



Özgün Araştırma / Original Article

Klinik Örneklerden İzole Edilen Aspergillus Türlerinin Tanımlanmasında Geleneksel Yöntemler, MALDI-TOF MS ve Dizi Analizi Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Esma Akkoyun Bilgi¹, Nuri Kiraz²

1 Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kocaeli Derince Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kocaeli, Türkiye ORCID: 0000-0002-6785-521X
2 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tekirdağ, Türkiye ORCID: 0000-0001-7415-190X

Geliş: 27.05.2019; Revizyon: 14.07.2019; Kabul Tarihi: 29.07.2019

Öz

Amaç: Aspergillus türü mantar enfeksiyonları immün sistemi baskılanmış hastalarda, yüksek mortalite ve morbidite ile sonuçlanan invazif hastalıklara yol açmaktadır. Bu nedenle hızlı ve doğru tanı konularak uygun antifungal tedavi başlanması invazif aspergillozlu hastalar için hayati öneme sahiptir. Günümüzde daha hızlı, kolay uygulanabilir, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip yeni tanı yöntemleri tercih edilmektedir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen Aspergillus türlerinin; geleneksel yöntemler, MALDI-TOF MS sistemi ve DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak tanımlanması ve bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 50 Aspergillus izolatu çalışmaya dahil edildi. Aspergillus suşlarından 2 tanesi kontaminasyondan dolayı çalışma dışı bırakıldı.

Bulgular: Çalışmamızda referans tanımlama yöntemi olarak kullandığımız ITS bölgesinin dizi analiziyle, suşların 25 tanesi *A.fumigatus* tür kompleksi (%52,08), 17'si *A.flavus* tür kompleksi (%35,42), 3'ü *A.niger* tür kompleksi (%6,25), 2'si *A.terreus* tür kompleksi (%4,17), 1'i *A.sydowii* tür kompleksi (%2,08) olarak tanımlandı. Altın standart yöntemin dizi analizi olduğu ve geleneksel yöntem ile karşılaştırıldığında %97,9 uyum olduğu gözlemlendi. İki farklı yazılım kullandığımız MALDI-TOF MS sisteminde ise güncel IVD (invitro diagnostik) VITEK MS V.2.0 yazılımı ile doğru tanımlanan köken 37(%77,1) iken SARAMIS 4.12 RUO yazılımı ile doğru tanımlanan köken 42(%87,5) olarak bulundu.

Sonuç: Moleküler yöntemler, geleneksel yöntemlerin yetersiz kaldığı ve tür tanımının yapılamadığı durumlarda tamamlayıcı yöntem olarak kullanılabilir. Zaman açısından değerlendirildiğinde MALDI-TOF yöntemi hızlı ve duyarlı bir yöntem olmasına rağmen veri tabanının geliştirilmesi amacıyla suş sayısının artırılarak bu tür çalışmaların tekrarlanması gerekir.

Anahtar kelimeler: Aspergillus, MALDI-TOF, Kütle spektrometri, ITS dizi analizi, konvansiyonel yöntem.

DOI: 10.5798/dicletip.620589

Yazışma Adresi / Correspondence: Esma Akkoyun Bilgi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kocaeli Derince Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kocaeli, Türkiye
e-mail: esma.akkoyun@hotmail.com

Comparison of Conventional Methods, MALDI-TOF MS and Sequence Analysis Methods for Identification of Aspergillus Species Isolated from Clinical Samples

Abstract

Objective: Fungal infections associated with Aspergillus species cause invasive diseases leading high mortality and morbidity as a result of deficiency of primary defence systems in immunosuppressive patients. Therefore, starting appropriate antifungal treatment after rapid and accurate diagnosis is critically important for invasive aspergillosis patients. Nowadays, more rapid, easily applicable, having high sensitivity and specificity new diagnostic methods are required. In this study, identification of Aspergillus spp. isolated from various clinical samples by using conventional methods, MALDI-TOF MS system and DNA sequence analysis and comparison of the methods are aimed.

