

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDE *CANDIDA* CİNSİ MAYA
MANTARLARININ ÜREME SÜRELERİ VE BU
SÜRENİN KISALTILMASINA YÖNELİK
YAKLAŞIMLAR**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ELİF AYÇA ÜNAL**

**ANKARA
EYLÜL 2018**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDE *CANDIDA* CİNSİ MAYA
MANTARLARININ ÜREME SÜRELERİ VE BU
SÜRENİN KISALTILMASINA YÖNELİK
YAKLAŞIMLAR**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ELİF AYÇA ÜNAL**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AYŞE KALKANCI**

Bu tez, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
01/2017-18 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
EYLÜL 2018**

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY VE KABUL FORMU	i
ÖNSÖZ	ii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ	iv
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
Kandidemi Tanısı.....	7
Kültür	7
Isolator Mikrobiyal Sistem (Wampole, ABD)	7
Bact/Alert Kan Kültür Sistemi (bioMeriux, Fransa).....	9
Bactec Kan Kültür Sistemi (Beckton Dickinson,ABD).....	11
TREK ESP Kan Kültür Sistemi (ABD)	11
<i>Candida</i> ’ların Tanımlanması	13
Germ Tüp Testi	13
Mısır Unlu Agar Preparatlarında Oluşan Klamidospor, Blastospor, Hif, Pseudohif Gibi Yapıların Değerlendirilmesi	14
Asimilasyon ve fermantasyon testleri.....	15
Kromojenik Besiyerleri	16
Hızlı Tanıda Neler Kullanılabilir?	17
Serolojik Yöntemler	17
Moleküler Yöntemler	18
Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight (MALDI- TOF MS)	19
Peptid Nükleik Asit (PNA)-Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH).....	22
GEREÇ VE YÖNTEM	23

Çalışmada kullanılan kökenler.....	23
Kullanılan Araç ve Gereçler	23
<i>Candida</i> izolasyon ve tanımlama	27
Şişeden direk MALDI-TOF MS tanımlama yapılması	27
Üreme olan besiyerinden koloniye MALDI-TOF MS tanımlama yapılması	27
Rutin maya tanımlama	28
Laboratuvarımıza gelen kan kültürleri	30
BULGULAR	31
TARTIŞMA	46
SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR.....	58
ÖZET	74
ABSTRACT	76
ÖZGEÇMİŞ.....	77

TEZ ONAY VE KABUL FORMU



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Elif Ayça ÜNAL
Baba Adı	Rahmi
Doğum Yeri/Tarihi	Ankara – 28.03.1989
Diploma Tarihi / Diploma No	30.06.2013 / 2013-3232
Mezun Olduğu Fakülte	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl:4 Ay:6
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: KAN KÜLTÜRLERİNDE **CANDIDA** CİNSİ MAYA MANTARLARININ ÜREME SÜRELERİ VE BU SÜRENİN KISALTILMASINA YÖNELİK YAKLAŞIMLAR

JÜRİ KARARI: OY BİRLİĞİ İLE BAŞARILI

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

ÜYE

ÜYE

Prof. Dr. Sinan Tamer YILDIZKAN
Gülhanne Tıp Fak.
T. Mikrobiyoloji AD

Prof. Dr. Ayşe Kalkan

ÖNSÖZ

Başta tez çalışmam ve asistanlığım boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, eğitimimiz için elinden geleni yapan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Kalkancı' ya ve üzerimdeki emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım değerli hocalarım Prof. Dr. Gülendamar Bozdayı, Prof. Dr. Kayhan Çağlar, Prof.Dr. Işıl Fidan, Prof. Dr. Funda Doğurman Al, Prof. Dr. Nedim Sultan ve Prof. Dr. Meltem Yalınay'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam ve eğitimim boyunca bana yardımcı olan Kenan Yüce, Emine Esmer ve diğer teknisyen arkadaşlarıma, birlikte eğitim alıp çalışma şansı bulduğum değerli arkadaşlarım Ülker Hicran, Özge Karabulut, Gamze Gizem Duman, Zeynep Koç, Tuğba Çuhadar, Hande Durak, Hatice Kuralay ve Sidre Erganiş'e teşekkür ederim.

Tez dönemimde hayatıma giren ve bu dönemi daha güzel atlatmamı sağlayan sevgili Can Şahin'e, her zaman yanımda olan, bugüne gelmemde desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen canım kardeşim ve babama, yanımda olamasa da beni yetiştirip, bugüne gelmem için elinden geleni yapan güzel anneme minnettarım.

KISALTMALAR DİZİNİ

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

PNA-FISH: Peptid Nükleik Asit -Floresan in Situ Hibridizasyon

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1. Isolator Kan Kültür Sistemi.....	8
Şekil 2. Bact/Alert Kan Kültür Cihazı.....	9
Şekil 3. Kan kültür şişeleri.....	10
Şekil 4. Pozitif kan kültür şişelerinden mikroorganizmayı tanımlama	12
Şekil 5. MALDI-TOF MS tanımlama sisteminde çalışma prensibi	20
Şekil 6. MALDI-TOF MS cihazı (VITEK MS)	21
Şekil 7. Çalışmamızdaki iş akışı	26
Şekil 8. Çalışmamızdaki iş akışı (devamı)	29
Şekil 9. C. albicans kökeninin konsantrasyon ve şişelere göre sinyal süreleri(saat).....	31
Şekil 10. C. glabrata izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre sinyal süreleri (saat)	32
Şekil 11. C. parapsilosis kökenlerinin konsantrasyon ve şişelere göre sinyal süreleri (saat)	32
Şekil 12. C. albicans'ın tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması	38
Şekil 13. C. glabrata'nın tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması	39
Şekil 14. C. parapsilosis'in tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması	40
Şekil 15. Tüm kökenlerin tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması	41

Tablo 1. Hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları	5
Tablo 2. Fırsatçı mantarlarda insidans ve fatalite oranları.....	6
Tablo 3. Besiyerine göre şişelerin ortalama üreme süreleri	34
Tablo 4. Türlerle göre ortalama üreme süreleri.....	35
Tablo 5. Şişelerin türlerle göre ortalama üreme sürelerinin karşılaştırılması	36
Tablo 6. Türlerle göre gün bazında ortalama üreme süreleri ve saptanma oranları	44
Tablo 7. Türlerin gün bazında üreme sayıları	45

GİRİŞ VE AMAÇ

Vücutta normal flora elemanı olarak bulunan *Candida* türleri özellikle immün yetmezliği ve diğer altta yatan hastalığı olanlarda invaziv enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Kandidemi; tanısı ve tedavisi zor, dolayısıyla yüksek maliyetli bir enfeksiyon hastalığıdır. Ayrıca diğer mikroorganizmalara göre mortalitesi çok yüksektir (1-3). Uygun antimikrobiyal tedavinin en hızlı biçimde başlanması morbidite ve mortaliteyi önlemek açısından önemli olduğu gösterilmiştir (4-8). Mikrobiyolojik açıdan enfeksiyon etkeninin ve duyarlılığının klinisyene en hızlı şekilde bildirilmesi ve ampirik tedavinin acilen düzenlenmesi, sonucun laboratuvar tarafından hızla raporlanmasına bağlıdır (9).

Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türleri incelendiğinde *Candida albicans* en sık saptanan etken olmakla birlikte antifungallere dirençli olabilen diğer *Candida* türlerinin sıklığı azımsanamayacak düzeydedir (10, 11). Bu nedenle de tür düzeyinde tanımlamanın hızlı ve doğru yapıp klinisyene bildirilmesi önemlidir (12, 13).

Yapılan çalışmalarda kandidemi olgularında her yıl artış olduğu görülmüştür(14). Uygun antifungal tedavinin zamanında başlanmamasının, hastanın mortalitesini arttırdığı, hastanede yatış süresini uzattığı gösterilmiştir (15, 16). Hasta için antifungal tedavi gecikmesinde her saat önemlidir (17-20).

Bu çalışmanın amacı; kan kültürlerinde *Candida* cinsi mayaların üreme sürelerini hızlandırabilecek bir yaklaşım geliştirilmesi ve bu yolla hastalara erken tedavi başlanması sağlanmasıdır. Eğer kan kültürlerinde üreme süreleri

kısaltılabilecek olursa tanısı erken konulabilecek ve antifungal tedavisi zamanında başlanarak hastaların kandidemi nedenli mortaliteleri azaltılabilecektir. Ayrıca 03/12/2016 ile 17/04/2018 tarihleri arasında laboratuvarımızda saptanan kandidemi olgularının kan kültürlerinde mayaların üreme sürelerinin belirlenmesi ve *Candida* türleri arasındaki farkların gösterilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Bakteri, mantar ve virüsler vasküler sistemde bulunduklarında, bu durum sırasıyla, bakteriyemi, fungemi ve viremi olarak adlandırılır. Bulgu ve semptomlar olabilir, fakat bu bir kural değildir(21). Bunun tersine septisemi (sepsis); enfeksiyona karşı gelişen sistemik inflamatuvar yanıtı tanımlamaktadır. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS); farklı klinik uyarılara karşı konakta gelişen yanıt tanımlar. Vücut ısısının 38°C' nin üstünde veya 36 °C' nin altında olması, nabız sayısının 90 atım/dk'nın üzerinde olması, solunum hızının 20/dk'nın üzerinde veya parsiyel karbondioksit basıncının 32 mmHg'nin altında olması, lökosit sayısının 12.000/mm³'ün üzerinde ya da 4.000/mm³ 'ün altında olması veya genç nötrofillerin % 10'un üzerinde olması gibi bulgulardan en az iki tanesinin varlığı SIRS tanısı koydurur (22). Sepsis ise sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ile birlikte klinik veya mikrobiyolojik olarak dökümanente enfeksiyonun varlığı ile tanımlanır (22, 23).

En sık üriner sistem (ürosepsis), solunum sistemi enfeksiyonları, deri enfeksiyonları ve varlığında damar içi kateterler önemli sepsis kaynaklarıdır. Sepsise zemin hazırlayan durumlar şöyle sıralanabilir (24):

- Bağışıklık sisteminde bozukluk (immunsupresyon, nötropeni, ileri veya erken yaş,...)
- Altta yatan hastalıklar (Diabet, siroz, renal yetmezlik, ...)
- Majör cerrahi
- Yabancı cisim varlığı (İdrar kateteri, damar içi kateter, ...)
- Tıkaçıcı bir oluşum (Renal taş, safra kesesi taşı, ileus, ...)

- Steroid tedavisi
- Kemoterapi
- Daha önce antibiyotik kullanımı

Yaşlı hastalar, enfeksiyonlara fizyolojik cevap oluşturabilme rezervleri daha kısıtlı olduğundan sepsise daha yatkın hastalardır (25). Ayrıca yaşlı hastalarda sepsis sıklıkla atipik ya da nonspesifik bir klinik tablo ile meydana çıkabilir (26, 27).

Kandidemi, klinik olarak enfeksiyonun belirti ve bulguları olan bir hastada en az bir kan kültüründe bir *Candida* türünün izole edilmesidir. Pozitif kan kültürlerinin büyük kısmı gerçek kan dolaşımı enfeksiyonlarına bağlıdır. Bazen kan kültürü alım tekniklerine bağlı olarak kontaminasyon olabilmektedir. *Candida* türleri normal floranın bir parçasıdır. İnsanların % 40-50'sinin gastrointestinal kanalında, geçici ya da kalıcı olarak bulunurlar. Ancak, kan kültüründe tespit edildiğinde genelde enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmektedir. Mutlaka antifungal duyarlılık testi yapıp kliniğe bildirilmelidir (28, 29).

Dünyada hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarına sebep olan mikroorganizmalar arasında *Candida* türleri dördüncü sırada yer almaktadır (30-34). Fungal etkenler arasında da ilk sırada yer almaktadır (35).

Tablo 1. Hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları(30)

Sıra	Patojen	Sıklık (%)
1	Koagülaz negatif stafilokok	31,3
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	20,2
3	<i>Enterococcus species</i>	9,4
4	<i>Candida species.</i>	9,0
5	<i>Esherichia coli</i>	5,6
6	<i>Klebsiella species</i>	4,8
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,3
8	<i>Enterobacter species</i>	3,9
9	<i>Serratia species</i>	1,7
10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,3

Tablo 2. Fırsatçı mantarlarda insidans ve fatalite oranları(35, 36)

Mikroorganizma	İnsidans(milyon/yıl)	Fatalite(%)
Mayalar		
• <i>Candida species</i>	72,8	33,9
• <i>Cryptococcus species</i>	65,5	12,7
Küfler		
• <i>Aspergillus species</i>	12,4	23,3
• Zygomycetes	1,7	30,0
• Diğer	1,2	14,3

Doğada 150' den fazla *Candida* türü bulunur. Bu türlerden bir kısmının insanlarda sıklıkla patojen olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu türler; *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candia krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida lusitaniae* ve *Candida dubliniensis* olarak sıralanabilir (37-39).

C. albicans en sık kandidemi etkeni olmasına rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarda kandidemilerde albicans dışı *Candida* türlerinin oranının arttığı gösterilmiştir (13, 40-45). Albicans dışı *Candida*’ lara bağlı kandidemilerdeki artışın en önemli nedeni profilaktik ve ampirik olarak antifungallerin, özellikle azol türevi ilaçların kullanılmasıdır (15, 43, 46). *Candida* enfeksiyonlarının tanısında gecikme; hastane yatış süresini uzatmakta, maliyeti olumsuz etkilemekte ve en önemlisi mortaliteyi artırmaktadır (2, 26, 47-49). Yapılan çalışmalarda kandidemi

hastalarında mortalite oranı % 50'nin üzerinde olduğu gösterilmiştir (9, 50, 51). Bu nedenle tanısının erken konulması önemlidir.

Kandidemi Tanısı

Kandidemi tanısında pek çok yöntem kullanılmaktadır. Tanının daha hızlı konulabilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmektedir.(29)

Kültür

Kandideminin tespitinde altın standart test, pozitif kan kültüründen *Candida*'nın üretilmesidir.(28, 52) Bunun içinde kullanılan manuel ve otomatize olmak üzere iki çeşit kan kültürü yöntemi vardır.

