

18-22 Kasım 2015

28S rDNA  
5.8S rDNA  
Internal transcribed spacer (ITS) bölgeleri  
- mitokondriyal DNA gen bölgesi  
- rRNA-mitokondriyal DNA anlamlı fark yok

mitokondriyal DNA ile duyarlılık ↓

Millon L, Grenouillet F, Legrand F, Loewert S, Bellanger AP, Gbaguidi-Haore H, Scherer E, Henon T, Rohrlrich P, Deconinck E. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:1058-1063

White P, ... enca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J, ... 2011. Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2010;49:3842-3848.



20.11.2015

09:20:45

**Yeşer Karaca**  
**Derici**

3. Ulusal  
Klinik Mikrobiyoloji  
Kongresi-2015

18-22 Kasım 2015  
Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Büyük Salon

# **İnvaziv Mantar İnfeksiyonlarında Tanımlama Güçlükleri ve Yenilikler**

**Dr. Yeşer Karaca Derici**

İzmirTepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

3. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2015, Antalya

# Tanımlamadaki Güçlükler

- Histopatoloji ve kültür gibi geleneksel tanı yöntemleri halen altın standart
- Duyarlılık düşük
- Sonuçların geç çıkması
- Erken tanıya yönelik yöntemlere ihtiyaç

# Yeni tanısal testlerin kullanımında karşılaşılan zorluklar

- Yeni testler  
duyarlılık,  
tekrarlanabilirlik,  
doğruluk,  
alt ve üst kantitasyon sınırları,  
doğrusal aralık
- Analitik validasyon sonrası klinik validasyon
- Farklı örnek türleri (tam kan, serum, plazma, BAL sıvısı)  
validasyonu güçleştirmekte

# Yeni tanısal testlerin kullanımında karşılaşılan zorluklar

- Kullanım kolaylığı
- Maliyet etkinliği
- FDA onaylı rutin klinik kullanımda olan sınırlı sayıda mantar tanı testi

# Moleküler Yöntemler

Geleneksel yöntemlere göre

- Kullanım kolaylığı
- Kısa sürede sonuç alınması
- Kültürde güç üreyen mantarların gösterilebilmesi
- Nükleik asit miktarının saptanabilmesi
- Erken tanı risk grubundaki hastalarda mortalite ↓

# PCR

- En eski, en yaygın
- Birçok teknik sebeple ilişkili olarak testler arası farklılıklar
- Standardizasyon güç
- Parçalanmaya dayanıklı güçlü hücre duvarı  
DNA izolasyonu güç ve zahmetli
- Hücre duvarını parçalamak için  
fenol-kloroform ile enzimatik,  
cam boncuk, sonikasyon gibi mekanik yöntemler  
veya otomatik ekstraksiyon

# PCR

- Diğer bir sorun → kontaminasyon
- Doğada yaygın - PCR'ın tüm aşamalarında kullanılan ticari kitler ve örnek tüpleri gibi malzemeleri kolayca kontamine edebilirler → yalancı pozitif sonuç
- Örnek seçimi
- Primer seçimi
- Uluslararası standartlar olmadan farklı testlerle elde edilen kantitatif verileri değerlendirmek ve klinik önemini belirlemek güç
- İFi tanısında kullanılan rehberlere girmiş bir PCR yöntemi yok



# İnvaziv Aspergilloz (İA)

- Duyarlılık %43-100
- Özgüllük %64-100
- Çalışmaların değişkenliğinin arkasında;
  - Primer seçimi
  - PCR pozitifliği tanımı
  - Örnek seçimi
  - DNA izolasyon yöntemi
  - Çoğaltılan DNA'nın tanımlama yöntemi

# Primer seçimi

- Primerler

- rRNA gen bölgesi

18S rDNA

28S rDNA

5.8S rDNA

İnternal transcribed spacer (ITS) bölgeleri

- mitokondriyal DNA gen bölgesi

**.rRNA-mitokondriyal DNA anlamlı fark yok**

Millon L, Grenouillet F, Legrand F, Loewert S, Bellanger AP, Gbaguidi-Haore H, Scherer E, Henon T, Rohrllich P, Deconinck E. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:1058–1063

**.mitokondriyal DNA ile duyarlılık ↓**

White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J, European Aspergillus PCR Initiative. 2011. Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2010;49:3842–3848.