Methods: Totally 50 Aspergillus strains were included in this study. Two isolates were excluded from the study due to contamination.

Results: 25 strains were identified as A.fumigatus species complex (52.08%), 17 strains were identified as A.flavus species complex (35.42%), 3 strains were identified as A.niger species complex (6.25%), 2 strains were A.terreus species complex (4.17%) and 1 strain was A.sydowii species complex (2.08%) by ITS sequence analysis method used as reference diagnostic method in this study. The sequence analysis was the gold standard method and it was observed that there was 97.9% compliance compared to the conventional method. Two different software programmes were used for MALDI-TOF MS system. 37 strains (77.1%) were accurately defined by current IVD (in vitro diagnostic) VITEK MS V.2.0 whereas 42 strains (87.5%) were accurately defined by SARAMIS 4.12 RUO software programme.

Conclusions: Molecular methods are thought to be appropriate to be used as complementary method when conventional methods are insufficient for identification at the species level. Although MALDI-TOF MS method is rapid and sensitive method when evaluated in terms of time, it is concluded that such studies should be repeated with more strains to develop database.

Keywords: Aspergillus, MALDI-TOF, Mass Spectrophotometry, ITS sequence analysis, conventional method.

GİRİŞ

Aspergillus, insanlarda immün sistemin durumuna göre zararsız bir kolonizasyondan, akut invazif hastalık gibi geniş bir yelpazede farklı klinik enfeksiyonlara neden olabilir¹⁻³. İnvazif Aspergillus enfeksiyonlarının, özellikle derin nötropenik ve hematolojik maligniteli hastalar olmak üzere, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde yüksek mortalite ve morbidite oranı nedeniyle erken tanı ve tedavisi önemlidir^{1,4,5}. Aspergillus'un tür düzeyinde tanımlanması, türlerin farklı direnç paternleri nedeniyle klinik olarak önem arz etmektedir. Rutin laboratuvarların çoğu, küf mantarlarının tanımlanması için makroskopik ve mikroskopik morfolojik özellikleri kullanmaktadır. Bu nedenle çoğu klinik izolat tür kompleksi düzeyinde tanımlanmaktadır. Antifungal tedavinin etkinliği, hızlı ve tür

düzeyinde doğru tanımlama ile artmaktadır⁶. Son yıllarda kimyasal spektroskopik ve kütle analizi yöntemlerinin mikolojik tanımlamada kullanımı artmıştır^{7,8}. MALDI-TOF MS (Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı-Kütle Spektrometresi) yöntemi mayaların tanımlanması amacıyla kullanılan yüksek duyarlılık, hızlı ve maliyeti düşük bir sistemdir^{1,8-10}.

MALDI-TOF MS yönteminde, mikroorganizmalara ait proteinlerin lazer atışları ile iyonizasyonu yapıldıktan sonra elektromanyetik uçuş tüpünden geçirilir. İyonlar kütleleriyle orantılı hız kazanarak detektöre farklı zamanda çarpmaları ile kaydedilen sinyaller proteinlerin kütle spektrumlarını oluşturur. Görüntülenen spektrum, mevcut veri tabanındaki

spektrumlarla karşılaştırılarak, hem cins hem de tür bazında tanımlama yapılır^{9,10,11,12}.

MALDI-TOF MS yöntemi ile mantarların tür bazında doğru olarak tanımlanma oranı, özellikle *Candida* cinsinde daha yüksekken, dermatofitler, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinsi mantarlar da, referans spektrum yetersizliği nedeniyle daha az oranda tanımlandığı bildirilmiştir^{5,10}. Son zamanlarda MALDI-TOF MS yöntemi kullanılarak *Aspergillus* türleri ile çeşitli çalışmalar yapılarak referans spektrum genişletilmeye çalışılmaktadır^{1,4,5,12,13}. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Aspergillus* türlerinin, DNA dizi analizi altın standart yöntem olarak alınarak; geleneksel yöntemler ve MALDI-TOF MS sistemi kullanılarak tanımlanması ve bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarı ve Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 50 *Aspergillus* suşudahil edildi.