Geçmişten beri kullanılan manuel sistemler; Konvansiyonel sıvı besiyeri esaslı sistem, Hemoline sistem, Oxoid Signal (Remel Inc., İngiltere), Isolator (Wampole laboratuvarları, ABD), Septi-Check (BD Diagnostics, ABD) kan kültür sistemleridir. Bunlar arasında mantarlar için en duyarlı yöntem Lizis Santrifügasyon Sistemi olan, Isolator kan kültür sistemidir.(53)

Isolator Mikrobiyal Sistem (Wampole, ABD)

Hem eritrositleri hem de lökositleri lizise uğratan bir kimyasal olan saponin içeren tüpe, hastadan alınan yaklaşık olarak 7,5–10 ml kan eklenir. Daha sonra tüp Şekil 2.1' de görülen açılı santrifüje konarak santrifüj edilir. Santrifüjden sonra, çökelti aspire edilir ve uygun katı besiyerine ekilir. Dolaşım sistemi enfeksiyonuna neden olan bakteri ya da mantar bu yöntemle izole edilebilir (53, 54).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, diğer konvansiyonel kan kültür sistemlerine göre, özellikle çift fazlı sıvı besiyeri esaslı sisteme göre Isolator sistem ile *Candida* türlerinin daha kısa sürede izole edildiği ve izole edilme oranının yükseldiği bildirilmiştir (54-57). Bazı çalışmalarda ise kontaminasyon oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (58).



Şekil 1. Isolator Kan Kültür Sistemi

Otomatik kan kültür sistemlerinden Bact/Alert (bioMeriux, Fransa), Bactec (BD Diagnostik Sistemleri,) ve TREK ESP (TREK Diagnostik Sistemleri, Cleveland) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bact/Alert Kan Kültür Sistemi (bioMeriux, Fransa)

Çalışmamızda kullanılan sistem Bact/Alert kan kültür sistemidir. Bu sistem için üretilen kan kültür şişelerinin alt kısmında kan-sıvı besiyeri karışımından yarı geçirgen membran ile ayrılmış şişenin içindeki karbondioksit miktarını gösteren kolorimetrik karbondioksit sensörü bulunur. Cihazın içinde bulunan inkübatör ünitesinde, her şişenin konulduğu ünitenin altında ışık veren ve ışık algılayan diyotlar vardır. Mikroorganizma üremesi ve metabolizması sonucu karbondioksit oluşması, yansıyan ışık miktarını değiştirir, şişenin algılayıcısı renk değiştirir. Yansıtmadaki değişiklik cihaz tarafından ölçülür.



şekil 2.Bact/Alert Kan Kültür Cihazı

Sistem şişelerinin birçok besiyeri içeriği mevcuttur:

1- 40 ml’lik katkılı triptik soya buyyonu içeren standart aerobik (SA) ve anaerobik (SN) besiyerleri

2- Beyin-kalp katı parçaları eklenmiş peptonla zenginleştirilmiş triptik soya buyyonu, ve kandaki antimikrobiyallere ve diğer indirgeyici maddelere bağlanarak onları inaktive eden aktif kömür tozu içeren 30 ml'lik aerobik FAN (FA) ve 40 ml'lik anaerobik FAN (FN) besiyerleri

3- Fazla miktarda kan alınamayan çocuk ve yaşlı hastalar için piyasada bulunan, beyin-kalp katı parçaları eklenmiş pepton ile zenginleştirilmiş triptik soya buyyonu ve aktif kömür tozu içeren daha düşük hacimli (20 ml) FAN besiyeri

4-Mikobakteri için besiyeri

Bu sistem için üretilen kan kültür şişelerinin genel olarak içerisinde; soya kazein pankreatik dijesti buyyon, aminoasitler, karbonhidratlar, pridoksin HCl, kömür tozu bulunmaktadır.

Şekil 3.Kan kültür şişeleri



Aerobik FAN (FA) kan
kültür şişesi
(çalışmamızdan)



Anaerobik FAN (FN)
kan kültür şişesi
(çalışmamızdan)

Bactec Kan Kùltür Sistemi (Beckton Dickinson, ABD)

Bact/Alert sistemine benzer olarak bu cihaza ait her kan kùltür şişesi dip kısmın iç yüzeyine bağlanan sensör diske sahiptir. Bact/Alert sisteminden farklı olarak şişede mikroorganizma üremesi sonucu oluşan CO² konsantrasyonundaki değışiklikleri bulmak için spektral ışığın yerini florasan alır.

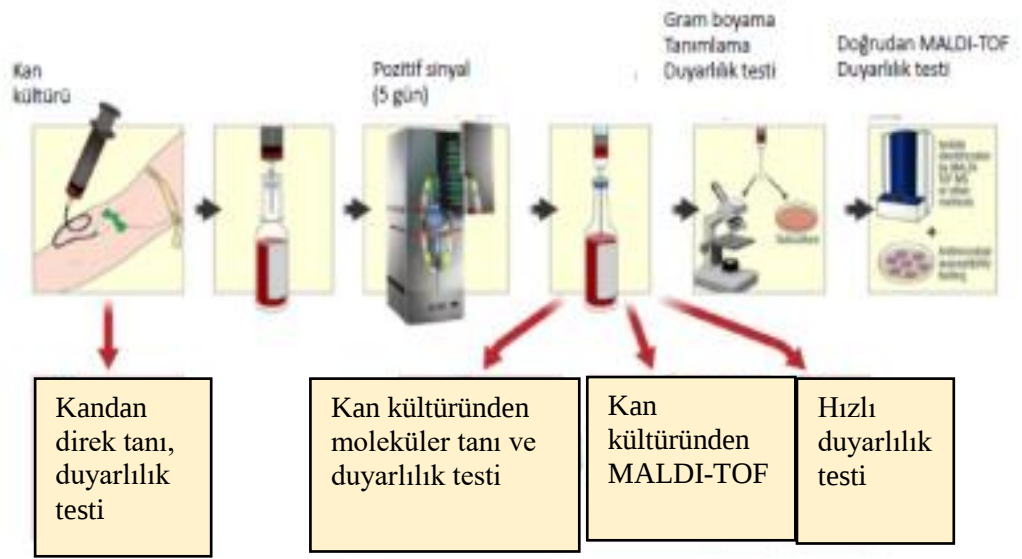
Şişeler 10 dakikada bir kontrol edilen alıcı bölümlerin dibine yerleştirilir. Bact/Alert sisteminde olduğu gibi üreme olduğu zaman cihaz uyarı verir. Şişe çıkartılır ve gram boyama yapılır.

TREK ESP Kan Kùltür Sistemi (ABD)

Bu sistemde, şişeler cihaza yerleştirildikten sonra şişenin başlık boşluğunda mikroorganizmalar tarafından üretilen veya tüketilen gazlarda (oksijen, hidrojen, nitrojen ve karbondioksit) oluşan basınç değışiklikleri dönüştürücü ile takip edilir. Yani manometrik ölçüm yapılır. Aerobik (REDOX1) şişeler her 12 dk'da, anaerobik (REDOX2) şişeler her 24 dk'da bir kontrol edilir.

Bu sistem O₂ gazındaki basınç değışikliklerini de ölçebildiği için CO₂ üretimi az olan mikroorganizmaların saptanma olasılığı artar.

Bu otomatize sistemlerde kan kùltür şişesinde üreme olduğunda, mantarların izolasyonunu sağlamak için en sık Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) olmak üzere, % 5 koyun kanlı agar gibi rutin besiyerleri de kullanılabilir. Bu sistemler kùltür pozitif olduğu zaman sinyal verir ve pozitif kùltür şişesi gram boyama ve subkùltür için kullanılabilir. Bu sistemlerde aerobik şişe kuluçka süresi beş gün, anaerobik şişe kuluçka süresi yedi gün olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. Pozitif kan kültür şişelerinden mikroorganizmayı tanımlama (59)

Cihazların mikroorganizmayı tespit zamanı pek çok faktöre bağlıdır (59).

Kan kültür sonuçlarını etkileyen bu değişkenler;

- Kan kültür şişesinde bulunan besiyeri, antikoagülanlar, antimikrobiyallerin nötralizasyonunu sağlayan maddeler gibi çeşitli bileşenler
- Örneğin inkübasyon süresi
- Hastadan alınan kan hacmi ve kültür sayısı
- Örneğin alınma zamanı
- Cilt antisepsisinin uygun yapılmaması ve kontaminasyon

Cihazların mikroorganizma tespit zamanını kısaltmak için bu değişkenler üzerinde pek çok araştırma yapılmıştır. Aerobik, anaerobik, mikobakteri ve mayalar için farklı kan kültür şişeleri üretilmiştir. Bu şişeler arasında mikroorganizma tespit zamanı araştırılmıştır (60, 61).

***Candida*'ların Tanımlanması**

Candida türlerinin tanımlanmasında germ tüp testi, kromojenik besiyeri kullanımı, biyokimyasal/asimilasyon testleri, mısır unlu agardaki morfoloji, hızlı tanı yöntemleri (enzimatik ve florojenik testler) ve giderek artan sıklıkta kullanılan moleküler ve kütle spektrometre yöntemleri gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır (21, 62).

Germ Tüp Testi

Germ tüp maya hücresinin filamantöz uzantısına verilen isimdir ve ana maya hücrenin yaklaşık yarısı genişliğinde ve üç ile dört kat uzunluğundadır. *C. albicans* tarafından üretilen gerçek germ tüpün boyun kısmında yani hifal uzantının ana hücre ile bağlantısı olduğu yerde daralma bulunmaz. Germ tüp gerçek hif yapısının ilk başlangıç fazıdır ve yalancı hif için karakteristik olan daralma bulunmaz. *C. tropicalis* eğer dikkatli şekilde incelenmezse germ tüp ile karışabilen yalancı germ tüp oluşturur (21).

Test edilecek maya kolonisinden bir miktar alınarak 0,5 ml insan veya tavşan plazması veya serumu içeren test tüpüne konulur. 35°C'de 2 saati geçmeyecek şekilde inkübe edilir. Ayrıca *C. dubliniensis*'de germ tüp oluşturabilmektedir (63).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, pozitif kan kültür şişesinden direk yapılan germ tüp testiyle *C. albicans* tanımlama süresini anlamlı şekilde kısalttığı gösterilmiştir (7).

Mısır Unlu Agar Preparatlarında Oluşan Klamidospor, Blastospor, Hif, Pseudohif Gibi Yapıların Değerlendirilmesi

Mısır unlu-Tween 80 agara öze ile 1 cm aralıkla üç çizgi halinde ekim yapılır. Agar yüzeyine inokülasyon çizgilerini kaplayacak şekilde lamel kapatılır. 30°C’de 24-48 saat boyunca kapalı nemli bir bölmede inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda lamel üzerinden mikroskopik inceleme yapılır.

Özellikle germ tüp negatif izolatların tanımlanmasında önemlidir. Türlerle göre mısır unlu agarda görülen yapılar;

C. albicans: Klamidospor varlığı, yoğun kümeler oluşturmuş ve yalancı hif boyunca eşit olarak dağılmış blastokonidya üretimi

C. tropicalis: Yalancı hif boyunca tek tek veya küçük kümeler oluşturmuş blastokonidyumlar. Bu patern *C. tropicalis* için spesifik olmadığı için ileri tanımlama sistemlerine ihtiyaç vardır.

C. parapsilosis: Çalı görünümüne benzeyen ekim çizgilerine bitişik çok sayıda fokal alanı olan satellit üreme paterninin gözlenmesi

C. kefyr: Yalancı hifler ve uzun “ağaca benzer” dizilim gösteren dikdörtgen şeklinde blastokonidyumlar.

C. krusei’de yalancı hifler ve uzun dikdörtgen şeklinde blastokonidyumlar oluşturur. Ayrımı için ileri testlere gerek olabilir.

C. glabrata: Küçük, yalancı hif yapmayan boyut farkı ve ayrılma göstermeyen sıkı kümeler halinde dizilen blastokonidyumlar.

Asimilasyon ve fermentasyon testleri

Asimilasyon testi; bir mayanın oksijen varlığında belirli bir karbonhidratı veya nitratı tek karbon veya nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer (64), Özellikle *Candida* türleri için karbonhidrat asimilasyon testlerine göre ayırım yapılır.

Karbonhidrat fermentasyon testi; mayanın karbonhidratı enzim yardımıyla parçalamasıyla asit ve gaz oluşumuna dayalı testlerdir. *Candida* türlerinin ayırt edilmesinde karbonhidrat fermentasyon testi, karbonhidrat asimilasyon testine göre daha az duyarlıdır. Rutin laboratuvarlar tarafından asimilasyon ve fermentasyon testlerinin kullanılmasının zaman alması ve zahmetli olması nedeniyle ticari sistemler kullanılmaktadır.

Ticari sistemler; germ tüp testini, klamidospore oluşumunu, şeker asimilasyon deneylerini veya enzimatik reaksiyonları içermektedir. Bu ticari yöntemler genellikle *Candida* türlerinin daha rahat ve hızlı bir şekilde tanınmasını sağlayan geleneksel testlerin minyatür versiyonunu temsil etmektedir. Klinik laboratuvarların çoğunda API 20C (bioMerieux, France), ID 32C (bioMerieux, France) ve VITEK 2/YST (bioMerieux, France) gibi hazır ticari test sistemleri kullanılmaktadır. Bunların içerisinde en yaygın kullanılanlar API sistemleridir (64, 65).

ID 32C (bioMerieux, France) sistemi güvenilir, fakat 24-72 saatte sonuç veren, zaman alıcı bir yöntemdir. 24 karbohidrat, 5 organik asit asimilasyonu, eskülin hidrolizi ve siklohekzimid duyarlılığının tespitine dayanan, 32 kuyucuktan oluşan bir tanımlama sistemidir. Test paneli 30°C'da inkübe edilir, 24-48 ve 72.

saatlerde reaksiyonlar kuyucuklardaki bulanıklığa göre değerlendirme yapılır (65, 66). 64 maya türünü güvenilir bir şekilde tanımlayabildiği için çoğu araştırmacı bu sistemi standart sistem olarak kullanmaktadırlar. 43 maya türünü tanımlayabilen API 20 C (bioMérieux, France) sistemi de benzer bir sistem olup, 19 karbonhidrat asimilasyonunu değerlendiren negatif kontrolü ile birlikte 20 kuyucuklu bir testtir. ID 32 C (bioMérieux, France) ile aynı inkübasyon şartlarına sahiptir (64, 67).

VITEK 2/YST (bioMérieux, France) kart ise tam otomatize bir sistem olup kullanılan VITEK 2/YST (bioMérieux, France) kartı 53 tür mayayı, karbohidrat ve organik asit asimilasyon profilleri ile oksidaz ve arilamidaz aktivitelerini, floresan temelli bir yöntemle tespit ederek tanımlamaktadır. 15 saatlik bir inkübasyondan sonra ölçtüğü değerleri kendi kütüphanesiyle karşılaştırarak sonucu bildirebilmektedir (68).