# PCR pozitifliği tanımı

- Duyarlılık ve özgüllük değerlerini hasta başına tek bir pozitif sonuç
- En az iki pozitif PCR sonucunu PCR pozitif
- 16 çalışmadan oluşan bir meta analizde kan örneklerinde iki pozitif PCR sonucu ile tek pozitif PCR sonucu kıyaslandığında duyarlılık aynı, özgüllük ↑

Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. Lancet Infect. Dis.2009;9:89–96.

# Örnek seçimi

- Tam kan ve plazma örneklerini karşılaştırdıklarında- tam kanda duyarlılık ↑, her iki örnek için alt saptama limiti ise aynı

Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of Aspergillus DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:3830–3833

- Heparin, sodyum sitrat gibi antikoagülanlar inhibitör etkili
- Tam kan ve serum örneklerinin karşılaştırılması sonrası anlamlı fark yok

Bernal-Martinez L, Gago S, Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, RodriguezTudela JL, Cuenca-Estrella M. Analysis of performance of a PCRbased assay to detect DNA of Aspergillus fumigatus in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:3596 –3599.

- Tam kanla yapılan PCR testlerin daha duyarlı olduğu ve serum örneklerinden daha erken pozitiflik

Springer J, Morton CO, Perry M, Heinz WJ, Paholcsek M, Alzheimer M, Rogers TR, Barnes RA, Einsele H, Loeffler J, White PL. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of Aspergillus DNA in high-risk hematological patients. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51:1445–1450.

- Kullanılan serum miktarı arttırıldığında duyarlılığın %76.5'dan %100'e çıktığı gösterilmiştir

Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahe V, Quesne G, Poiree S, Buzyn A, Varet B, Berche P, Bougnoux ME. Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in highrisk adult patients under hematologic surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46:3772–3777.

- Tam kana göre serum örneklerinde DNA izolasyon işlemleri daha basittir ve birçok kez tekrarlanabilir

# Örnek seçimi

- Klinik çalışmalarda BAL sıvısında;
  - duyarlılık %36-100
  - özgüllük %70-100
  
  - BAL sıvısında PCR performansının değerlendirildiği bir meta analizde
  - duyarlılık %91
  - özgüllük %92
- Sun W, Wang K, Gao W, Su X, Qian Q, Lu X, Song Y, Guo Y, Shi Y. 2011. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review
- Bu analizde artmış performans için en önemli faktörün ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanımı olduğu gösterilmiş

# Örnek alma zamanı

- İA riski altındaki birçok hasta profilaktik antifungal tedavi almaktadır
- Tedavi ile PCR sonuç etkileşimi
  - tedaviye yanıtın izlemi
  - tarama testi

# Örnek alma zamanı

- Mennink-Kerston ve ark. miçelyum yıkılımı sonrası DNA salınımının gerçekleştiğini, dolayısıyla antifungal tedavi yaygın miçelyum yıkımına neden olarak PCR ürünlerinin artışı

Mennink-Kerston MA, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJ, Verweij PE. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 2006;44:1711–1718

- Klinik ve deneysel İA çalışmalarında antifungal tedavinin PCR performansı negatif etkileşim

Reinwald M, Hummel M, Kovalevskaya E, Spiess B, Heinz WJ, Vehreschild JJ, Schultheis B, Krause SW, Claus B, Suedhoff T, Schwerdtfeger R, Reuter S, Kiehl MG, Hofmann WK, Buchheidt D. Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies. J. Antimicrob. Chemother. 2012;67:2260–2267.

Lass-Flörl C, Speth C, Mayr A, Wurzner R, Dierich MP, Ulmer H, Dietrich H. Diagnosing and monitoring of invasive aspergillosis during antifungal therapy by polymerase chain reaction: an experimental study in mice. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2003; 47:569–572.

- Bu paradoks birçok DNA ekstraksiyon protokolünün serbest DNA'yı yıkabilmesi ile belki açıklanabilir

# Örnek alma zamanı

- Serbest DNA'yı koruyan ilave ekstraksiyon basamakları kullanarak PCR duyarlılığını ↑

Springer J, Schlossnagel H, Heinz W, Doedt T, Soeller R, Einsele H, Loeffler J. A novel extraction method combining plasma with a whole-blood fraction shows excellent sensitivity and reproducibility for patients at high risk for invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:2585–2591.

- Tüm antifungal ilaçların PCR sonuçlarını benzer şekilde etkileyip etkilemediği
- Ratlarla yapılan bir çalışmada posokonazol ve caspofungin tedavisiyle PCR testinin duyarlılığı azalırken Amfoterisin B tedavisiyle değişmediği gösterilmiş

McCulloch E, Ramage G, Rajendran R, Lappin DF, Jones B, Warn P, Shrief R, Kirkpatrick WR, Patterson TF, Williams C. Antifungal treatment affects the laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *J.Clin. Pathol.* 2012;65:83–86.