Çalışmada kullanılacak suşlar için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden 14.03.2014 tarihinde 83045809/604/02-6879 sayı numarası ile etik kurul onayı alındı.

1. Geleneksel Tanı Testleri

Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerinde üreyen küf kolonilerini saf olarak elde etmek, izolasyon ve identifikasyon işlemlerini sağlıklı yapabilmek için her koloniden çengel öze ile bir miktar örnek alınarak, Malt extractagar ve Czapek-Doxagara eşzamanlı batırma ekimleri yapıldı. Yine aynı koloniden çengel öze ile örnek alındı ve mantar stoğu oluşturmak için, önceden hazırlanan içinde gliserollü brucella broth besiyeri olan eppendorf tüplere konuldu. Bu şekilde hazırlanan bütün stok eppendorf

tüpler daha sonra MALDI-TOF MS ve dizi analizi çalışmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Aspergillus tür komplekslerinin ayrımı için Malt extractagar ve Czapek-Doxagarda üreyen küf kolonileri makroskobik olarak değerlendirildi. Makroskobik olarak koloninin dokusu kadifemsi, pamuksu, tozlu veya yünsü olabilmektedir. Koloni ön yüzünün rengi türe göre değişmekle birlikte; yeşil, sarı, turuncu, kahverengi veya siyah tonlarında görülebilmektedir. Üreyen küf kolonilerini mikroskobik olarak değerlendirmek için laktofenollü pamuk mavisi boyası ile preparat hazırlandı.

Bu hazırlanan preparat mikroskop altında bakılarak sterigmata (konidyojen hücre) sayısı, vezikül yapısı, fiyalitlerin tek-çift sıralı oluşu ve yerleşimi ayrıca konidyoforların yapısı ve rengi gibi ayrıntıları incelenerek identifikasyonları yapılan *Aspergillus*'lar tür komplekslerine ayrıldı. MALDI-TOF MS ve moleküler biyolojik bir yöntem olan ITS1- ITS2 bölgelerinin dizi analizi için -20°C'ye kaldırılan stoktaki izolatlar SDA besiyerine pasajlanarak tanımlama işlemleri gerçekleştirildi.

2. MALDI-TOF MS Yöntemi ile İdentifikasyon

Çalışma öncesi *Aspergillus* izolatları SDA besiyerinde canlandırıldı. Çalışmada 1,5 ml'lik eppendorf tüplerden her birine 50 µl trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich) konulup üzerine 10 µl'lik plastik steril özenin tamamını kaplayacak şekilde alınan küfün sporlarından eklendi ve vortekslendi. Bu şekilde 30 dakika beklendi. Sonra bu karışımın üzerine 450 µl DNase ve RNasefree su eklenip vortekslendi. Cihaz için tasarlanmış 48 bölümlük test plağına her 16 bölümün ortasındaki bölüme pasajlanmış *E. coli* ATCC 8739 standart suşu bölüm dışına taşırılmayarak ince bir film tabakası oluşturacak şekilde yayıldı. Sonra diğer 48'lik bölüme her bir izolat için taze hazırlanan karışımlardan 1'er µl eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan her bir bölümün üzerine matriks çözeltisi olarak 1 µL

VITEK MS-CHCA (=α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi ve tekrar oda sıcaklığında kurutuldu. Plağın cihaza yüklenmesinin ardından, MALDI-TOF MS kütle spektrumlarında peptit ve protein profili iyi bilinen, taze pasajlanmış E. coli ATCC 8739 standart suşu kullanılarak cihazın otomatik kalibrasyonu ve kontrolü yapıldıktan sonra değerlendirilme başladı. Plak üzerinde yer alan 48 örnek toplu olarak çalışıldı.