Kromojenik Besiyerleri

Besiyerine belirli substratların ve kromojenlerin eklenmesi, özgül enzimatik aktivite özellikleri ile belirli mayaların saptanmasına olanak sağlamaktadır. CHROMagar Candida, *C. albicans*, *C. tropicalis*, ve *C. krusei*'nin eş zamanlı izolasyonu ve ön tanısı için kullanılabilecek bu tip bir besiyeridir. CHROMagar mantarlar için seçicidir ve bu besiyerinin kullanımı, organizmanın ön tanısı için geçen süreyi kısaltmaktadır. Ayrıca bu besiyeri, farklı *Candida* türlerinin oluşturduğu karakteristik koloni renkleri ile çoklu maya türünün bulunduğu örneklerde mayaların kolayca tespitine olanak sağlar (69).

Hızlı Tanıda Neler Kullanılabilir?

Ciddi mantar enfeksiyonları için hızlı, duyarlı ve özgül tanı testleri, etkene yönelik özgün tedavinin daha erken ve doğru şekilde uygulanmasına olanak sağlayacaktır. Bu bağlamda, antikor ve antijenleri, metabolitleri ve mantara özgül nükleik asitleri saptayan testlerin büyük önemi vardır.

Serolojik Yöntemler

Serumda mantar elemanlarına karşı oluşan antikor veya mantara ait antijen titrelerinin saptanması, mantar enfeksiyonlarının tanısında yararlı olabilir. Kültür ile tanımlama altın standart kabul edilmekle birlikte serolojik testler ile kıyaslandığında, serolojik yöntemler enfeksiyon hakkında daha hızlı sonuç sağlamaktadır. Klinisyenlerin tedavi yönetiminde ilk başvurdıkları yöntemlerdendir. Seri olarak izlendiğinde antikor antijen titreleri hastalığın seyri konusunda da bilgi vericidir. Ancak invaziv mantar enfeksiyonlarının kesin tanısı için yeterli duyarlılığa ve özgüllüğe sahip değildirler (70).

1) İmmünodiffüzyon (ID): Kolay ve pahalı olmayan bir yöntemdir, ama duyarlılığı düşüktür, bu da tedavi izlemede kullanılmamasına neden olmaktadır.

2) Counter İmmünelektroforez (CIE): Daha duyarlı ve kolay bir yöntemdir.

3) Kompleman Fiksasyon Testi

4) Radioimmünassay (RIA)

5) ELİSA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Candida için ID ve CIE kolay ve pahalı olmayan yöntemlerdir. Ama duyarlılığı düşüktür. Mukozal kolonizasyon nedeniyle yanlış pozitiflik ya da

immün yetmezlikli hastalarda yanlış negatiflik verebilir.

Candida için mannan antijenleri ve anti-mannan antikorlarını saptayan immünolojik yöntemler günümüzde ticari olarak bulunmaktadır (71). *Candida* için diğer bir hücre duvarı bileşeni 1,3-beta-glukandır. Bu antijen *Candida* ve *Aspergillus* ile enfekte olmuş hasta serumlarında, limulus lizat testi ile saptanabilir (70).

Moleküler Yöntemler

Kan kültürü sepsis hastalarında tanıda altın standart olmakla birlikte mikroorganizma tespiti açısından duyarlılığı düşüktür. Sadece kültürü yapılabilen mikroorganizmaları tespit etmekte, geç üreyen mikroorganizmaların tespitinde yanlış negatiflikler vermektedir. Ayrıca uzun süren inkübasyon tanımlamayı geciktirmektedir. Bu nedenle çeşitli moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir (52, 72).

Moleküler tanımlama yöntemleri; gerek klinik materyalde mayaların varlığının gösterilmesi ve tanımlamasında, gerekse klinik örneklerden izole edilen mayaların tanımlanmasında hızlı ve güvenilir testler olarak kullanıma girmiştir. Duyarlılığı rutinde uygulanan testlere göre daha yüksektir ve bu testler daha hızlı sonuç vermektedir (73, 74). Moleküler yöntemler sadece mantarı tanımlamak için değil, ilaç direncini saptama ve epidemiyolojik tiplendirme amacı ile de kullanılabilir. Bunların dışında son yıllarda, gen dizi analizine dayalı moleküler uygulama yöntemleri, başta *Candida* türleri olmak üzere mantarların tanımlanmasında kullanılmaktadır. Fakat tüm bu yöntemlerin özel laboratuvar

koşulları ve yüksek maliyet gerektirmeleri nedeniyle rutinde kullanımları kısıtlıdır. Bu yöntemler rutin tanımlamada kullanılmaktan çok, araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında en sık kullanılanlar nested PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu), klasik PZR ve son yıllarda duyarlılık ve özgüllük açısından öne çıkan gerçek zamanlı PZR'dir (75-77).

Pozitif kan kültür şişesine direk moleküler yöntemler uygulanması da başka bir yöntemdir. Bunun için FDA (Food and Drug Administration) onaylı iki geniş panel bulunmaktadır. (FilmArray Blood Culture Identification (BCID) Panel- BioFire Diagnostics, ABD; Verigene-Nanosphere, ABD) Gram negatifleri, gram pozitif bakterileri ve mayaları 1-4 saat içerisinde tanımlayabilmektedir. Ama pahalı olmaları nedeniyle rutinde kullanılmamaktadır (59).

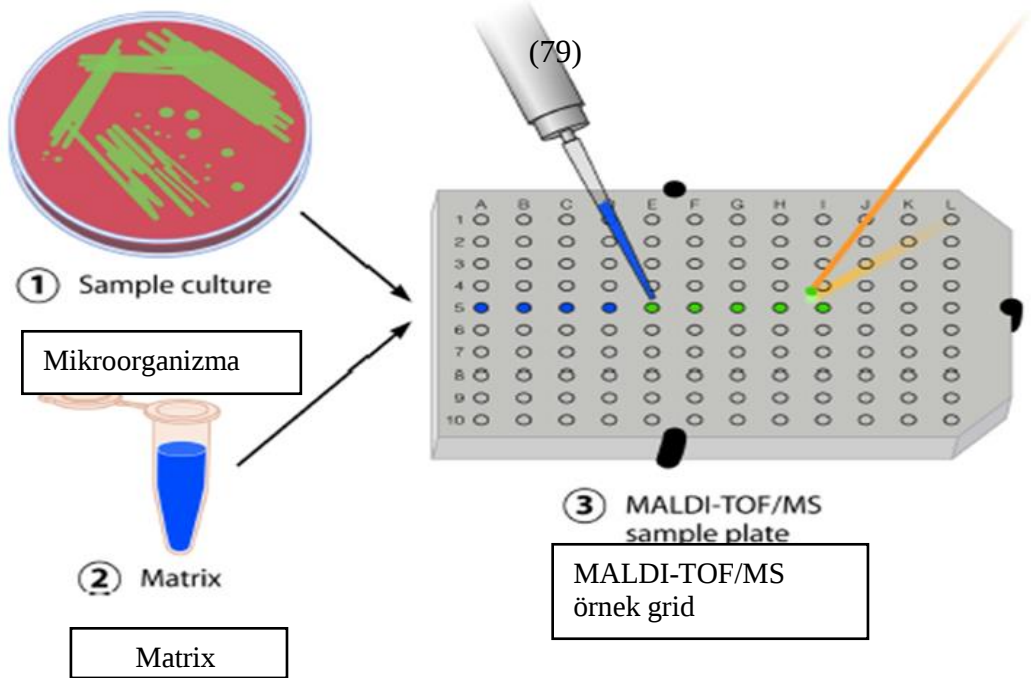
Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight (MALDI-TOF MS)

Türe özgül peptid ve protein kütle kalıplarını kullanarak mikroorganizmaları tanımlamaktadır. Çok çeşitli bakterilerin tanımlanmasında son derece doğru olduğu ve son zamanlarda mayaların da hızlı tanı ve güvenilir tanısına olanak sağlayan güvenilir bir araç olduğu gösterilmiştir (78).

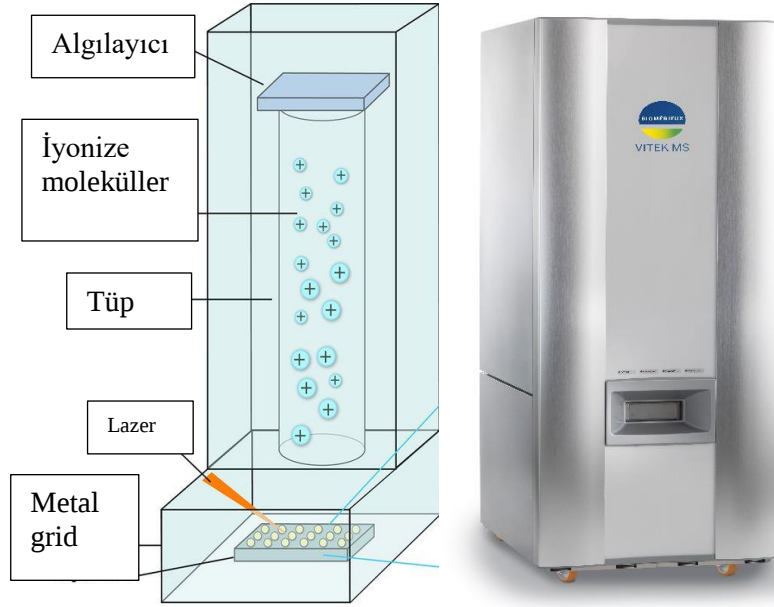
Bu yöntem mantar hücrelerinden proteinlerin ekstraksiyonu temeline dayanır. Materyalin bir alan (grid) üzerine konulmasını ve alanın matriks ile kaplanmasını içerir. Matrix zayıf asit çözeltisidir ve kolayca proton verir. Lazer ışığını tutar ve ortamın ısınmasını sağlar bu sayede moleküller yüzeyden ayrılır ve matrixten aldığı proton ile pozitif yüklenir. İyonize olup ayrılan bu moleküller tüpün içerisinde yüksek elektrik akımı sayesinde algılayıcıya doğru hızlandırılır.

Moleküllerin parçalanmaması ve hava moleküllerine çarpmaması için tüpün içerisi boşaltılır. Molekül ağırlığına göre yüksek molekül ağırlığında olanlar daha yavaş, düşük molekül ağırlığında olanlar daha hızlı algılayıcıya ulaşır ve kütle spektrum hızlıca oluşturulur, referans veri tabanı ile karşılaştırılır.

Şekil 5. MALDI-TOF MS tanımlama sisteminde çalışma prensibi



Yapılan çalışmalarda MALDI-TOF MS sisteminin düşük sarf harcaması, sonuçlarının kolay yorumu ve hızlı devir süresi gibi avantajları olduğu, yüksek derecede doğru sonuç verdiği gösterilmiştir (70).



Şekil 6. MALDI-TOF MS cihazı (VITEK MS)

Pozitif kan kültürü şişelerinden ekilen plaklarda üreyen bakteriyi ya da mayayı MALDI-TOF MS ile tanımlama FDA onayı almıştır. Son zamanlarda bazı çalışmalarda pozitif kan kültür şişesinden direk MALDI-TOF MS tanımlaması yapılmaya başlanmıştır. Şişenin içeriğinde bulunan sıvı; kan bileşenleri, besiyeri ve başka makromoleküller nedeniyle tanımlama yapılmadan önce yıkama, liziz gibi çeşitli işlemlerden geçmelidir. Birçok çalışmada bunun için çeşitli protokoller geliştirilmiştir (80, 81). Bunun için çeşitli ticari kitler de (Sepsityper, Bruker Daltonics, Germany) üretilmiştir. Ama sonuçlar plaktan tanımlamadaki kadar başarılı değildir (59). Buna sebep olarak kan hücreleri proteinlerinin spektrumlarının karışması, şişe içeriğinde kömür varlığı ya da mikroorganizma miktarının az olması gösterilmiştir (82).

Peptid Nükleik Asit (PNA)-Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)

PNA-FISH testleri, floresan ile işaretli PNA problemleri *Candida* türlerini ribozomal nükleik asitlerini (rRNAs) saptamaktadır. Bu yöntemde, pozitif kan kültür şişesi içeriğinden direkt olarak hazırlanan preparata problemler eklenir ve 90 dakika hibridize edilir. Preparatlar daha sonra floresan mikroskobu ile incelenir (70). Bu testin, kan kültüründen direkt olarak *Candida* türlerinin tanımlanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir (83-87).

Bu yaklaşım tanımlamada kullanılan konvansiyonel yöntemlerle kıyaslandığında, 24-48 saat zaman kazancı sağlayabilir. Böylece klinisyenlere pozitif kan kültür sonuçları ile birlikte, tanımlanan maya ile ilgili bilgi de verilmiş olur. Ayrıca erken tanı ile doğru antifungalın kullanılmaya başlanması maliyet açısından da yarar sağlamaktadır (85).

Çalışmamızdaki amacımız laboratuvarımıza gelen kan kültürlerinde saptanan mayaların dağılımını ve üreme sürelerini belirlemek, bu etkenlerin tanımlanmasını sağlayan rutinde kullandığımız karbonhidrat asimilasyon yöntemi ile MALDI_TOF MS yönteminin tanımlama sürelerini karşılaştırmak ve bu etkenlerin kan kültürü şişelerinde üremesini hızlandırabilecek yeni yaklaşımlar geliştirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan kökenler

Çalışmada *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection) 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030 kökenleri kullanıldı. Ayrıca klinik örneklerden elde ettiğimiz *E.coli*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* izolatları kullanıldı.

Kullanılan Araç ve Gereçler

Kullanılan Cihazlar

- Otoklav (Hirayama)
- Etüv (Nüve)
- Buzdolabı (Uğur)
- Otomatik Pipet
- Hassas Terazî (Kren)
- Vortex (Velp)
- Vitek MS (bioMerieux)
- Mc Farland Cihazı(bioMerieux)
- BacT/Alert Kan Kültür Cihazı (bioMerieux)
- Gram Boyama Cihazı (bioMerieux)

Kullanılan Ticari Kitler

- API ID 32C (bioMerieux)
- VITEK MS tanımlama kiti (bioMerieux)

Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Potasyum Bisülfat(Sigma)
- Sığır Serum Albumin(Multicell)
- Eritrosit Lizis Solüsyonu(Roche)
- PBS(Amresco)
- Matrix Solüsyonu (bioMerieux)
- Formik Asit (bioMerieux)

Kullanılan Besiyeleri

- Maya için özel besiyeri

Mayaları kan kültür cihazında daha hızlı üretebilmek için tarafımızdan özel besiyeri hazırlanmıştır. Beyin kalp infüzyon agar (Conda) 7,1 g 200 ml distile su içerisinde çözdürüldü. İçerisine % 0,1 derişiminde olacak şekilde potasyum bisülfat (Sigma) eklendi. Otoklav (Hirayama) cihazında 121°C' de 15 dakika otoklavlandı. Membran filtreden geçirilen %1'lik serum sığır albümin (Multicell) 4 ml miktarında, hazırlanan besiyerine eklendi. Daha sonra hazırlanan bu özel besiyeri aerobik ve anaerobik kan kültür şişelerine, şişe içeriğinin % 10'u olacak şekilde, aerobik şişeye 3 ml ve anaerobik şişeye 4 ml enjektör aracılığıyla eklendi.