- Başka çalışmalarda bu sonuca ulaşamamış

Lass-Flörl C, Speth C, Mayr A, Wurzner R, Dierich MP, Ulmer H, Dietrich H. Diagnosing and monitoring of invasive aspergillosis during antifungal therapy by polymerase chain reaction: an experimental study in mice. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003;47:569–572



# Örnek alma zamanı

- BAL sıvısında PCR-  
tek bir antifungal ilaç ile tedavi-performans etkilenmiyor  
iki veya daha fazla antifungal ilaç-performans anlamlı ↓

Reinwald M, Hummel M, Kovalevskaya E, Spiess B, Heinz WJ, Vehreschild JJ, Schultheis B, Krause SW, Claus B, Suedhoff T, Schwerdtfeger R, Reuter S, Kiehl MG, Hofmann WK, Buchheidt D. Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67:2260–2267

# PCR-prognoz etkileşimi

- Yüksek riskli İA olgularında ardaşık pozitif PCR sonuçlarının yüksek mortalite ile ilişkili

Lass-Flörl C, Gunsilius E, Gastl G, Freund M, Dierich MP, Petzer A. Clinical evaluation of *Aspergillus*-PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients. *Mycoses* 2005;48(Suppl 1):12–17.

Hummel M, Spiess B, Cornely OA, Dittmer M, Morz H, Buchheidt D. *Aspergillus* PCR testing: results from a prospective PCR study within the AmBiLoad trial. *Eur. J. Haematol.* 2010;85:164–169.

# PCR-Ampirik Tedavi

- Ardaşık pozitif PCR sonuçlarının ampirik tedaviyi %37 oranında ↓

Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, Bleakley M, Bradstock K, Chen S. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2006;132:478–486

- PCR-GM sonuçlarının ampirik antifungal tedaviyi %17 ↓

Morrissey CO, Chen SC, Sorrell TC, Milliken S, Bardy PG, Bradstock KF, Szer J, Halliday CL, Gilroy NM, Moore J, Schwarzer AP, Guy S, Bajel A, Tramontana AR, Spelman T, Slavin MA, Australasian Leukaemia Lymphoma Group, New Zealand Mycology Interest Group. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2013;13:519–528.

# European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI)

- 24 merkezde 13 farklı PCR yöntemi, tam kan
- PCR performansı kullanılan PCR tipinden bağımsız olarak benzer
- PCR duyarlılığını ↑ faktörler;
  - internal kontrol kullanımı
  - DNA ekstraksiyon protokolü (eritrosit ve lökosit lysis buffer kullanımı, boncuk ile hücre duvarı uzaklaştırılması)
  - < 100 µl elüsyon hacmi
  - > 3ml örnek hacmi

White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, Finnstrom N, Mengoli C, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J, European Aspergillus PCR Initiative. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:1231–1240

# European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI)

- 23 farklı merkez, farklı PCR yöntemleri, serum
- PCR duyarlılığını ↑ faktörler;  
yüksek serum hacmi (> 0.5 ml)  
düşük elüsyon hacmi (<100 µl)  
internal kontrol kullanımı  
ITS bölgesini hedefleyen primer
- PCR duyarlılığını ↓ faktörler;  
mitokondriyal gen bölgesini hedefleyen primer  
yüksek elüsyon hacmi (> 100 µl)

White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J, European Aspergillus PCR Initiative. Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens. J. Clin. Microbiol. 2011;49:3842–3848.

# Aspergillus Technology Consortium (AsTeC)

- *Aspergillus spp.* DNA kalibrasyon materyalini yapıp valide etmiştir
- Laboratuvarlar arası farklı tekniklerle yapılan kalitatif ve kantitatif sonuçların karşılaştırılması sağlanacaktır

Lyon GM, Abdul-Ali D, Loeffler J, White PL, Wickes B, Herrera ML, Alexander BD, Baden LR, Clancy C, Denning D, Nguyen MH, Sugrue M, Wheat LJ, Wingard JR, Donnelly JP, Barnes R, Patterson TF, Caliendo AM, aAsTeC, IAAM, EAPCRI Investigators. Development and evaluation of a calibrator material for nucleic acid-based assays for diagnosing aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51:2403–2405

# İnvaziv Kandidiazis (İC)

- Duyarlılık % 80-100
- Özgüllük % 90-100
- Yüksek riskli İC olgularında kan kültürü negatif iken PCR pozitif

Tirodker UH, Nataro JP, Smith S, LasCasas L, Fairchild KD. Detection of fungemia by polymerase chain reaction in critically ill neonates and children. *J. Perinatol.* 2003;23:117–122.