Çalışmamızda MALDI-TOF MS sistemi olarak VITEK MS (Biomerieux, France) ticari sistemi kullanıldı. Ölçümler üretici firmanın önerdiği ayarlar ile yapıldı. Tüm izolatlardan elde edilen spektrumlar önce güncel IVD (invitrodiagnostik) VITEK MS V.2.0 yazılımı kullanılarak analiz edildi. IVD VITEK MS V.2.0 yazılımı ile tanımlanamayan türler için çalışma tekrar edilerek sadece araştırma amaçlı kullanılan SARAMIS 4.12 RUO (ResearchUseOnly) yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

3. DNA Dizi Analizi İle Tanımlama

a. Genomik DNA İzolasyonu (Ekstraksiyon) : Örneklerden DNA eldesi GeneJET Genomik DNA Pürifikasyon Kiti (Thermo Scientific, ABD) ile üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı.

b. PCR ile DNA Amplifikasyonu: PCR ile ribozomal alt üniteye ait ITS1 ve ITS2 gen bölgeleri, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılarak çoğaltıldı.

Reaksiyon, PCR karışımı hazırlanılarak ABI 9700 GeneAmp PCR System (life sciences, USA) cihazında gerçekleştirildi. PCR sonrası oluşan ürünler %1,5'lük agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Pozitif bantlar kolon tabanlı High Pure PCR Purification Kit (Roche, Almanya) ile saflaştırıldı ve sonrasında çift yönlü DNA dizi işlemi yapıldı.

1. Dizi Analizi PCR

DNA dizi analizi reaksiyonu, BigDyeSequencing kit kullanılarak çift yönlü olarak

gerçekleştirildi. Döngü için ABI 9700 GeneAmp PCR System (life sciences, USA) cihazı kullanıldı.

Dizileme sonrası oluşan ürünler sephadexG-50 fine ile saflaştırıldıktan sonra Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazında, POP-7 polimeri ve 36 cm'lik kapiller kullanılarak kapiller elektroforez işlemine tabii tutuldu. Elde edilen elektroferogramların analizi Sequencing Analysis programı ile gerçekleştirildi.

Dizi analizi verileri "National Center for Biotechnology Information (Bethesda, ABD) BLAST sistemi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak analiz edildi ve suşlar türkompleksi düzeyinde tanımlandı.

BULGULAR

Klinik örneklerin 23'ü (%47,9) balgam, 11'i (%22,9) endotrakeal aspirasyon (ETA), 7'si (%14,7) bronkoalveolar lavaj (BAL), 4'ü (%8,3) doku, 2'si (4,2) aspirasyon sıvısı ve 1'i (%2,8) sürüntüden izole edildi.

Geleneksel Yöntem ile Tanımlama Sonuçları

Örneklerin geleneksel yöntem ile tanımlanmasında Aspergillus suşlarının 25'i (%52,1) A.fumigatus tür kompleksi, 17'si (%35,4) A.flavus tür kompleksi, 3'ü (%6,3) A.niger tür kompleksi, 2'si (4,2) A.terreus tür kompleksi ve 1'i (%2,1) Aspergillus sp olarak tanımlandı.

Dizi Analizi Sonuçları

Çalışmamızda referans yöntem olarak kullandığımız ribozomal DNA ITS bölgesi dizi analiziyle, örneklerin 25'inde (%52,1) A.fumigatus tür kompleksi, 17'sinde (%35,4) A.flavus tür kompleksi, 3'ünde (%6,3) A.niger tür kompleksi, 2'sinde A.terreus tür kompleksi, 1'inde (%2,1) A.sydowii tür kompleksi olarak tanımlandı (Tablo 1).

Tablo 1: Dizi analizi, Geleneksel ve MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanan *Aspergillus* suşlarının dağılımı.