- Kullanılan diğer besiyerleri

Çalışmamızda BacT/Alert (bioMerieux, France) kan kültür cihazı için üretilen aerobik (FA) ve anaerobik (FN) kan kültür şişeleri tüm seri dilüsyonlar için

karşılaştırma amaçlı hem mantar özel besiyeri eklenmiş hem de eklenmemiş olarak kullanıldı.

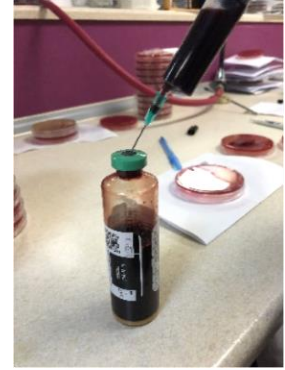
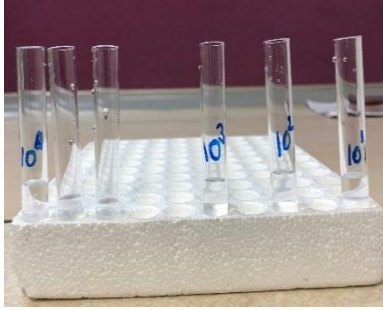
Kan kültür cihazının pozitif sinyal verdiği şişelerden inokülasyon yapmak üzere üretici firmadan hazır olarak satın alınan koyun kanlı besiyeri (bioMerieux, France) ve SDA (bioMerieux, France) kullanıldı.

- Simülasyon amaçlı hazırlanan kan kültür şişeleri

Hastanemiz kan merkezinden temin edilen zamanı geçmiş insan eritrosit süspansiyonundan 10 ml olacak şekilde şişelere enjektör aracılığıyla konuldu.

Çalışmamızda $1-5 \times 10^6$ maya konsantrasyonunda 0,5 Mc Farland ölçüsünde ayarlanan *Candida* kökenlerinin 10^3 , 10^2 , 10^1 hücre/ml maya konsantrasyonunda olacak şekilde seri dilüsyonları yapıldı. Bu dilüsyonlardan maya için hazırlanan özel besiyeri eklenmiş ve eklenmemiş aerobik ve anaerobik kan kültür şişelerinin her birine 1 ml maya süspansiyonu eklendi. Her suştan 12 kan kültür şişesi hazırlandı.

Hazırlanan bu şişeler bekletilmeden inkübasyon için aerobik şişeler için 5 gün anaerobik şişeler için 7 gün olmak üzere kan kültür cihazında inkübasyona bırakıldı. Cihaza yerleştirildiği saat ve pozitif sinyal veren şişelerin pozitiflik verdiği saat kaydedildi. Özel besiyeri eklenmiş ve eklenmemiş şişelerin üreme zamanları karşılaştırıldı.



Mayalar önce süspansiyonda $1-5 \times 10^6$ cfu/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 1000, 100, 10 hücre/ml dilüsyonları hazırlandı.

Hazırladığımız özel maya besiyeri şişe besiyerinin % 10'u olacak şekilde eklendi.

Her şişeye 10 ml sağlıklı insan eritrosit süspansiyonu eklendi.



Hazırlanan şişelere 1 ml sırasıyla 10^3 , 10^2 , 10^1 hücre/ml konsantrasyonlarında maya süspansiyonu eklendi. Ve inkübasyon amacıyla cihaza yüklendi.

Şekil 7.Çalışmamızdaki iş akışı

Candida izolasyon ve tanımlama

Sinyal veren kan kültür şişelerinden gram boyama yapıldı ve maya hücreleri görüldü. Koyun kanlı besiyerine enjektör aracılığıyla alınan 0,5 ml kan inoküle edildi. 37°C’de 24-48 saat olacak şekilde etüvde inkübasyona bırakıldı.

Şişeden direk MALDI-TOF MS tanımlama yapılması

Pozitif sinyal veren şişeden enjektörle 1 ml sıvı alınıp 2 ml’lik kapaklı ependorf içine konuldu. -20°C’de 5 dakika bekletildi. Eritrositleri parçalamak amaçlı 3 ml lizis buffer kullanıldı 10.000 devirde santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvı döküldü. Dipte kalan pellet beyaz renge dönene kadar aynı işlem tekrar edildi. Üzerine 1 ml stop solüsyonu (PBS) eklendi. Materyal metal slayta yayıldı. Üzerine 0,5 µl % 25 formik asit ve 1 µl matriks solüsyonu CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi. Kalite kontrol kökeni olarak *E.coli* 8739 kullanıldı. Hazırlanan slayt 1-2 dk kurumaya bırakıldı ve firmanın önerileri doğrultusunda VITEK MS cihazı kullanılarak tanımlama yapıldı

Üreme olan besiyerinden koloniye MALDI-TOF MS tanımlama yapılması

Maya üremesi olan kanlı besiyerinden üreticinin önerdiği şekilde metal slayta 24 saatlik kolonilerinden bir parça, öze yardımıyla alındı. VITEK MS tanımlama slaytı (target slayt) üzerinde bulunan, 3 tanesi kalite kontrol için kullanılan 51 adet kuyucuktan (spot) her birine bir adet köken olacak şekilde ince bir tabaka halinde yayıldı. 0,5 µl % 25 formik asit ve 1 µl matriks solüsyonu CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi. Kalite kontrol kökeni olarak *E.coli* 8739 kullanıldı. Hazırlanan slayt 1-2 dk kurumaya bırakıldı ve firmanın önerileri

doğrultusunda VITEK MS cihazı kullanılarak tanımlama yapıldı

Simüle tüm kan kültür şişeleri, kan kültür cihazına konulduktan itibaren mayanın isimlendirmesine kadar geçen süre rutin tanımlama süresiyle karşılaştırılmak üzere kaydedildi.

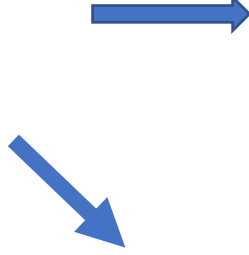
Rutin maya tanımlama

SDA besiyerine ekilen mayalara germ tüp yapıldı. Tanımlamanın doğruluğunun kanıtlanması amacıyla tüm mayalara ID 32C (bioMerieux, France) ile tanımlama yapıldı. Prosedüre uygun olarak maya kolonisinden bir miktar alınarak 2 ml'lik mediumda 0,5 MF bulanıklık ayarlandı. 7 ml'lik mediumdan 135 µl alınıp negatif kontrol kuyucuğuna konuldu. 2 ml'lik mediumdan 250 µl alınıp 7 ml'lik mediuma konuldu. Daha sonra 7 ml'lik mediumdan 135 µl alınarak kuyucuklara konuldu. Etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Kan kültür şişeleri cihaza konulmasından itibaren mayaların tanımlanmasına kadar geçen süre MALDI-TOF MS yöntemiyle karşılaştırılmak üzere kaydedildi.



Pozitif kan kültür şişesi



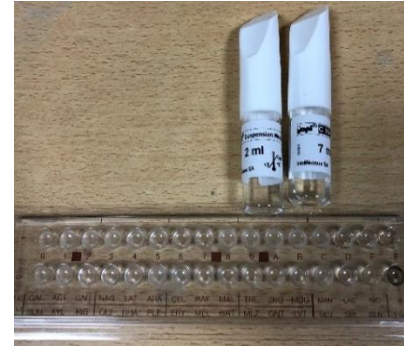
Gram boyama yapıldı



Pozitif şişeden kanlı ve SDA'ya
pasaj yapıldı.



VITEK MS
çalışıldı.



ID 32C çalışıldı.

Şekil 8.Çalışmamızdaki iş akışı (devamı)

Özel mantar besiyerinin bakterilere etkisi

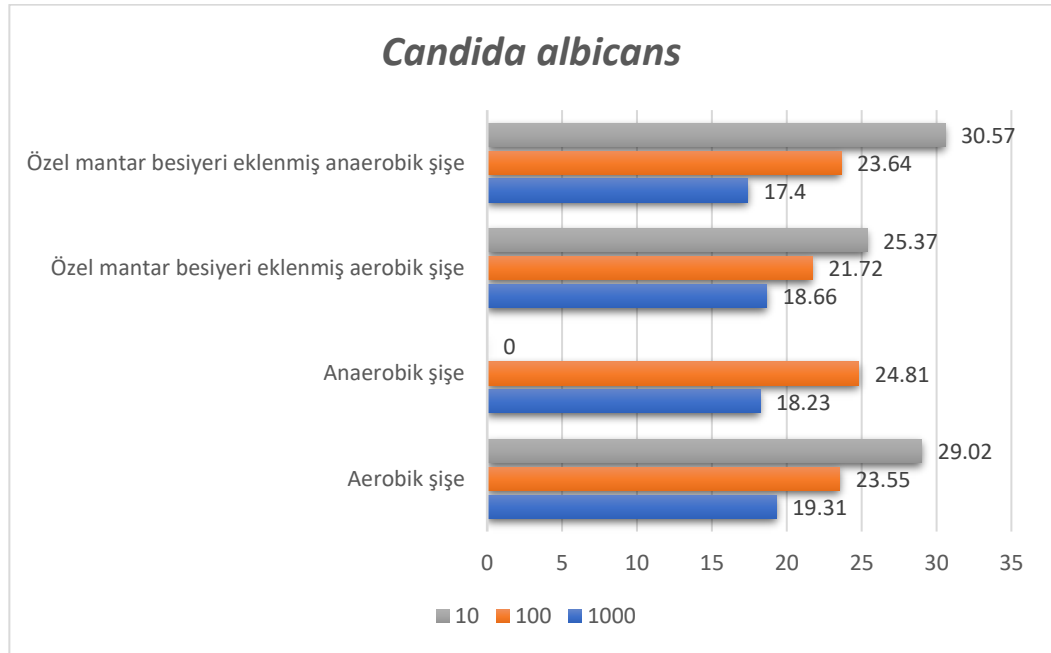
Çalışmada kullandığımız kan kültür şişelerine eklenen özel mantar besiyerinin bakterilerin üremesinde etkisi olup olmadığını gözlemlemek amacıyla laboratuvarımıza gelen klinik örneklerden izole edilen *E.coli*, *K. pneumoniae*, *S. Aureus*, *E. feacalis* bakterileri, özel mantar besiyeri içeren aerobik kan kültür şişelerine 10^2 konsantrasyonda ekildi. Ekilen dört bakterinin de ürediği gözlemlendi.

Laboratuvarımıza gelen kan kültürleri

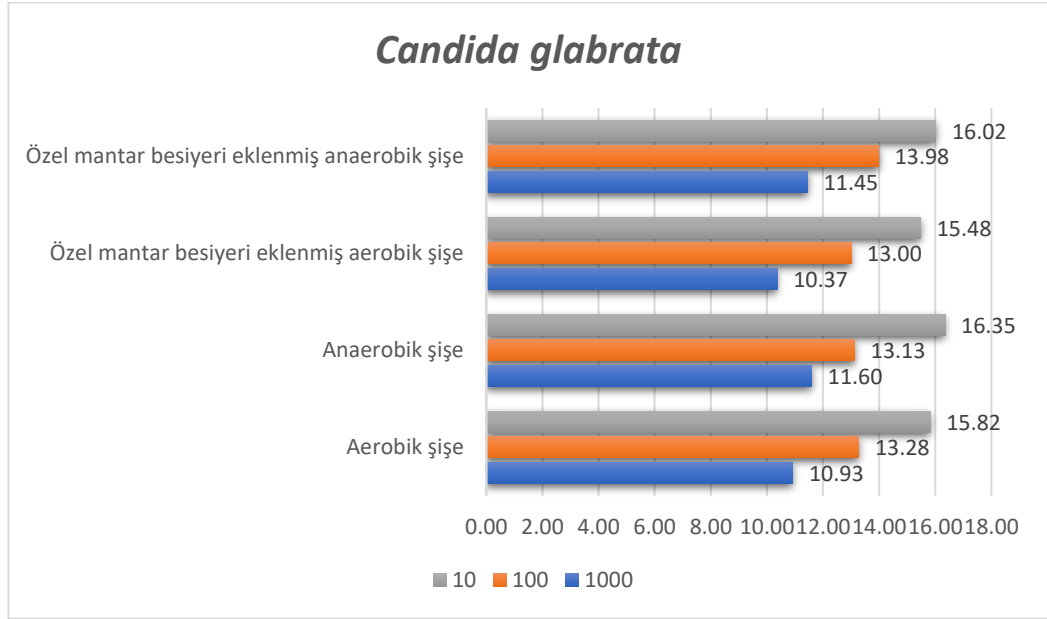
Laboratuvarımıza 03/12/2016 ile 17/04/2018 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gelen kan kültürlerinde maya üremesi olanlarda, mayanın türü ve üreme zamanı kaydedildi. Türlerle göre üreme zamanları karşılaştırıldı.

BULGULAR

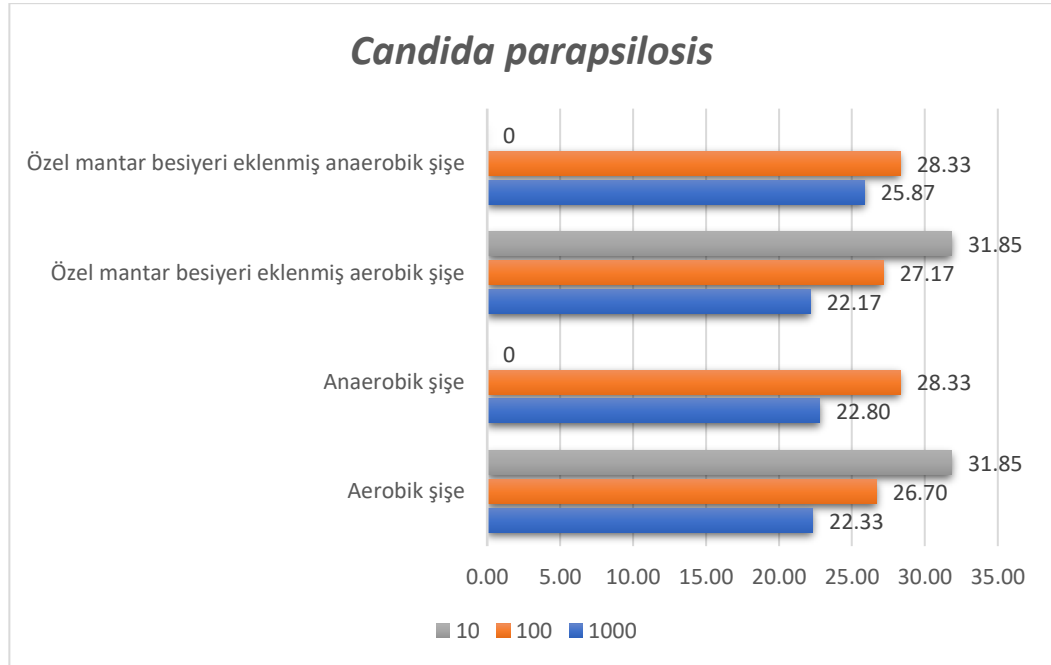
Çalışmada kullanılan *C. albicans* ATCC (American Type Culture Collection) 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030 kökenleri üç farklı konsantrasyonda (10^1 , 10^2 , 10^3 hücre/ml) ve dört farklı kan kültür şişesine (Bact/Alert Aerobic/FA Medium, Bact/Alert Anaerobic/FAN Medium, ve özel maya besiyeri eklenmiş Aerobic/FA ve Anaerobic/FAN Medium) inokülasyonu yapılmıştır. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. Buna göre kökenlerin konsantrasyon ve şişelere göre pozitif sinyal verme süreleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3'te özetlenmiştir.