Trovato L, Betta P, Romeo MG, Oliveri S. Detection of fungal DNA in lysis-centrifugation blood culture for the diagnosis of invasive candidiasis in neonatal patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18:E63–E65.

- Kanıtlanmış veya muhtemel İC olguları

PCR ile %85

Kan kültürü ile %38

Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:665–670

# Örnek seçimi

- tam kan, serum ve plazma örnekleri kıyaslandığında →  
tam kanda duyarlılık ↓

Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, Webb CH, McMullan R. Comparison of serum and whole-blood specimens for the detection of *Candida* DNA in critically ill, non-neutropenic patients. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57:1269–1272

Lau A, Halliday C, Chen SC, Playford EG, Stanley K, Sorrell TC. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:811–816.

- Bir meta analizde ise bunun tam tersi →  
tam kanla PCR testinin performansının daha iyi olduğu  
rRNA ve p450 primerleriyle testin performansının ↑

Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:665–670.



# Kan kültür şişelerinden PCR

- *Candida spp.* tanımlamasında alternatif yaklaşım
- Multiplex gerçek zamanlı PCR ile iki saatten kısa bir sürede tür düzeyinde tanı

Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 2013;41:5660–5664.

- Azol direçli kökenin hızlı tanısı
- Antifungal tedavinin erkenden düzenlenmesini

# Kan kültür şişelerinden PCR

- Kandidemiden şüphelenilen olgularda kan kültür şişelerinde mantar DNA'sı araştırılmış;

PCR ile duyarlılık % 87.5

Kan kültürüyle duyarlılık %50

Khelif M, Mary C, Sellami H, Sellami A, Dumon H, Ayadi A, Ranque S. Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. Clin. Microbiol. Infect. 2009;15:656–661

- Derin yerleşimli *Candida spp.* infeksiyonlarında

PCR ile duyarlılık %88

Kan kültürüyle duyarlılık %17

Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, Shields RM, Cheng S, Mitsani D, Vadnerkar A, Silveira FP, Kleiboeker SB, Clancy CJ. Performance of Candida real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. Clin. Infect. Dis. 2012;54:1240–1248

- İC tanısında PCR testinin negatif prediktif değeri ↑
- Gereksiz ampirik antifungal tedavi oranlarını azaltmak ve yeni tanı algoritmaları için faydalı

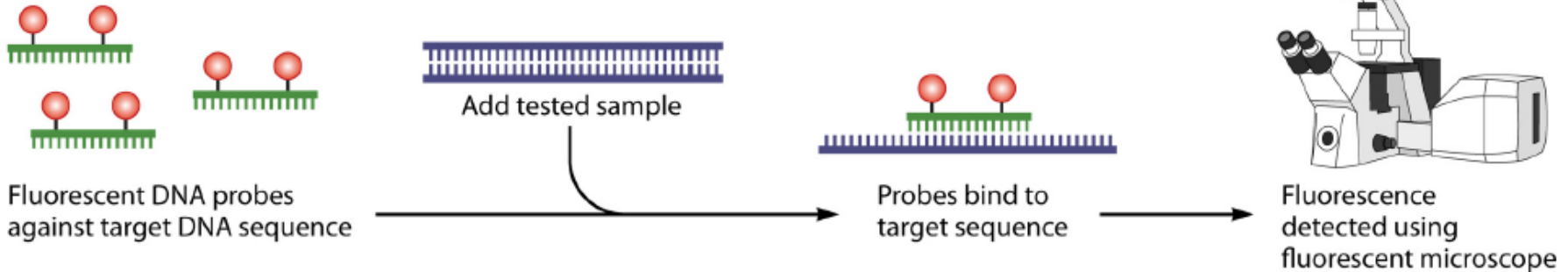
Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. Clin. Infect. Dis. 2013;56:1284–1292

# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

- Floresan problar kullanılarak patojen mikroorganizma genomundaki hedef bölge tanımlanır

### A FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)



# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## Floresan in situ hibridizasyon (FISH)

- *C.albicans* PNA-FISH; FDA onaylı  
duyarlılık %99  
özgüllük % 100  
pozitif prediktif değer %100  
negatif prediktif değer %99.3

Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB, Roberts GD, Hall GS, Alexander BD, Procop GW. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. J Clin Microbiol. 2005 Jun;43(6):2909-12.