No	Dizi	GELENEKSEL	MALDI-TOF
1	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
2	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
3	<i>A. niger</i>	<i>A.niger</i>	Tanımlamadı
4	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> ^a
5	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
6	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
7	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
8	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
9	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
10	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
11	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
12	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
13	<i>A. terreus</i>	<i>A.terreus</i>	<i>A.terreus</i>
14	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
15	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
16	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
17	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
18	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
19	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
20	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
21	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
22	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
23	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
24	<i>A. niger</i>	<i>A.niger</i>	Tanımlamadı
25	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> ^b
26	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
27	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
28	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> ^a
29	<i>A. terreus</i>	<i>A.terreus</i>	<i>A.terreus</i> ^a
30	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
31	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> ^c
32	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
33	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
34	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>

35	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. sydowii</i>
36	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
37	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
38	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	Tanımlamadı
39	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
40	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
41	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i> ^a
42	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
43	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i> ^a
44	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
45	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	Tanımlamadı
46	<i>A. sydowii</i>	<i>Aspergillus</i> ssp.	<i>A. fumigatus</i>
47	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>
48	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>

^aSARAMIS 4.12 RUO Yazılımı ile tanımlandı, ^b *A. fumigatus/oryzae* olarak tanımlandı, ^c *A. flavus/oryzae* olarak tanımlandı.

MALDI-TOF MS ile Tanımlama Sonuçları

MALDI-TOF MS sisteminde güncel IVD VITEK MS V.2.0 yazılımı kullanılarak 48 köken çalışıldı. Çalışılan 48 kökenin 39'u (%81,2) tanımlanırken 9'u (%18,8) tanımlanamadı. Tanımlanan 39 örnekten 2 köken (%5,1) tür bazında DNA dizi analiz sonucu ile uyumsuz biçimde yani yanlış tanımlandı. Kalan 37 örnekten 2 köken de yine DNA dizi analiz sonucu ile opsiyonlu olarak (*A.flavus/oryzae* ve *A.fumigatus/oryzae*) tanımlandı ve doğru tanımlandığı kabul edildi. Yani VITEK MS V.2.0 yazılımı ile doğru tanımlanan köken 37 (%77,1) olarak bulundu (Tablo 1).

IVD VITEC MS V.2.0 yazılımı ile tanımlanamayan 9 köken yanlış tanımlanan 2 köken ve opsiyonlu olarak tanımlanan 2 köken için çalışma, daha geniş kütüphaneye sahip ve araştırma için tasarlanmış olan SARAMIS 4.12 RUO yazılımı tekrar edilerek değerlendirildi. VITEC MS V.2.0 yazılımı ile yanlış tanımlanan 2 köken ve opsiyonlu olarak tanımlanan 2 köken ile de aynı sonuçlar elde edildi. SARAMIS 4.12

RUO yazılımı; tanımlanamayan 9 kökenden 4 kökeni hiç tanımlayamazken 5 kökeni dizi analizi ile uyumlu olarak tanımlandı.

MALDI-TOF MS sisteminde her iki yazılımla 2 köken *A.flavus/oryzae* ve *A.fumigatus/oryzae* olarak opsiyonlu tanımlanırken; 3 *A.niger* ve 1 *A.flavus* kökeni tanımlanamadı ve 2 köken DNA dizi analizi ile karşılaştırınca yanlış tanımlandı(Tablo I).

Geleneksel yöntem ve DNA dizileme sonuçları karşılaştırıldığında %97,9 uyum olduğu gözlenmesine karşın MALDI-TOF MS sisteminde her iki yazılım kullanılarak 4 kökeni (%8,3) tanımlanamazken 44 köken (%91,6) tanımlandı. MALDI-TOF MS sisteminin her iki yazılım kullanılarak tanımladığı 44 kökenden 2'sinin (%4,5), altın standart olarak kabul edilen dizi analizi sonuçları ile karşılaştırıldığında uyumsuz olduğu görüldü. MALDI-TOF MS sistemi ile tanımlaması yapılan 48 kökenden 42'sinin (%87,5) DNA dizi analizi sonuçları ile karşılaştırıldığında doğru tanımlandığı gözlemlendi (Tablo 1).