Şekil 9. *C. albicans* kökeninin konsantrasyon ve şişelere göre sinyal süreleri(saat)



Şekil 10. *C. glabrata* izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre sinyal süreleri (saat)



Şekil 11. *C. parapsilosis* kökenlerinin konsantrasyon ve şişelere göre sinyal süreleri (saat)

Elde ettiğimiz verilere göre pozitif sinyal süresinin; şişenin tipine, *Candida* türüne ve şişelerin içindeki maya konsantrasyonuna göre değiştiği belirlendi.

Şişelerin besiyerine göre ortalama sinyal süreleri istatistiksel olarak hesaplandı ve Tablo 4.1.'de gösterildi. Bu verilere göre aerobik şişe, anaerobik şişe, özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik ve anaerobik kan kültür şişelerinde ortalama üreme süresi sırasıyla yaklaşık olarak 21,5; 19,5; 20,5 ve 21 saat olarak bulundu. Bu sonuçlara göre en uzun sürede aerobik şişe pozitif sinyal verirken anaerobik şişenin ortalama olarak en kısa sürede pozitif sinyal süresi verdiği belirlendi. Burada dikkat edilmesi gereken nokta tüm aerobik şişelerde üreme saptanmasına rağmen anaerobik şişelerde *C. parapsilosis* ve *C. albicans* kökenlerinde 10 hücre/şişe konsantrasyonda iki kere deneme yapılmasına rağmen üreme saptanamamış olmasıdır. Aynı konsantrasyonda özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişelerde ise üreme olduğu gözlemlendi.

Özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişelerde ortalama üreme süresi eklenmemiş aerobik şişelerdeki ortalama üreme süresine göre daha kısa olduğu saptandı. Özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişe ortalama sinyal süresi olarak anaerobik şişe ile kıyaslanınca daha geç pozitiflik verdiği belirlendi.

Aerobik şişe, anaerobik şişe, özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe ve özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişede en kısa pozitiflik süreleri 11; 11; 10,5; 12 ve en uzun pozitiflik süreleri yaklaşık olarak sırasıyla 32; 28,5; 32; 30,5 saat olarak saptandı.

Tablo 3. Besiyerine göre şişelerin ortalama üreme süreleri (saat)

Besiyeri	Mean	N	Minimum	Maximum
Aerobik şişe	21,42	9	10,93	31,85
Anaerobik şişe	19,32	7	11,60	28,33
Özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe	20,64	9	10,37	31,85
Özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişe	20,86	8	11,45	30,57
Toplam	20,62	33	10,37	31,85

Tablo 4.2’de kökenlere göre ortalama üreme süreleri karşılaştırıldı. Buna göre *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* ortalama sinyal süreleri ortalama yaklaşık olarak 23; 13,5; 26 saat olarak saptandı. *C. glabrata* en kısa sürede sinyal veren köken olarak saptanırken *C. parapsilosis* en uzun sürede sinyal veren köken olarak bulundu. Tabloya göre *C. glabrata* tüm konsantrasyonlarda diğer kökenlere göre tüm şişelerde daha erken pozitiflik vermiştir.

Tablo 4. Türlerle göre ortalama üreme süreleri

Mikroorganizma	Mean	N	Minimum	Maximum
<i>C.albicans</i>	22,9018	11	17,04	30,57
<i>C.glabrata</i>	13,4508	12	10,37	16,35
<i>C.parapsilosis</i>	26,7400	10	22,17	31,85
Toplam	20,6282	33	10,37	31,85

Tablo 4.3.'te türlerin şişelere göre ortalama üreme süreleri birbirleri ile karşılaştırıldı. Bu tabloya göre *C.albicans* ortalama 21,5 saat ile anaerobik şişede en kısa sürede üredi. 23,9 saatte en uzun sürede aerobik şişede üredi. Ama anaerobik şişede 10 hücre/ml konsantrasyonda iki kere deneme yapılmasına rağmen üreme sağlanamadı. Tüm şişelerde ortalama 22,9 saatte pozitiflik verdiği gözlemlendi.

C. glabrata özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişede en kısa sürede (ortalama 12,95 saat) üreme gözlemlendi. En uzun sürede (13,81 saat) özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişede ürediği gözlemlendi.

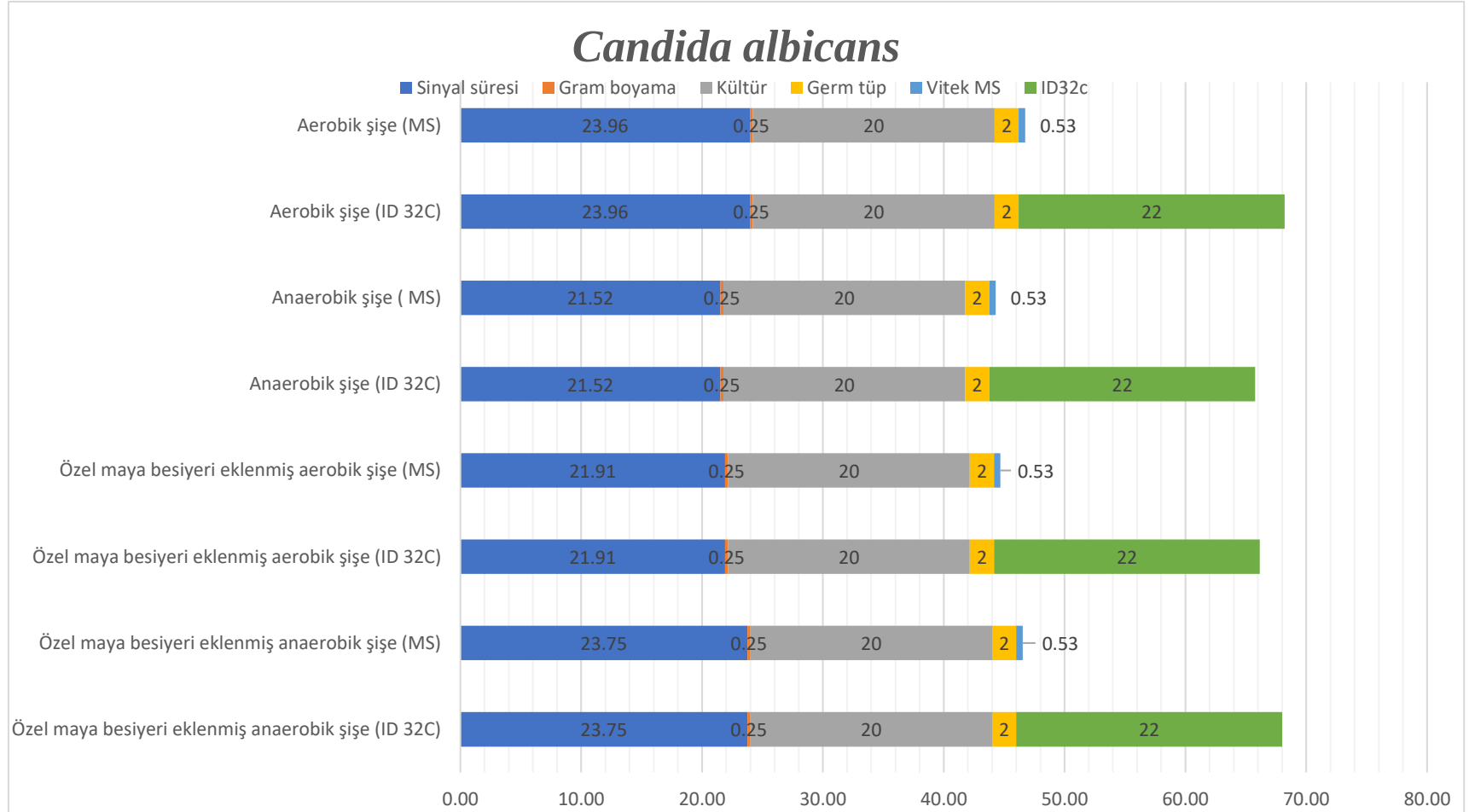
C. parapsilosis ' de en kısa sürede (25,52 saat) anaerobik şişede üreme saptandı. Fakat *C. parapsilosis*'in 10 hücre/şişe konsantrasyonda anaerobik ve özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişede üreme saptanmadı.

Anaerobik şişelere özel mantar besiyeri eklenmesi tüm kökenlerde üreme zamanını uzatmıştır. Aerobik şişelere özel mantar besiyeri eklenmesiyle ise *C. glabrata* ve *C. albicans*'ta üreme süresini kısalttığı gözlemlendi.

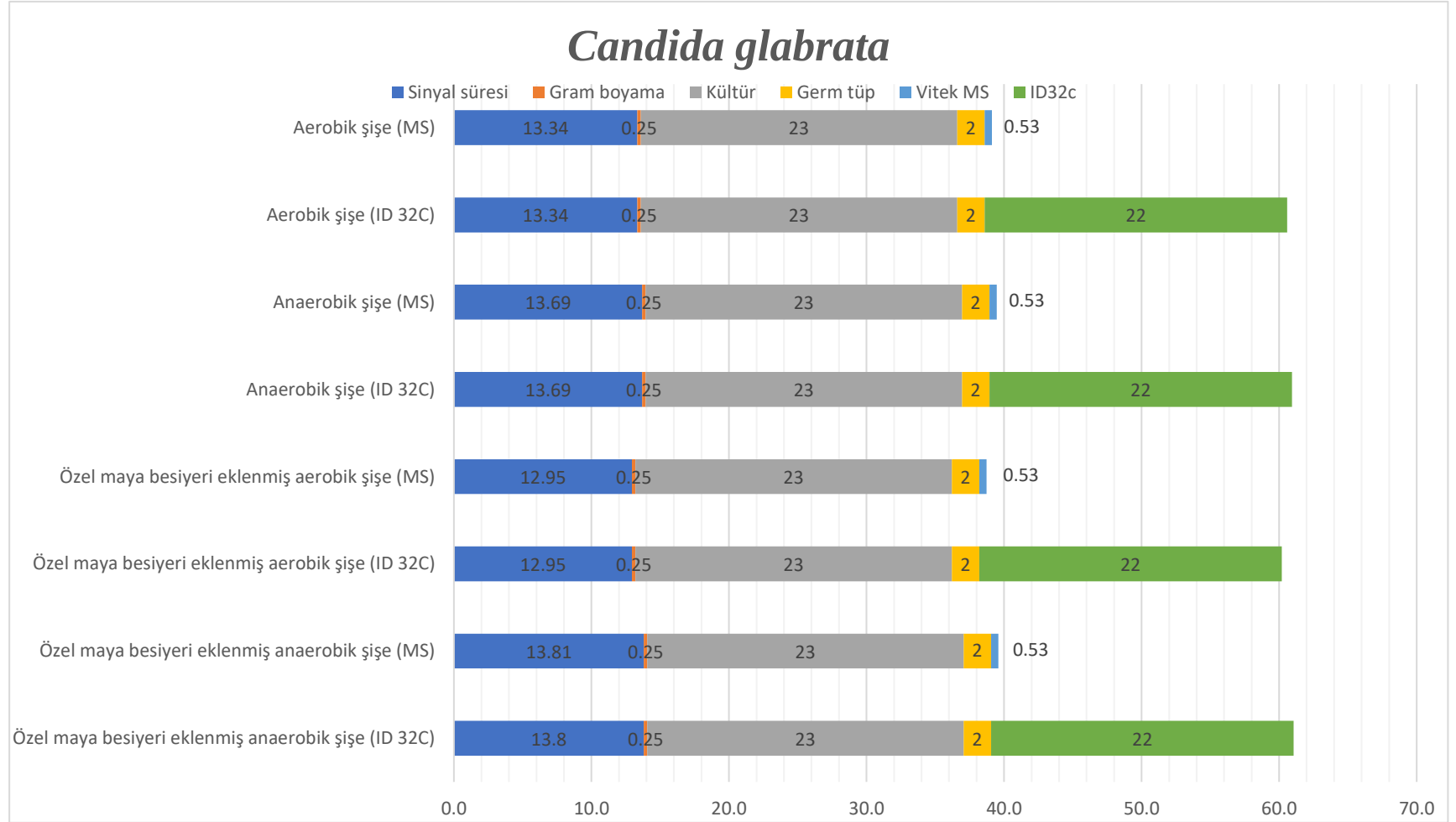
Tablo 5. Şişelerin türlere göre ortalama üreme sürelerinin karşılaştırılması (saat)

Mikroorganizma	Besiyeri	Mean	N	Minimum	Maximum
<i>C.albicans</i>	Aerobik şişe	23,96	3	19,31	29,02
	Anaerobik şişe	21,52	2	18,23	24,81
	Özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe	21,91	3	18,66	25,37
	Özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişe	23,75	3	17,04	30,57
	Toplam	22,90	11	17,04	30,57
<i>C.glabrata</i>	Aerobik şişe	13,34	3	10,93	15,82
	Anaerobik şişe	13,69	3	11,60	16,35
	Özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe	12,95	3	10,37	15,48
	Özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişe	13,81	3	11,45	16,02
	Toplam	13,45	12	10,37	16,35
<i>C.parapsilosis</i>	Aerobik şişe	26,96	3	22,33	31,85
	Anaerobik şişe	25,56	2	22,80	28,33
	Özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe	27,06	3	22,17	31,85
	Özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişe	27,10	2	25,87	28,33
	Toplam	26,74	10	22,17	31,85
Toplam	Aerobik şişe	21,42	9	10,93	31,85
	Anaerobik şişe	19,32	7	11,60	28,33
	Özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe	20,64	9	10,37	31,85
	Özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişe	20,86	8	11,45	30,57
	Toplam	20,62	33	10,37	31,85