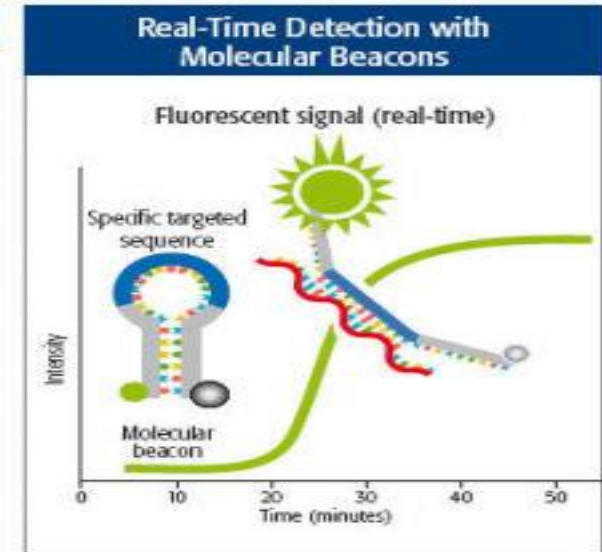
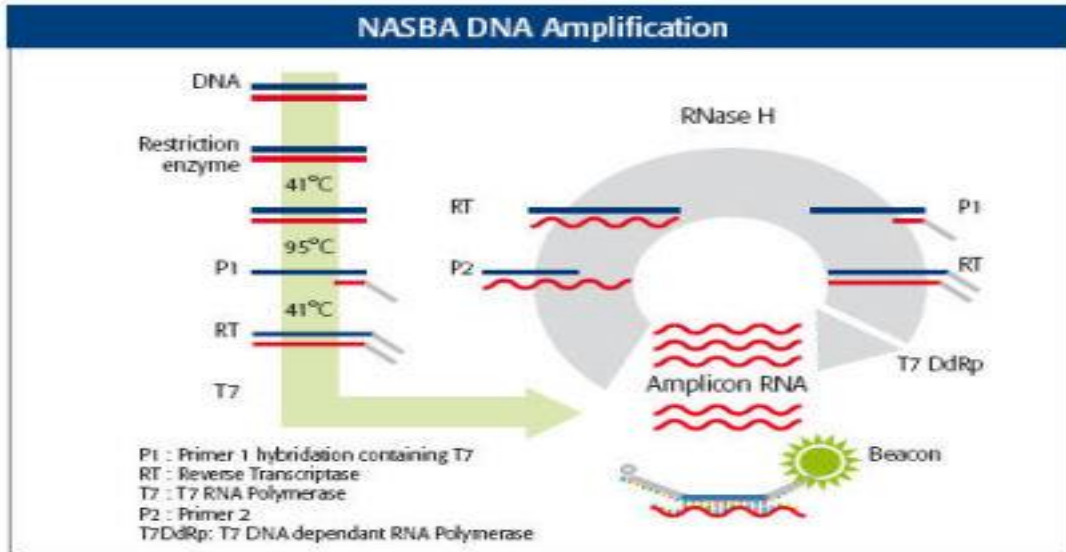
- Hızlı-2.5 saat
- Non-*C.albicans* maya varlığı hakkında fikir

# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## Nükleik asit sekans temelli amplifikasyon (NASBA)

- DNA yerine RNA polimeraz kullanarak mRNA'yı çoğaltır
- mRNA saptama özelliği ile latent veya eski infeksiyon yerine aktif infeksiyonu saptama avantajı
- İzotermal ve mRNA olması nedeniyle kontaminasyon az

Loeffler J, Hebart H, Cox P, Flues N, Schumacher U, Einsele H. Nucleic acid sequence-based amplification of *Aspergillus* RNA in blood samples. J. Clin. Microbiol. 2001;39:1626–1629.



# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## Nükleik asit sekans temelli amplifikasyon (NASBA)

- İnvaziv Aspergilloz

100% duyarlılık

63% özgüllük

Yoo JH, Choi JH, Choi SM, Lee DG, Shin WS, Min WS, Kim CC. Application of nucleic acid sequence-based amplification for diagnosis of and monitoring the clinical course of invasive aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin. Infect. Dis.* 2005;40:392–398

- 100% duyarlılık

43% özgüllük

Yoo JH, Choi SM, Lee DG, Park SH, Choi JH, Kwon EY, Shin WS. Comparison of the real-time nucleic acid sequence-based amplification (RTi-NASBA) with conventional NASBA, and galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Korean Med. Sci.* 2007; 22:672–676.