TARTIŞMA

İmmünyetmezlikli hastalarda sistemik mantar enfeksiyonlarının mortalite oranının yüksek olması nedeniyle erken tanı ve tedavi önemlidir¹⁴⁻¹⁶. Riskli hasta gruplarında mantar enfeksiyonlarının tanısında direkt mikroskopik inceleme, boyalı preparatlar ve kültür yöntemleri tanıdaki önemini koruyan standart geleneksel yöntemlerdir^{1,2}.

Son yıllarda mantar hastalıklarının sıklığının giderek artması ve ampirik antifungal kullanımının yaygınlaşması, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasına ve direnç oranlarının artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle tür düzeyinde identifikasyon önem taşımaktadır. İdentifikasyon için, direkt mikroskopi, histopatoloji ve kültür şiddetle tavsiye edilmektedir^{6,17}.

Erken tanı için günümüzde daha hızlı, kolay uygulanabilir, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe

sahip yeni tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır^{1,5,18}.

Yapılan çalışmalarda, pozitif mantar kültürü saptanan hastalarda invazif *Aspergillus* enfeksiyonlarının, *Candida* enfeksiyonlarından sonra, en sık saptanan fungal enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir^{5,19}.

Hastane kaynaklı aspergilloz olgularından genellikle *A.fumigatus* ve *A. flavus* 'un izole edildiği, son yıllarda *A. niger* ve *A. terreus* enfeksiyonlarında artış olduğu bildirilmiştir¹. *Aspergillus* enfeksiyonlarında solunum yolu örneklerinde daha çok *A. fumigatus*, yara yeri enfeksiyon örneklerinde *A.flavus* ve kulak örneklerinde *A.niger* görüldüğü bildirilmiştir¹. Çalışmamızda da benzer olarak örnekler çoğunlukla solunum yolundan alınmış olup sıklıkla *A. fumigatus* ürettiği görülmüştür.

Geleneksel yöntemlerin gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman net sonuç verememeleri, bazı mantar türlerinin zor yorumlanması ve ek testlere gereksinim duyulması nedeniyle son yıllarda moleküler yöntemlere eğilim artmıştır^{1,20}.

Moleküler yöntemlerle tanılamada yöntemin başarısı hedeflenen dizi veya gene bağlı olarak farklılık göstermektedir. ITS1 ve ITS2 bölgesi türler arasında farklılık gösterdiği için tür ayrımında yaygın olarak kullanılmaktadır^{1,21}.

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz *Aspergillus* türlerinin tümünü, ITS1-ITS2 gen bölgesini hedef alarak DNA dizi analiziyle tür kompleksi düzeyinde tanımladık. Geleneksel yöntemle tanımladığımız tüm *Aspergillus* türlerini, DNA dizi analizi yöntemiyle karşılaştırdığımızda %97,9 uyumlu bulduk. Geleneksel yöntemlerin başarısının değerlendiricinin bilgi ve tecrübesiyle orantılı olarak arttığı gözlemlendi.

Moleküler yöntem olarak kullanılan ITS dizi analizi, tamamlayıcı yöntem olarak

kullanılabilir olmasının yanı sıra altın standart olarak kabul edilmektedir.

MALDI-TOF MS yönteminin temeli, mikroorganizmanın protein parmak izinin (fingerprint) çıkarılması ve bunun önceden iyi tanımlanmış, veri tabanı oluşturulmuş kütüphanelerdeki referans spektrumlarla karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Tıbbi önemi olan mikroorganizmaların ayırımında ve türler arası karşılaştırmada etkili bulunmuştur¹¹.