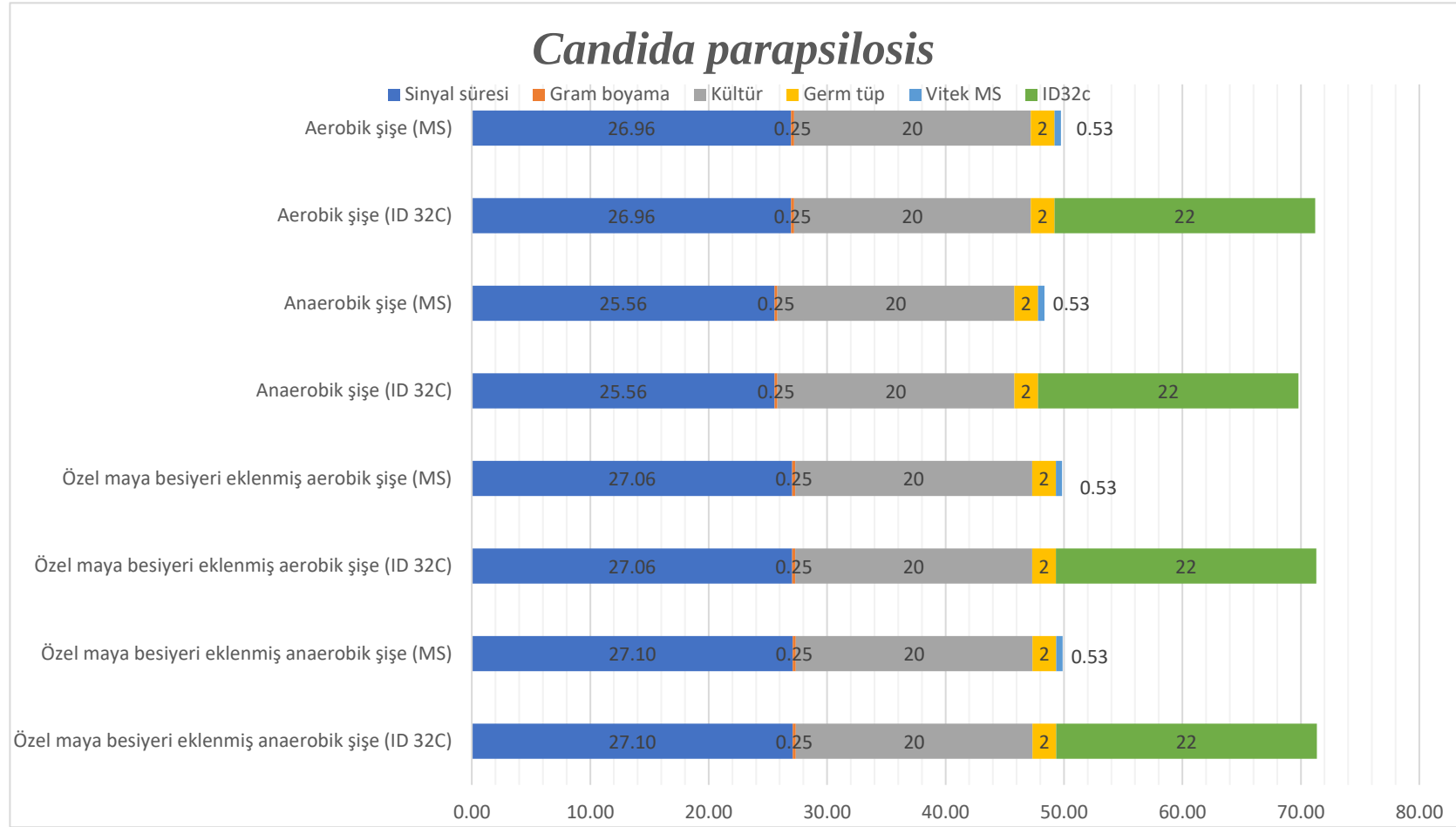
Ayrıca Şekil 4.1, 4.2, 4.3'te konsantrasyonlara göre üreme süreleri karşılaştırıldığında hücre sayısının fazla olmasının sinyal süresini kısalttığı saptandı.



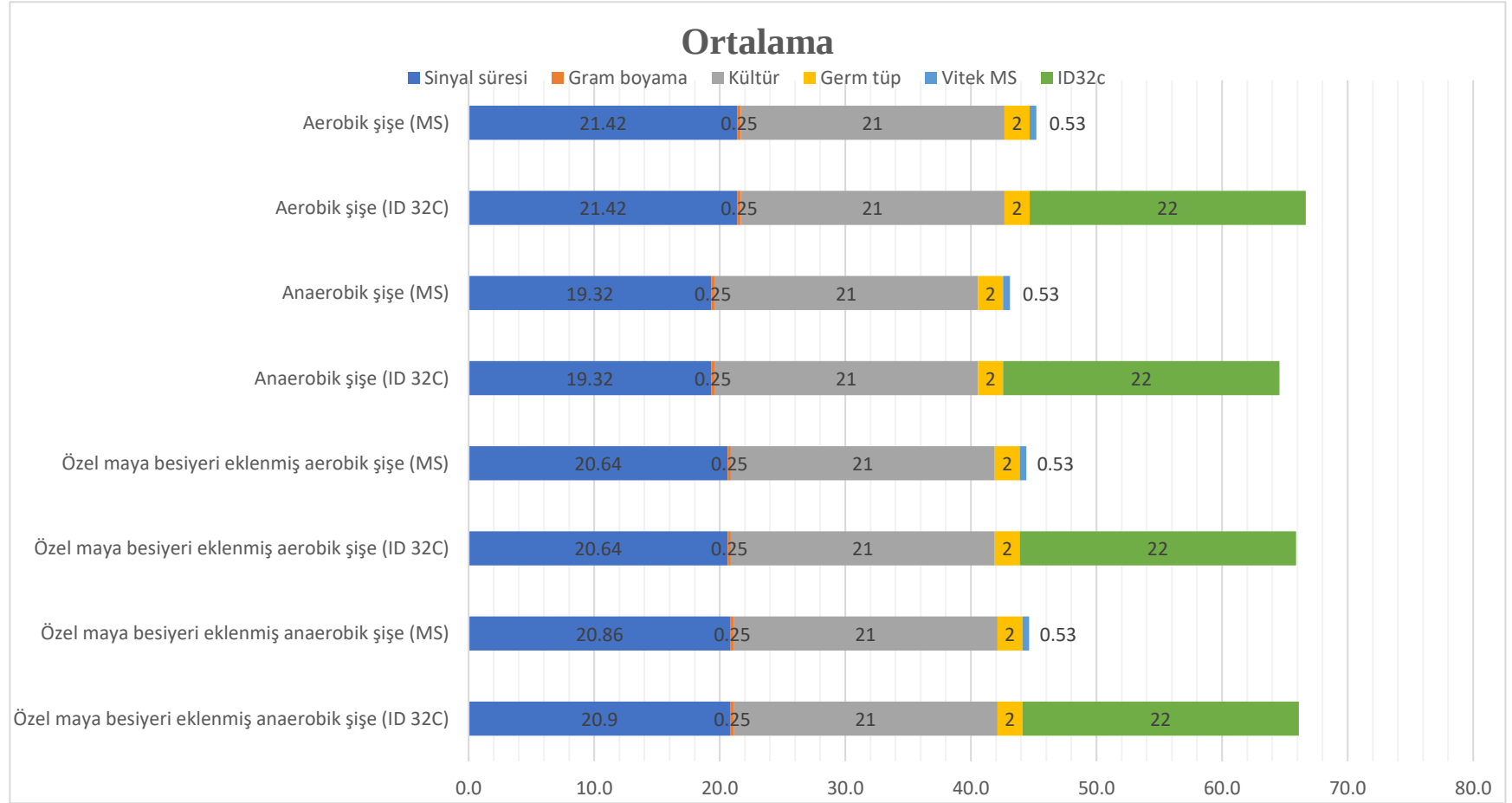
Şekil 12. *C. albicans*'ın tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması



Şekil 13. *C. glabrata*'nın tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması



Şekil 14. *C. parapsilosis*'in tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması



Şekil 15. Tüm kökenlerin tanımlanmasında ID 32C ve VITEK MS'in karşılaştırılması

Şekil 4.4, 4.5, 4.6' da pozitiflik veren kan kültür şişelerindeki maya etkenlerini laboratuvarımızda uyguladığımız rutin yöntemlerle tanımlamada geçen süre, VITEK MS tanımlamasında geçen süre ile karşılaştırıldı.

Tüm kökenler kan kültür cihazında sinyal verdikten sonra kanlı besiyerine ekim yapıldı. Mikrokoloniler oluşana kadar ekim yapılan plaklar takip edildi. Kolonilerin üreme süresi *C. parapsilosis* ve *C. albicans*'ta ortalama 20 saat, *C. glabrata*'da ortalama 23 saat olarak belirlendi. Koloniye gram boyama yapıldı ve germ tüp yöntemi uygulandı. Gram boyamanın yaklaşık 15 dakika, germ tüp için ise 2 saat beklendi. Daha sonra rutinde uyguladığımız ID 32C kiti ile tanımlama yapıldı. Ayrıca Vitek MS ile tanımlama yapıldı. ID 32C ile tanımlamada geçen süre tüm kökenlerde ortalama 22 saat olarak saptandı. Vitek MS ile tanımlamada geçen süre ise yaklaşık 32 dakika olarak belirlendi.

Bu işlemler sonucunda ortalama olarak ID 32C ve VITEK MS yöntemi ile tanımlama süresi *C. albicans* için aerobik şişe, anaerobik şişe, özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe ve özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişede sırasıyla 68,2; 65,8; 66,2 ve 68 saat olarak belirlendi. VITEK MS ile sırasıyla 46,7; 44,3; 44,7; 46,5 saat olarak bulundu. Yani özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe ile Vitek MS tanımlamada yaklaşık 21,5 saat daha kısa sürede *C. albicans* tanımlandı.

C. glabrata için aerobik şişe, anaerobik şişe, özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe ve özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişede sırasıyla 61, 61, 60, 61 saat olarak belirlendi. VITEK MS ile sırasıyla 39, 39, 39, 40 saat olarak bulundu. Özel mantar besiyerinin eklenmesinden bağımsız olarak tüm şişelerde VITEK MS ile tanımlama yaklaşık 21,5 saat daha erken sağlandı.

C. parapsilosis için aerobik şişe, anaerobik şişe, özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişe ve özel mantar besiyeri eklenmiş anaerobik şişede sırasıyla 71,2; 69,8; 71,3; 71,4 saat olarak belirlendi. VITEK MS ile sırasıyla 49,7; 48,3; 49,8; 49,9 saat olarak bulundu. Özel mantar besiyerinin eklenmesinden bağımsız olarak tüm şişelerde VITEK MS ile tanımlama yaklaşık 21,5 saat daha erken sağlandı.

Tüm kökenlerin İD32C ve VITEK MS ortalama tanımlanma süreleri Şekil 4.7’de karşılaştırıldı. Buna göre VITEK MS sistemi aerobik şişe, anaerobik şişe, özel besiyeri eklenmiş aerobik şişe ve özel besiyeri eklenmiş anaerobik şişede sırasıyla 45,2; 43,1; 44,4; 44,6 saatte maya kökenlerini tanımladı. ID 32C ise aynı şişelerde sırasıyla 66,6; 64,5; 65,8; 66,1 saatte maya kökenlerini tanımladı. Bu sonuçlara göre VITEK MS’in ID 32C’ye göre mayaları yaklaşık 21,5 saat daha erken tanımladığı görüldü.

Tablo 4.4’te 03/12/2016 tarihinden 17/04/2018 tarihine kadar laboratuvarımıza gelen kan kültürlerinde maya üremesi olanların türlere göre gün bazında üreme zamanları ve türlerin üreme oranları karşılaştırıldı. Tabloya göre *C. albicans* % 50.7 ile en çok üreyen tür olarak saptanırken ikinci sıklıkta *C. tropicalis* (% 13.4) ve *C. glabrata* (% 13.4) saptandı. *C. parapsilosis* (% 10.4), *C. kefyr* (% 6) *C. sake* (% 3), *C. guilliermondii* (% 1.5) ve *C. lusitaniae* (% 1.5) sırasıyla azalan sıklıklarda saptandı. Ortalama üreme zamanı karşılaştırıldığında en uzun sürede *C. glabrata*’nın ürediği en kısa sürede ise *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii*’nin ürediği saptanmıştır. Fakat bu iki mayanın az sayıda olması göz önünde bulundurulmalıdır.

Tablo 6. Türlere göre gün bazında ortalama üreme süreleri (saat) ve saptanma oranları(%)

Tür	Ortalama (gün)	Sayı	Minimum	Maximum	Sıklık(%)
<i>Candida albicans</i>	1,62	34	1	3	50,7
<i>Candida glabrata</i>	2,89	9	1	4	13,4
<i>Candida guilliermondii</i>	1,00	1	1	1	1,5
<i>Candida kefyr</i>	1,50	4	1	2	6,0
<i>Candida lusitanae</i>	1,00	1	1	1	1,5
<i>Candida parapsilosis</i>	2,00	7	2	2	10,4
<i>Candida sake</i>	1,50	2	1	2	3,0
<i>Candida tropicalis</i>	1,67	9	1	3	13,4
Toplam	1,81	67	1	4	100,0

Ortalama olarak baktığımızda *C. lusitanae* ve *C. guilliermondii*'nin üreme zamanları kısa olarak görünse de Tablo 4.5.'e baktığımızda diğer türlerin de birinci günde sinyal verebildikleri gözlenmiştir. Ayrıca kan kültüründeki fungal yük, hastanın tedavi alıp almadığı, şişeye konulan kan miktarı gibi etkenler sinyal zamanını etkilemektedir.

Tablo 7. Türlerin gün bazında üreme sayıları

	1	2	3	4	Toplam
<i>Candida albicans</i>	15	17	2	0	34
<i>Candida glabrata</i>	1	2	3	3	9
<i>Candida guilliermondi</i>	1	0	0	0	1
<i>Candida kefir</i>	2	2	0	0	4
<i>Candida lusitanae</i>	1	0	0	0	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0	7	0	0	7
<i>Candida sake</i>	1	1	0	0	2
<i>Candida tropicalis</i>	4	4	1	0	9
Toplam	25	33	6	3	67

Tablo 4.5.'e göre *C. glabrata* hariç tüm türlerin sinyal süreleri en geç 3.gün olarak saptandı. *C. albicans* daha çok 1 veya 2. günler sinyal verdiği *C. parapsilosis*'in ise sadece 2. gün sinyal verdiği saptandı

TARTIŞMA

Candida'ya bağlı hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları tüm dünyada git gide artmakta şu anda tüm kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan etkenler arasında dördüncü sırada bulunmaktadır (31, 88, 89).