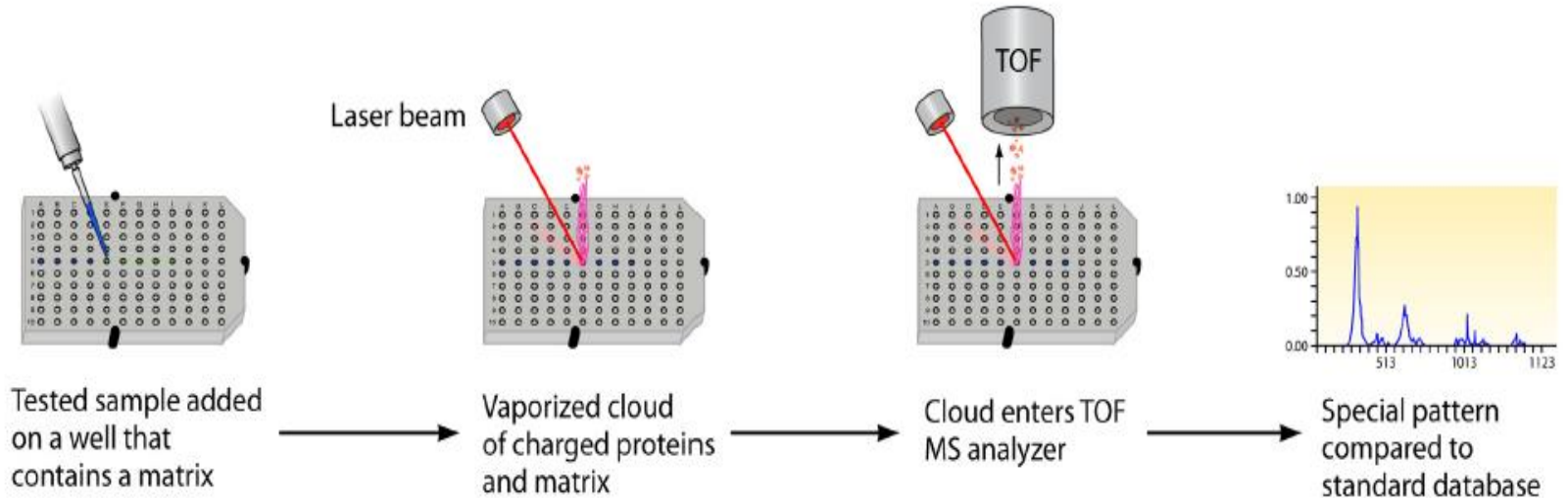
- Yüksek duyarlılık – yüksek riskli hastalarda İA dışlamak için tarama testi

# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-ToF MS)

- Mikroorganizmaların protein yapıdaki parmak izlerinin kütle spektrometri ile tanımlanması
- Cins, tür, suş düzeyinde tanımlanma
- Mikroorganizma spektral paterninin veri tabanına kayıtlı bilinen paternlerle karşılaştırılması
- Kullanımı kolay, hızlı, maliyet etkin

B MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry)



# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## Maldi-Tof MS

- 33 çalışma, 8842 maya, 1135 küf mantarı içeren meta analizde doğru tanımlama oranları;  
cins düzeyinde % 91-100  
tür düzeyinde % 81-100  
küflerde mayalara kıyasla daha düşük  
küflerin karmaşık protein profilleri

Ling H, Yuan Z, Shen J, Wang Z, Xu Y. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis. J Clin Microbiol. 2014 Jul; 52(7): 2573-82.

- *Candida spp.* için doğru tanımlama %96-100  
Non- *Candida* için doğru tanımlama % 41.2-61.9

BW Ledebøer NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013 May;51(5):1359-66.

- Taksonomi birlikteliğinin sağlanması ve daha geniş veri tabanları içeren sistemler ile tanımlamanın etkinliği ↑



# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

- Kütle imzaları hücre hazırlama yönteminden etkilenmekte

TABLE 1 Methods for analysis of isolated yeast colonies

Method	Study enrollment	Positive ID (%) <sup>a</sup>	Correct ID (%) <sup>a</sup>	Reference
Tube-based extraction (Cultured for 48 h at 30°C on SAB. One to 5 colonies were extracted using 75% EtOH, followed by suspension in a 50/50 mixture of 70% formic acid and ACN.) <sup>b</sup>	267 yeast isolates (250 <i>Candida</i> spp.)	247/267 (92.5)	247/247 (100)	Marklein et al. (32)
	1,192 yeast isolates (1,007 <i>Candida</i> spp.)	1,171/1,192 (98.2)	1,163/1,171 (99.3)	Bader et al. (31)
	241 yeast isolates (193 <i>Candida</i> spp.)	225/241 (93.4)	225/225 (100)	Dhiman et al. (29)
On-plate extraction (Cultured for 48 h at 30°C on SAB. One colony was transferred directly to MALDI-TOF MS analysis plate and overlaid with 70% or 25% formic acid.)	167 yeast isolates	135/167 (80.8)	135/135 (100)	Van Herendael et al. (34)
	90 yeast isolates (71 <i>Candida</i> spp.)	86/90 (95.6)	89/90 (98.9)	Theel et al. (33)
	192 yeast isolates (182 <i>Candida</i> spp.)	185/192 (96.3)	184/185 (99.5)	Iriart et al. (35)

<sup>a</sup> ID, identification. Number of isolates identified to the genus or species level (numerator) according to defined score interpretation guidelines out of the total number of isolates tested (denominator).

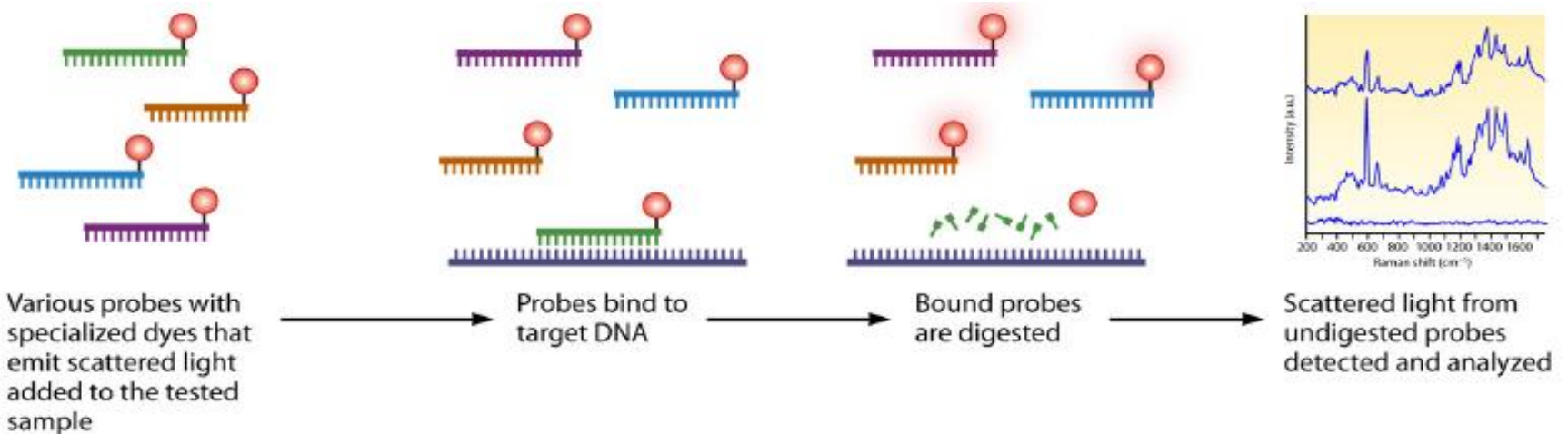
<sup>b</sup> EtOH, ethanol; ACN, acetonitrile.

Buchan BW, Ledebor NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013 May;51(5):1359-66.

# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## Raman spektrometrisi (SERRS)