Alanio ve arkadaşları, MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) ile 140 *Aspergillus* türünü incelemişler ve yöntem ile 138 (%98,6) izolatı doğru bir şekilde tanımlanırken 2 izolatın tanımlanması yapılmamasına rağmen yanlış tanımlanan izolat olmadığı bildirilmiştir. MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) yönteminin özgüllüğünü %100 olarak belirtmişlerdir²². Fransa'da çok merkezli yapılan bir çalışmada DNA dizi analizi baz alınarak 625 filamentöz mantar örneği, geleneksel yöntem ve MALDI-TOF MS yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada 58 tür tanımlanmıştır. Doğru tanımlama oranı, geleneksel yöntemle %80 (501 izolat) iken MALDI-TOF MS ile %89 (556 izolat) olduğu görülmüştür. MALDI-TOF MS ile 65 izolat (%10,4) tanımlanamazken 4 izolat (%0,6) yanlış tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS ile geleneksel tanımlama karşılaştırıldığında; MALDI-TOF MS'in klinik laboratuvarlarda izole edilen küflerin tanımlanmasını daha da geliştirdiği belirtilmiştir²³. MALDI-TOF yöntemi ile yapılan birçok çalışmada, geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiği gösterilmiştir^{5,10,14,24}.

Atalay ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada *Aspergillus* türlerini tanımlama da geleneksel yöntem ile rep-PCR ve MALDI-TOF yöntemlerinde anlamlı bir uyum olduğu belirtilmiştir¹.

Verwer ve arkadaşları tarafından morfolojik olarak birbirine benzer olan 16 *A.fumigatus* ve 16 *A.lentulus* suşlarını tanımlama için VITEK MS

RUO, Raman spektroskopu ve PCR yöntemlerini karşılaştıran bir çalışma yapılmıştır. Suşları doğru tanımlama oranları Raman spektroskopu ile %78 (25/32), PCR ve VITEK MS RUO ile %100 oranında doğru tanımlandığı bildirilmiştir. Zaman açısından değerlendirildiğinde üç yöntem kültür zamanı eklenince tanımlanma süresi, Raman spektroskopu ile 100 saat, PCR ile 57 saat ve VITEK MS RUO ile 50 saat sürdüğü görülmüştür²⁵.

Çalışmamız ile diğer çalışmalar karşılaştırıldığında MALDI-TOF MS in doğru tanımlama yüzdesinin uyumlu olduğunu görüyoruz. Çalışmamızda geleneksel yöntem ve DNA dizileme sonuçları karşılaştırıldığında %97,9 uyum olduğu gözlenmesine karşın MALDI-TOF MS sistemi 4 kökeni (%8,3) tanımlayamadığı saptandı. Altın standart olarak alınan dizi analizi sonuçlarına göre MALDI-TOF MS sistemi tanımladığı 44 suştan 2'sinin (%4,5) uyumsuz olduğu görüldü. MALDI-TOF sistemi ile tanımlaması yapılan 48 kökenin 42'si (%87,5) geleneksel yöntem ve DNA dizi analiz sonuçları ile uyumlu geldi. Çalışmamızda güvenilir olmayan yanlış sonuçların nedeni; cihazı çalıştırma hataları, teknik problemler, test edilen mantarın cihazın kütüphanesinde ve veri tabanında bulunmaması, cihazın rutin kalibrasyonunun düzgün yapılmamasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak; geleneksel yöntem/dizileme sonuçlarının tür kompleksi düzeyinde uyumlu olduğu (geleneksel yöntem kendi sınırları içinde başarılı) ve MALDI-TOF MS'in tür düzeyinde sonuç verebilmesi nedeniyle geleneksel yöntemle göre avantajlı olabileceği ancak çalışılan az sayıda suş arasında kriptomik türlerin bulunmaması nedeniyle bu avantaj saptanamayabilmektedir.

MALDI-TOF MS yöntemi zaman açısından değerlendirildiğinde hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Ancak kullanılan cihazın daha doğru ve güvenilir sonuç vermesi için veri tabanının

geliştirilmesi gerekmektedir. MALDI-TOF MS yönteminin veri tabanının geliştirilmesi için bu tür çalışmaların suş sayısının artırılarak tekrarlanması gerekmektedir.

Yakın zamanda moleküler yöntemler geleneksel yöntemlerin yerini alacak gibi gözükmektedir. Fakat pahalı bir yöntem olması, tecrübeli ekipman gerektirmesi gibi nedenlerden dolayı rutin laboratuvarlarda değil ancak araştırma laboratuvarlarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, 2014 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi olarak sunulmuştur.