Dünyanın pek çok bölgesinde *C.albicans* kan dolaşımı enfeksiyonlarında en sık izole edilen *Candida* türü olmuştur. Bununla birlikte *C. albicans* türleri dışında *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* gibi türler de sıklıkla izole edilmeye başlanmıştır.(90, 91) Pfaller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 2004-2008 tarihleri arasında 4067 kandidemi olgusunun % 42,1'i *C. albicans*, % 26,7'si *C. glabrata*, % 15,9'u *C. parapsilosis*, % 8,7'si *C. torpicalis* ve % 3,4'ü *C. krusei* olarak tanımlanmıştır.(92) Pfaller ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise Avrupa'da yirmi adet sağlık merkezinde 170 kandidemi vakası tespit edilmiş bu vakaların % 53'ü *C. albicans*, % 21'i *C. parapsilosis*, % 12'si *C. glabrata*, % 11'i *C. tropicalis*, % 2'si *C. famata*, % 1'i *C. krusei* ve % 1'i *C.inconspicua* olarak belirlenmiştir (93).

Amerika'da Hajjeh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada iki yıllık süreçte 1143 kandidemi vakası tespit edilmiş, %45'i *C.albicans*, %24'ü *C. glabrata* %13'ü *C. parapsilosis* %12'si *C. tropicalis* %2'si *C. krusei* %1'i *C. lusitaniae* olarak bulunmuştur.

Çalışmalara baktığımızda *C. albicans* genelde en sık etken olan köken olarak karşımıza çıkarken, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* ikinci sıklıkta görülen etken olarak değişim göstermektedir.

Bazı çalışmalarda albicans dışı kandidemilerin oranı *C. albicans* kandidemilerinin sıklık olarak önüne geçmiştir. Xess ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 7297 kandidemi olgusunun % 35,3'ü *C. tropicalis*, % 21,5 *C. albicans*, % 20 *C. parapsilosis*, % 17,5 *C. glabrata* % 3,3 *C. krusei* belirlenmiş (41). Bu değişimin flukonazol ve amfoterisin B nin yaygın kullanılması nedeniyle olduğu düşünülmüştür.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda da *C. albicans* en sık izole edilen tür olmuştur (94). Gültekin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi'nde yedi yıllık dönemdeki kan kültürleri incelenmiş olup izole edilen *Candida* türlerinden % 36'sı *C. albicans*, % 23'ü *C. parapsilosis*, % 14'ü *C. tropicalis*, %12'si *C. glabrata* olarak saptanmıştır (95).

Alışkan ve arkadaşlarının Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptığı bir çalışmada 163 kandidemi olgusunun %48,5' nda *Candida albicans*, %32,9'unda *C. parapsilosis*, %6,1'inde *C. tropicalis*, %6.1'inde *C. famata*, %3' ünde *C. glabrata* ürediği gösterilmiştir (96).

Atalay ve arkadaşlarının Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptığı bir çalışmada iki yıllık sürede laboratuvara gelen kan kültürleri takip edilmiş 97 kandidemi olgusu saptanmıştır. Bu olguların % 68' nde *Candida albicans*, % 14,5'unda *C. parapsilosis*, % 9,3' ünde *C. glabrata*, % 3,1'inde *C. tropicalis*, % 4.1' inde *C. krusei* ürediği gösterilmiştir (97).

Bizim laboratuvarımıza yaklaşık bir buçuk yıllık sürede gelen 13798 kan kültürünün % 17'sinde üreme saptanmıştır. Üreme olanların % 3,6'sı kandidemi olarak belirlenmiştir. Tez için çalışmaya dahil edilen 67 kandidemi vakasının %

50,7'si *C. albicans*, % 13,4'ü *C. glabrata*, % 10,4'ü *C. parapsilosis*. % 13,4'ü *C. tropicalis* % 6'sı *C. kefyr*, % 3'ü *C. sake*, % 1,5'u *C. guilliermondii* ve % 1,5'u *C. lusitaniae* olarak tanımlanmıştır. Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda genel olarak ikinci sıklıkta *C. parapsilosis* etken olarak görülürken, bizim hastanemizde ikinci sıklıkta *C. glabrata* etken olarak saptanmıştır.

Kan kültüründe üreyen etkenleri daha iyi tanımlayabilmek için geliştirilen kan kültür cihazları, yapılan çeşitli çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Bu amaçla Horvath ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Bact/Alert ve Bactec sistemleri karşılaştırılmıştır. Klinik olarak elde edilen beş *Candida* kökeni 10^3 konsantrasyonda her cihaz için üretilen aeobik, anaerobik ve mantar şişelerine ekilmiş, her cihaz için 150'şer kan kültür şişesinde üreme olup olmadığına bakılmıştır. Bact/Alert cihazında 150 kan kültür şişesinin % 90 ında (135) üreme saptanırken, Bactec cihazında 150 kan kültür şişesinin % 66'sında (100) üreme saptanmıştır. Toplamda 300 şişenin % 22' sinde (65) hiç üreme saptanamamış. Bu şişelerin 45 tanesi Bactec cihazına ait anaerobik şişeler olup, 5 tanesi yine aynı cihaza ait aerobik şişe olarak belirlenmiştir. 15 tane şişe ise Bact/Alert cihazına ait anaerobik şişe olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kan kültüründe etken saptamada Bact/Alert cihazı daha başarılı bulunmuştur (98).

Lyon ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada Isolator sistem ile Bact/Alert cihazının fungemiye saptama oranı ve pozitiflik süresi karşılaştırılmış, Isolator sistem 22 *Candida* kökeninin tamamını saptayabilirken, Bact/Alert sadece 15 tane *Candida* kökenini saptayabilmiştir. Mantarı saptama süresi olarak karşılaştırılınca, sırasıyla Isolator ve Bact/Alert sistemlerin süreleri 2,9 ve 2,1 gün

olarak bulunmuştur. Isolator sistem mantar saptamada daha etkin bulunurken tanımlama süresi karşılaştırıldığında Bact/Alert cihazının daha kısa sürede saptadığı belirlenmiştir (99).

Ayrıca bazı çalışmalarda fungemiye erken ve doğru saptayabilmek için aynı cihaza ait aerobik, anaerobik, pediatrik ve mantar şişeleri karşılaştırılmıştır. Fricker-Hidalgo ve arkadaşlarının bu amaçla yaptığı bir çalışmada simüle olarak 43 mantar türü Bactec otomatize sisteme ait olan Aerobic Plus/F ve Mycosis IC/F kan kültür şişelerine inoküle edilmiş ve sinyal verme zamanları karşılaştırılmıştır. Sadece *C. krusei* türünde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Diğer *Candida* ve mantar türlerinde Mycosis IC/F şişesinde üreme zamanının anlamlı şekilde kısaldığı saptanmıştır. Çalışma sonucuna göre maliyet sebebiyle sadece mantar enfeksiyonunun gelişebileceği hastaların örnekleri için Mycosis IC/F şişesi kullanılması önerilmiştir (100).

Nawrot ve arkadaşlarının yaptığı buna benzer bir çalışmada 60 mantar türü çalışmaya dahil edilmiş olup yine Bactec otomatize kan kültür sistemi kullanılmıştır. Mycosis IC/F ve Aerobic/F şişelerinde kıyaslanan saptanma sürelerinde *C. glabrata* ve *C. albicans* kökenlerinin Mycosis IC/F şişelerinde sinyal verme süresi daha kısa olduğu saptanmıştır. *Candida* türlerinde en çok *C. glabrata*'da saptanma süresi kısalmıştır. *C. parapsilosis* ve *C. krusei* kökenlerinde ise Aerobic/F şişesinde sinyal süresi daha kısa olarak saptanmıştır (61).

Datcu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 173 hastadan fungemi nedeniyle alınan kan kültürlerinde etkeni tanımlama oranını yükseltmek ve saptanma zamanını kısaltmak için Bactec aerobik ve anaerobik şişeleriyle birlikte

mantar şişeleri kullanılması sonuçları incelenmiştir. Anaerobik şişelerin etkeni tanımlama oranı diğ r şişelere göre daha düşük ve etkenin saptanma zamanı daha uzun bulunmuş. Etkeni tanımlama oranının ve etkenin saptanma zamanının üç şişenin birlikte kullanılmasıyla anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Özellikle *C. glabrata*’nın saptanma zamanının anlamlı şekilde kısaldığı belirlenmiştir (101).

Park ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada en çok görülen *Candida* türlerinin ATCC suşları kullanılmıştır. Simüle şekilde 10^3 , 10^2 , 10^1 hücre/ml konsantrasyonlarda maya ve 5 ml kan inoküle edilen şişeler iki farklı tam otomatize kan kültürü sisteminde (Bactec, BacTAlert) mayaların üremesiyle verdikleri sinyal süreleri kaydedilmiştir. Hem aerob hem anaerob şişelerdeki üreme zamanlarına bakıldığında, *C. glabrata* ve *C. krusei* haricinde diğ r mayaların aerobik şişelerde daha hızlı  rediğı tespit edilmiştir. Ancak *C. glabrata*’nın anaerobik şişelerde daha hızlı  rediğı tespit edilmiştir. Ayrıca tüm *C. albicans*  reyen şişelerden yapılan direk germ tüp testi pozitif sonuç vermiştir. Böylece *C. albicans* tanısının daha erken konulabileceğı belirlenmiştir (102).

Bizim alışmamızda, aerobik şişelerin hepsinde üreme saptanmıştır. Çalışmamızda *C. parapsilosis*’in 10^1 hücre/ml konsantrasyonda eklendiğı anaerobik ve özel mantar besiyeri bulunan anaerobik şişelerde  remediğı saptanmıştır. *C. albicans*’ın 10^1 konsantrasyonda eklendiğı anaerobik şişelerde üreme olmamıştır. Düşük konsantrasyonlarda maya bulunduğunda kan kültüründe saptanma olasılığının düştüğü gözlenmiştir. *C. glabrata*’nın tüm konsantrasyonlarda ve tüm şişelerde  rediğı gözlenmiştir. Diğ r alışmalarda *C.*

glabrata'nın anaerobik şişelerde daha erken ürediği belirlenirken, bizim çalışmamızda aerobik şişelerde daha hızlı ürediği saptanmıştır.

Ortalama üreme süresi olarak baktığımızda *C. glabrata* kökeninin en kısa sürede ürediği *C. parapsilosis* kökeninin ise en uzun sürede ürediği belirlenmiştir. Kökenlerin şişelere göre ortalama üreme hızlarına baktığımızda, *C. albicans* ve *C. glabrata* kökeninin anaerobik şişede daha hızlı ürediği saptanmıştır.

Şişelere göre ortalama üreme sürelerine baktığımızda, anaerobik şişenin en kısa sürede üreme sağladığı, ikinci olarak en hızlı üremeyi özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişenin sağladığı gözlenmiştir. Burada özellikle dikkat çekmek istediğimiz konu özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişede tüm kökenlerin tüm konsantrasyonlarında ürediği, iki kere deneme yapılmasına rağmen anaerobik şişede *C. albicans* ve *C. parapsilosis* türünde 10^1 hücre/ml konsantrasyonda üremediğidir.

Nylen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Candida* sp.'nin saptanma zamanını karşılaştırmak için Bactec Mycosis IC/F, Bactec Plus Aerobic/F, Bactec Peds Plus/F, BacT/Alert FA, BacT/Alert PF kullanılmış, ayrıca üremeyi hızlandırmak için at kanı, hemin isovitaleks albümin (HIA), nikotinamid adenin dinükleotidi ve brain heart infüzyon agar eklenen kan kültür şişelerinde saptanma zamanı gözlenmiştir. *Candida* türlerinde ekleme yapılan kan kültür şişeleri ile yapılmayanlar arasında saptanma oranı ve zamanında anlamlı bir fark görülmemiştir. *Candida* sp. saptanma zamanının Mycosis IC/F şişesinde anlamlı şekilde daha kısa olduğu gözlenmiştir (103).

Bizim çalışmamızda özel mantar besiyeri eklediğimiz şişeleri ile eklenmeyenler karşılaştırıldığında türe göre üreme süresinin etkilendiği gözlenmiştir. *C. albicans* ve *C. glabrata* kökenlerinde aerobik şişeye özel mantar besiyeri eklenmesi kökenlerin ortalama üreme süresini kısaltmış, ancak her iki kökende anaerobik şişeye özel mantar besiyeri eklenmesi ise kökenlerin üreme süresini uzatmıştır. *C. parapsilosis* kökeninde ise özel mantar besiyeri eklenmesi aerobik şişede ve anaerobik şişede üreme süresini uzatmıştır.

Candida'ya bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarını daha hızlı tanımlamak için PNA-FISH, MALDI-TOF MS gibi çeşitli yöntemler kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Harris ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Candida* türlerini PNA-FISH ile tanımlama doğruluğu ve zamanı araştırılmıştır. Konvansiyonel yöntemlerle *Candida* türleri 96 saatte tanımlanırken, PNA-FISH kullanıldığında tanımlama zamanı ortalama 13,2 saate düşmüştür. Tanımlama doğruluğu ise % 94,1 olarak saptanmıştır (85). PNA-FISH in bu tanımlama doğruluğunun yüksek oranları başka çalışmalarda da gösterilmiştir (84).

Idelevich ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 100, 10, 1 cfu/ml konsantrasyonlarda hazırlanan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C.krusei* ve *C. tropicalis* kökenlerini simüle şekilde sağlıklı hastadan alınan tam kan ile Bactec Mycosis-IC/F ve Bactec Plus Aerobic/F kan kültür şişelerine ekilmiştir. Aynı zamanda şişelere ekilmeden aynı konsantrasyonlarda hazırlanan mayalar tam kana eklenmiş, lizis santrifügasyon ile çikolatamsı agar ve SDA'ya ekilmiştir. Mikrokoloniler oluşana kadar takip edilmiş ve oluşan kolonilere direk MALDI-TOF MS uygulanmıştır. Kan kültür şişesinde pozitiflik verdiği süre ile lizis santrifügasyon kullanılarak

yapılan kültür tanımlama yöntemi karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre kan kültür şişelerinin pozitif sinyal verdiği süreye göre SDA'dan yapılan tanımlama ortalama 3,7 saat, çikolatamsı agardan yapılan tanımlama ortalama 7,4 saat daha erken olarak bulunmuştur (104).