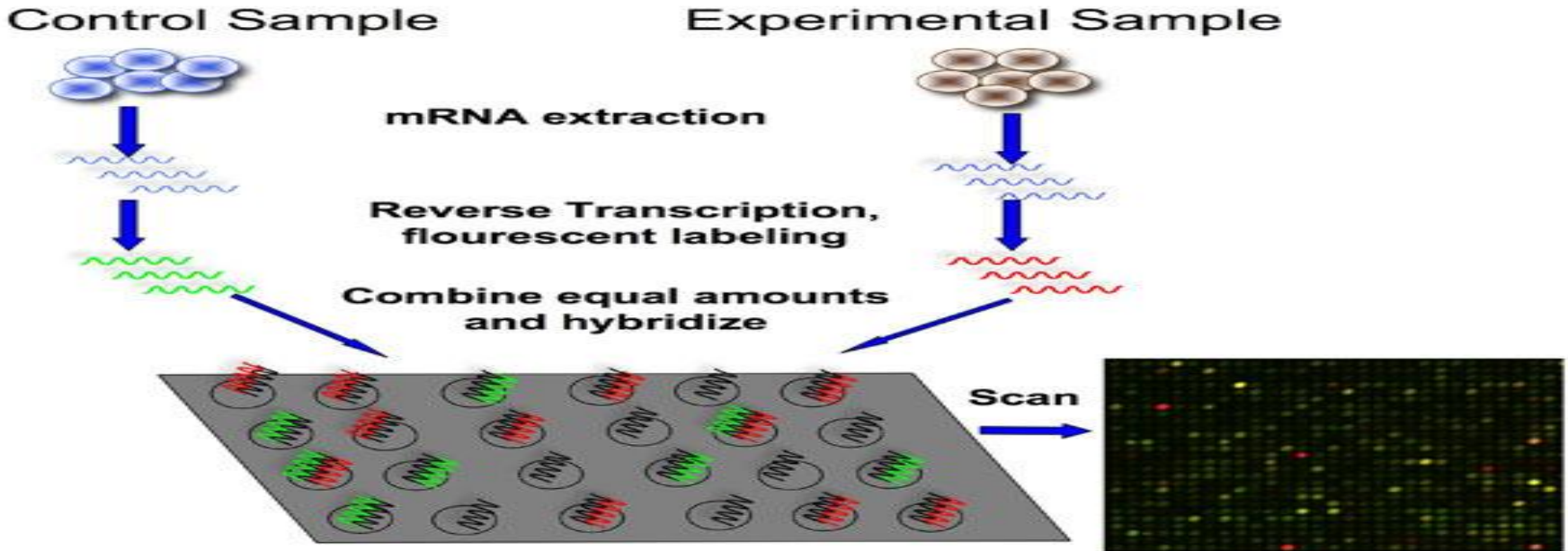
- Özel boya ile kaplanmış DNA'nın yaydığı ışığı sensörleriyle algılayan bir teknik
- Örnek çok sayıda DNA probuyla biraraya getirilir
- Örnekteki komplementer DNA'ya bağlandıktan sonra çift zincirli DNA'dan ekzonükleaz aktivitesiyle prob ayrılır
- Örnekteki tüm problar sindirildikten sonra kalan problardan yayılan ışık SERR sensörüyle ölçülür
- Eksik prob fungal patojeni açığa çıkarır



# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## Mikro array yöntemi

- Çok sayıda işaretli prob
- Cam, naylon veya silikon yapıdaki katı yüzeyler
- Floresan işaretli primerler
- PCR hibridizasyon tekniği
- Lazer teknolojisi ile bağlanan ve bağlanmayan problara bakılarak tür tayini



# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## DNA sekans temelli tanımlama yöntemleri

- İncelenecek mantar örneği
- Tanımlamanın düzeyi
- Seçilecek lokus değişmektedir
- Korunmuş 18S ve 28S rRNA bölgeleri cins düzeyinde
- ITS ve D1/D2 bölgeleri tür düzeyinde

Martagon-Villamil J, Sherestha N, Sholtis M, et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2003; 41(3): 1295-8.

## çok yakın türlerin tanımlanmasında başarısızlıklar

- EF- 1,  $\beta$ -tubulin, RPB2

Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol*, 2007; 45(6): 475-

# PCR dışındaki diğer yeni moleküler yöntemler

## DNA sekans temelli tanımlama yöntemleri

- DNA ekstraksiyonu - Whatman FTA filtre matrix teknolojisi
- 28 S rRNA, D1-D2 DNA bölgesi
- 21 maya, 160 küf izolat
- Mayalar tür düzeyinde % 100
- Küfler tür düzeyinde % 63.75, % 35 cins düzeyinde

Kiraz N, Oz Y, Aslan H, Erturan Z, Ener B, Arikani Akdagli S, Muslumanoglu H, Cetinkaya Z. Is the extraction by Whatman FTA filter matrix technology and sequencing of large ribosomal subunit D1-D2 region sufficient for identification of clinical fungi? *Mycoses*. 2015 Oct;58(10):588-97.

# Sonuç

- Altın standart yöntemlerin duyarlılığı ve hızları ↓
- Tedaviyi geciktirerek sağ kalımı etkilemekte
- Daha hızlı ve doğru tanısal testlere ihtiyaç duyulmakta
- Yeni moleküler testler;  
farklı yaklaşımlar - uyumsuzluklar  
tekrarlanabilirlik sınırlanmakta  
yaygın klinik kullanımına engel
- Standardizasyon için çaba ve zamana ihtiyaç var



Teşekkür ederim