Çıkar Çatışması Beyanı: Bu çalışmada çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu proje İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41077

Declaration of Conflicting Interests: There is no conflict of interest in this study.

Financial Disclosure: This project was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Fund. Project No: 41077

KAYNAKLAR

1. Atalay A, Koc AN, Suel A, et al. Conventional Morphology Versus PCR Sequencing, rep-PCR, and MALDI-TOF-MS for Identification of Clinical Aspergillus Isolates Collected Over a 2-Year Period in a University Hospital at Kayseri, Turkey. *J Clin Lab Anal.* 2016; 30: 745-50.
2. Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of Aspergillus. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22: 662-9.
3. Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2017; 55: 369-79.
4. Lamoth F. Aspergillus fumigatus-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol.* 2016; 7: 683.
5. Li Y, Wang H, Zhao YP, Xu YC, Hsueh PR. Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Aspergillus Species Directly from Growth on Solid Agar Media. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1209.
6. Gülmez D. Aspergillus fumigatus Kompleksi: Zorlu Bir Patojende Yeni Bir Sorun, Azol Direnc. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2018; 48: 153-66.
7. Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, Sebela M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv.* 2014; 32: 230-41.
8. Nakamura S, Sato H, Tanaka R, Yaguchi T. Verification of Ribosomal Proteins of Aspergillus fumigatus for Use as Biomarkers in MALDI-TOF MS Identification. *Mass Spectrom (Tokyo).* 2016; 5: A0049.
9. Pelit S, Erköse Genç G, Barış A, Erturan Z. Trichosporon Türlerinin Tanımlanmasında Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Sisteminin API ID 32C ve VITEK 2 ile Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2017; 47: 169-75.
10. Özcan N, Ezin Ö, Akpolat N, Mete M, Gül K. Identification of Candida species isolated from clinical specimens by MALDI-TOF MS. *Dicle Medical Journal.* 2016; 43: 390-4.
11. Yılmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H. Applications of MALDI-TOF MS in Microbiological Identification. *TAF Prev Med Bull.* 2014; 13: 421-6.
12. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar J. Identification of clinical isolates of Aspergillus, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol.* 2018; 56: 838-46.
13. Park JH, Shin JH, Choi MJ, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of Aspergillus species from 11 Korean hospitals: comparison with molecular identification. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 87: 28-31.
14. Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 2797-803.
15. Erdem İ, Doğan M, Karaali R, Omar ŞE, Ardiç E. Treatment Of Invasive Aspergillosis. *Namık Kemal Tıp Dergisi.* 2018; 6: 64-8.

16. Birinci A, Çaycı YT. Mantar Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2016; 73: 175-82.
17. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24 (Suppl1) e1-e38.
18. Sleiman S, Halliday CL, Chapman B, et al. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Aspergillus, Scedosporium, and Fusarium spp. in the Australian Clinical Setting. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 2182-6.
19. Liao Y, Chen M, Hartmann T, Yang RY, Liao WQ. Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in China: review of literature. *Chin Med J (Engl).* 2013; 126: 361-8.
20. Aslan M, Öz Y, Akşit F, Akay MO. İnvaziv Fungal Enfeksiyonların Tanısında In-House Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Değerlendirilmesi. *Osmangazi Tıp Dergisi/Osmangazi Journal of Medicine.* 2016; 38: 26-31.
21. Alshareef F, Robson GD. Prevalence, persistence, and phenotypic variation of *Aspergillus fumigatus* in the outdoor environment in Manchester, UK, over a 2-year period. *Med Mycol.* 2014; 52: 367-75.
22. Alanio A, Beretti J-L, Dauphin B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 750-5.
23. Ranque S, Normand AC, Cassagne C, et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses.* 2014; 57: 135-40.
24. Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics.* 2013; 13: 788-99.
25. Verwer PE, van Leeuwen WB, Girard V, et al. Discrimination of *Aspergillus lentulus* from *Aspergillus fumigatus* by Raman spectroscopy and MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 245-51.