alan mikroorganizmaların dizi analizleri ile karşılaştırma</p>

---

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanmasında VITEK 2 Yeast ID, API ID 32C ve MALDI-TOF MS ile elde edilen sonuçların, altın standart olarak kabul edilen nükleer rDNA ITS1/2 bölgelerinin dizi analizi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM**

---

Çalışmaya, Ocak 2013-Aralık 2013 tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilerek fenotipik yöntemlerle ve VITEK 2 Yeast ID otomatize sistemiyle tür tayini yapılan 90 *Candida* izolatı dahil edilmiştir.

---

*Candida* izolatlarının tanımlanmasında;

---

Çimlenme borusu oluşturma/oluşturmama özellikleri,

---

API ID 32C test kiti ile saptanan asimilasyon reaksiyonları,

---

Bruker Microflex LT Maldi Biotyper otomatize sistemi ile elde edilen kütle spektrumları ve

---

ABI Prism 3730xl DNA Analizöründe ITS-1/ITS-4 üniversal primerleri ile yapılan altın standart yöntem DNA dizi analizi kullanılmıştır (Ticari olarak hizmet alımı yapılmıştır).

BULGULAR

Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole ederek stokladığımız çok sayıda izolat arasında, mümkün olduğu oranda farklı türlere ait 90 adet *Candida* izolatı kullanılmıştır.

90 *Candida* izolatının;

51'i (%56.7) idrar,

21'i (%23.3) kan örneklerinden,

18'i (%20) ise diğer (periton, trakeal aspirat, balgam, yara) örneklerden izole edilmiştir.



# ALTIN STANDART YÖNTEM ITS1/2 DNA DIZI ANALIZI İLE ELDE EDİLEN TANIMLAMA SONUÇLARININ **GENBANKASI** ÜZERİNDEN EŞLEŞTİRİLMESİ

**Genbankası** üzerinden yapılan eşleştirmeler sonucunda, 90 adet *Candida* izolatu için elde edilen DNA dizi benzerliği yüzde oranlarının %89 ile %100 arasında değiştiği saptanmıştır.

1 adet *C. tropicalis* izolatu %89 ve

1 adet *C. inconspicua* izolatu %90 yüzde oranıyla dizi benzerliđi gösterirken,

Geriye kalan tüm izolatlar  $\geq$ %99 yüzde oranında dizi benzerliđi ile belirlenmiřtir.

**Tablo 1. Altın standart yöntem olan rDNA ITS1/2 dizi analizi ile VITEK 2, API ID 32C ve Bruker Microflex LT Maldi Biotyper (MALDI-TOF MS) sonuçlarının karşılaştırılması**

rDNA ITS1/2 dizi analizi (sayı)	İzolasyon sayısı (%)					
	Doğru Tanımlama			Yanlış Tanımlama		
	VITEK 2	API ID 32C	MALDI-TOF MS	VITEK 2	API ID 32C	MALDI-TOF MS
<i>C. tropicalis</i> (19)	14 (15.6)	19 (21.1)	19 (21.1)	5 (5.6)	0	0
<i>C. albicans</i> (15)	12 (13.3)	15 (16.7)	15 (16.7)	3 (3.3)	0	0
<i>C. glabrata</i> (15)	14 (15.6)	15 (16.7)	15 (16.7)	1 (1.1)	0	0
<i>C. kefyr</i> (13)	9 (10.0)	13 (14.4)	13 (14.4)	4 (4.4)	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (11)	9 (10.0)	11 (12.2)	11 (12.2)	2 (2.2)	0	0
<i>C. krusei</i> (11)	11 (12.2)	10 (11.1)	11 (12.2)	0	1 (1.1)	0
<i>C. lusitaniae</i> (2)	2 (2.2)	2 (2.2)	2 (2.2)	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i> (1)	1 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (1)	1 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)	0	0	0
<i>C. inconspicua</i> (1)	0 (0.0)	1 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)	0	0
<i>C. norvegensis</i> (1)	1 (1.1)	1 (1.1)	1 (1.1)	0	0	0
<b>Toplam (90)</b>	<b>74 (82.2)</b>	<b>89 (98.9)</b>	<b>90 (100)</b>	<b>16 (17.8)</b>	<b>1 (1.1)</b>	<b>0 (0.0)</b>

**Tablo 2. *Candida* türlerinin tanımlanmasında VITEK 2 ve API ID 32C ile elde edilen yanlış tanımlama sonuçlarının altın standart yöntem olan rDNA ITS1/2 dizi analizi ile karşılaştırılması**

<b>rDNA ITS1/2 dizi analizi</b>	<b>VITEK 2</b>	<b>API ID 32C</b>
<i>C. tropicalis</i> (5)	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. famata</i>	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>C. albicans</i> (2)	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>
	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. kefyr</i> (4)	<i>C. sphaerica</i>	<i>C. kefyr</i>
	<i>C. sphaerica</i>	<i>C. kefyr</i>
	<i>C. sphaerica</i>	<i>C. kefyr</i>
	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. kefyr</i>
<i>C. parapsilosis</i> (2)	<i>C. famata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
	<i>C. famata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. inconspicua</i> (1)	<i>C. krusei</i>	<i>C. inconspicua/norvegensis</i>
<i>C. dubliniensis</i> (2)	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. dubliniensis</i>

SONUÇ

*Candida* türlerinin tanımlanmasında VITEK 2 Yeast ID, API ID 32C ve MALDI-TOF MS ile elde edilen sonuçların, altın standart olarak kabul edilen nükleer rDNA ITS1/2 bölgelerinin dizi analizi ile karşılaştırıldığı çalışmamız sonucunda;

# VITEK 2 YEAST ID

VITEK 2 Yeast ID sisteminin duyarlılığı %82.2

Diğer sistemlerle karşılaştırıldığında oldukça düşük bulunmuştur.

*C.albicans* ve non-*albicans Candida* türlerini, özellikle *C. famata* olarak yanlış tanımlayabildiği saptanmıştır.

VITEK 2 Yeast ID sonuçlarının diğer bir yöntem ile doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

# API ID 32C

API ID 32C sisteminin duyarlılığı %98.9

Özellikle sık karşılaşılan türlerin tanısında güvenli olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

# MALDI-TOF MS

Bruker Maldi Biotyper'in duyarlılığı ise, %100 bulunmuştur.



# MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS sistemi, ilk kuruluř ařamasında yüksek maliyet gerektirmektedir.

Kolay uygulanır ve çok kısa sürede güvenilir sonuç

Diğer otomatize sistemlerle karşılaştırıldığında, süregelen çalışmalarla birlikte, henüz antifungal duyarlılık testi yapma imkanı sunmamaktadır.

Doğru tanımlama: erken ve uygun antifungal ilaçlarla tedaviye başlanarak gereksiz ilaç kullanımını ve hastanede yatış süresini azaltacaktır.

Özellikle fırsatçı enfeksiyonlar açısından risk taşıyan hasta gruplarının ve mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örnek sayısının fazla olduğu merkezlerde rutin kullanım için MALDI-TOF MS'in tercih edilebilecek bir tanımlama yöntemi olduğu sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR EDERİM...