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Yaman ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmaya göre 281 kan kültüründen izole edilen *Candida* kökenleri ve 3 farklı standart kökenin (*Candida lusitanae*, *Candida krusei* ve *Candida albicans*) VITEK 2 YST (bioMerieux, Fransa) cihazı ve MALDI-TOF MS (Bruker Autoflex) cihazında tanımlamaları yapılmıştır. 281 örnekten 264'ü ilk aynı tanımlanmıştır. Geriye kalan 17 izolatın 18S rRNA dizi analizi yöntemiyle tür tanımlaması yapılmıştır. Bu izolatlardan 16 izolat MALDI-TOF MS ile aynı tanımlanırken, bir örnek VITEK 2 YST ile aynı tanımlanmıştır. Sonuç olarak MALDI TOF-MS yönteminin *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılabilecek hızlı bir yöntem olduğu ortaya koyulmuştur (78).

Spanu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada belirli tarihler arasında laboratuvara gelen kandidemi olgularının kan kültürlerinde, öncelikle Bruker MALDI-TOF MS sistemi ile rutin tanımlama yapılmış, daha sonra pozitif kan kültür şişelerinden alınan sıvıya hazırlanan bir protokol uygulanarak direk MALDI-TOF MS tanımlama yapılmış ve karşılaştırılmıştır. 316 pozitif kan kültür şişesinin 280 tanesi (% 88,6) direk tanımlama ile doğru tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre kan kültür şişelerine direk MALDI-TOF MS uygulanmasının, *Candida* tanımlamada rutin yöntemlere göre 24 saatten fazla zaman kazandırdığı

kanıtlanmıştır. Tedaviye erken başlamanın çok önemli olduğu kandidemi olgularında bu yöntemin uygulanmasının önemi vurgulanmıştır (105).

Sadece *Candida* türünde değil *Candida* dışındaki fungemilerde kan kültür şişelerinde üreyen etkenleri tanımlamak için şişelere direk MALDI-TOF MS uygulanan çalışmalarda bulunmaktadır. Almeida ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yedi fungemi olgusundan alınan kan örneklerinin ekildiği kan kültür şişelerine direk MALDI-TOF MS tanımlaması yapılmıştır. Küf ve artrokonidyal mayaların ürettiği bu kültürlerin hepsi doğru tanımlanmıştır. Yöntem olarak ‘in-house’ protein ekstraksiyon protokolü uygulanmıştır (106).

Yapılan bir metanalizde, kan kültürünün dolaşım sistemi enfeksiyonları tanısında altın standart olmakla birlikte, duyarlılığının düşük olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden yeni geliştirilen tanı yöntemlerinin duyarlılığı, özgüllüğü, tanı koyma zamanı ve kısıtlılıkları karşılaştırılmıştır. MALDI-TOF MS’in yapılan çeşitli çalışmalarda *Candida* kökenlerini tanımlama duyarlılığı % 91,3-100 civarında, özgüllüğü ise % 100 olarak bulunmuştur. Kısıtlılıkları ise cihazın pahalı olması, polimikrobiyal enfeksiyonları tanımlayamaması, direk tam kana uygulanan testin *Candida* kökenlerini tanımlamada düşük duyarlılıkta olması gösterilmiştir (105, 107-109).

Bizim çalışmamızda MALDI-TOF MS laboratuvarımızda kullanılan konvansiyonel yöntemle karşılaştırıldığında, tüm kökenlerde tanımlama süresi ortalama 21 saat kısalmıştır. *C. albicans*’ın ve *C. parapsilosis*’in tüm şişe ve konsantrasyonlarının ortalamasına bakarak karşılaştırıldığında, mayayı MALDI-TOF MS’in konvansiyonel yöntemlere göre 20 saat daha erken tanımladığı

belirlenmiştir. *C. glabrata*'da ise MALDI-TOF MS'in mayayı konvansiyonel yöntemlere göre 23 saat daha erken tanımladığı saptanmıştır.

Antifungal tedavinin başlanma zamanı hastane kaynaklı *Candida* nedenli mortalitede büyük etkiye sahiptir. Çalışmalar göstermiştir ki antifungal tedaviye başlamada geciken her saat mortaliteyi artırmaktadır. En uygun antifungal tedaviye başlayabilmek için kuşkusuz ki, en erken ve en doğru tanı yönteminin kullanılması gerekmektedir (32).

Lin ve arkadaşlarının uygun antifungal başlama zamanının mortaliteyle ilişkisini araştırmak için yaptığı 166 olguluk çalışmada, uygun olmayan antifungal tedavi sonucu mortalite % 35, hiç antifungal tedavi almamışlarda benzer şekilde mortalite %32 bulunmuştur. Antifungal alanlarda mortalite (% 18) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak fark bulunmuştur. İlk 24 saat uygun antifungal tedavi başlanan hastalarda mortalite % 13,7; 24-48 saat arası başlanan hastalarda mortalite % 21,1; 48 saat sonra başlanan hastalarda ise % 23,1 bulunmuştur. Uygun antifungal tedavinin zamanında başlanmamasının mortaliteyi artırdığı gösterilmiştir (9).

Huang ve arkadaşlarının bakteriyemi ve kandidemi hastalarında mikroorganizmayı tanımlamak için MALDI-TOF MS ve konvansiyonel yöntemleri karşılaştırdığı çalışmada, hızlı tanının mortalite ve hastane yatış süresi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buna göre konvansiyonel yöntem ile tanımlanan hastalara göre MALDI-TOF MS tanımlaması yapılan hastaların kan kültüründe mikroorganizmanın ortalama 18 saat daha geç tanımlandığı saptanmıştır.

Antimikrobiyalin geç başlanması nedenli 30 günlük mortalitenin yaklaşık % 8 daha fazla olduğu belirtilmiştir (110).

Taur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kandidemili kanser hastalarında antifungal tedavinin zamanlamasının mortalite üzerine ilişkisi araştırılmıştır. Kan kültürünün alınmasından pozitiflik verdiği zamana kadar olan süre, uzman kişinin *Candida* tanısını koyup kliniğe bildirme süresi, kliniğin bu tanıyı öğrenip antifungal başladığı zamanı ve toplam süre hesaplanmıştır. Sonuç olarak inkübasyon süresinin uzunluğunun anlamlı şekilde mortaliteyi etkilediği ve bu süreyi kısaltacak moleküler yöntemler gibi tanı yöntemlerine yönelinmesi gerektiği bildirilmiştir (33).

Tasarlanan bu özel besiyeri sayesinde aerobik şişelerde özellikle *C. albicans* ve *C. glabrata*'da ortalama 1 saatlik erken üreme sağlanmıştır. Bizim çalışmamıza göre VITEK MS tanımlama yönteminin rutinde kullandığımız yöntemlere göre mayayı ortalama 21,5 saat erken tanımladığı belirlenmiştir. Sonucun kliniğe bildirilmesinin, antifungal başlanma zamanını kısaltacağı, hastanemizdeki kandidemi olgularında mortaliteyi düşüreceği dşlmştr.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ve diğer araştırma verilerine göre;

- Antifungal tedavinin geç başlanması kandidemi hastalarında mortaliteyi artırmaktadır. Uygun ve zamanında antifungal tedavinin başlayabilmesi için kandidemi tanısının hızlı ve doğru şekilde kliniğe bildirilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalardan ve bizim çalışmamızdan belirlediğimiz üzere koloniden karbonhidrat asimilasyonu yerine MALDI-TOF MS kullanılması tanı zamanını kısaltmaktadır.
- Mayalar için kan kültür cihazındaki inkübasyon süresinin uzun olması tanı süresini uzatmaktadır. Bu nedenle kan kültür şişelerinin mayayı daha hızlı üretebilmesini sağlayacak düzenlemeler yapılabilir.
- Kan kültür şişesindeki örneğe ya da hastadan alınan kana direk MALDI-TOF MS uygulanan çalışmalar erken tanıda umut vermektedir. Ancak, duyarlılık ve özgüllük istenen seviyede değildir. Bu yönde araştırmalar artarsa, katı besiyerinde koloni üremesi beklenmeden, tanı konulabilecek ve kliniğe erken bilgi verilebilecektir.
- Laboratuvarımızda ve ülkemizde başka laboratuvarlarda yapılan çalışmalarda kandidemde *C. albicans* en sık etken olarak karşımıza çıkmakta, ikinci sırada genelde *C. parapsilosis* ya da *C. glabrata* görülmektedir. Ampirik antifungal tedaviye başlarken mutlaka bu etkenler göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis.* 1983; 5(1): 54-70.
2. Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Johnson EM, et al. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *Journal of Hospital Infection.* 2003; 54(1): 18-24.
3. Tukenmez Tigen E, Bilgin H, Perk Gurun H, Dogru A, Ozben B, Cerikcioglu N, et al. Risk factors, characteristics, and outcomes of candidemia in an adult intensive care unit in Turkey. *Am J Infect Control.* 2017; 45(6): e61-e3.
4. Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2003; 36(11): 1418-23.
5. Nucci M, Colombo AL, Silveira F, Richtmann R, Salomao R, Branchini ML, et al. Risk factors for death in patients with candidemia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19(11): 846-50.
6. Wang H, Liu N, Yin M, Han H, Yue J, Zhang F, et al. The epidemiology, antifungal use and risk factors of death in elderly patients with candidemia: a multicentre retrospective study. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 609.

7. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *Am J Med.* 2002; 113(6): 480-5.
8. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(9): 3640-5.
9. Lin S, Chen R, Zhu S, Wang H, Wang L, Zou J, et al. Candidemia in adults at a tertiary hospital in China: clinical characteristics, species distribution, resistance, and outcomes. *Mycopathologia.* 2018.
10. Bakir M, Cerikcioglu N, Barton R, Yagci A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. *APMIS.* 2006; 114(9): 601-10.
11. Ishikane M, Hayakawa K, Kutsuna S, Takeshita N, Ohmagari N. Epidemiology of blood stream infection due to *Candida* species in a tertiary care hospital in Japan over 12 years: importance of peripheral line-associated candidemia. *PLoS One.* 2016; 11(10): e0165346.
12. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial Candidiasis: Antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. *Med Mycol.* 2016; 54(1): 1-22.
13. Banerjee B, R MS, Baliga S. Clinico-microbiological study of candidemia in a tertiary care hospital of southern part of India. *Iran J Microbiol.* 2015; 7(1): 55-61.
14. Spiers R, Smyth B, Lamagni T, Rooney P, Dorgan E, Wyatt T, et al. The epidemiology and management of candidemia in Northern Ireland during

- 2002-2011, including a 12-month enhanced case review. *Med Mycol.* 2018.
15. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(1): 25-31.
 16. Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(12): 1739-46.
 17. Murri R, Giovannenze F, Camici M, Torelli R, Ventura G, Scoppettuolo G, et al. Systematic clinical management of patients with candidemia improves survival. *J Infect.* 2018.
 18. Gülderen E, Akıncı E, Öngürü P, Bodur H. Risk factors for mortality in patients with candidemia: A prospective case-control study. *Flora infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji.* 2010.
 19. Mencarini J, Mantengoli E, Tofani L, Riccobono E, Fornaini R, Bartalesi F, et al. Evaluation of candidemia and antifungal consumption in a large tertiary care Italian hospital over a 12-year period. *Infection.* 2018.
 20. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(4): O245-54.
 21. Procop GW. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Seventh edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. 1 volume
 22. Jeljaszewicz J. The epidemiology of the systemic inflammatory response

- syndrome. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 1996; 9(4): 261-4.
23. Nystrom PO. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 41 Suppl A: 1-7.
 24. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013; 8(3): e59373.
 25. Barchiesi F, Orsetti E, Mazzanti S, Trave F, Salvi A, Nitti C, et al. Candidemia in the elderly: what does it change? *PLoS One*. 2017; 12(5): e0176576.
 26. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(9): 3300-8.
 27. Baldesi O, Bailly S, Ruckly S, Lepape A, L'Heriteau F, Aupee M, et al. ICU-acquired candidaemia in France: epidemiology and temporal trends, 2004-2013 - A study from the REA-RAISIN network. *J Infect*. 2017; 75(1): 59-67.
 28. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(4): 788-802.
 29. Epelbaum O, Chasan R. Candidemia in the Intensive Care Unit. *Clin Chest Med*. 2017; 38(3): 493-509.
 30. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(3): 309-17.
 31. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP.

Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis. 1999; 29(2): 239-44.

32. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdogli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect. 2012; 18 Suppl 7: 9-18.
33. Taur Y, Cohen N, Dubnow S, Paskovaty A, Seo SK. Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(1): 184-90.
34. Cohen Y, Karoubi P, Adrie C, Gauzit R, Marsepoil T, Zarka D, et al. Early prediction of *Candida glabrata* fungemia in nonneutropenic critically ill patients. Crit Care Med. 2010; 38(3): 826-30.
35. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1): 133-63.
36. Rees JR, Pinner RW, Hajjeh RA, Brandt ME, Reingold AL. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay area, 1992-1993: results of population-based laboratory active surveillance. Clin Infect Dis. 1998; 27(5): 1138-47.
37. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. PLoS Pathog. 2013; 9(9): e1003550.
38. Hoarau G, Picot S, Lemant J, Peytral J, Poubeau P, Zunic P, et al. Candidemia in the intensive care unit: A 12-year retrospective cohort study in Reunion

Island. Med Mal Infect. 2018.

39. Mantadakis E, Pana ZD, Zaoutis T. Candidemia in children: Epidemiology, prevention, and management. Mycoses. 2018.
40. Pfaller MA, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clinical Microbiology and Infection. 2004; 10: 11-23.
41. Xess I, Jain N, Hasan F, Mandal P, Banerjee U. Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. Infection. 2007; 35(4): 256-9.
42. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. Int J Antimicrob Agents. 2014; 43(1): 78-81.
43. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. Clin Infect Dis. 2005; 41(10): 1455-60.
44. Caggiano G, Coretti C, Bartolomeo N, Lovero G, De Giglio O, Montagna MT. Candida bloodstream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. Biomed Res Int. 2015; 2015: 256580.
45. Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Barbuti G, Montagna O, Laforgia N, et al. Candidemia in the neonatal intensive care unit: A retrospective, observational survey and analysis of literature data. Biomed Res Int. 2017; 2017: 7901763.

46. Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, d'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004; 46(5): 239-41.
47. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 73(1): 45-8.
48. Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005; 26(6): 540-7.
49. Forrest GN, Mankes K, Jabra-Rizk MA, Weekes E, Johnson JK, Lincalis DP, et al. Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization-based identification of *Candida albicans* and its impact on mortality and antifungal therapy costs. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9): 3381-3.
50. Farmakiotis D, Kyvernitakis A, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Early initiation of appropriate treatment is associated with increased survival in cancer patients with *Candida glabrata* fungaemia: a potential benefit from infectious disease consultation. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(1): 79-86.
51. Wang E, Farmakiotis D, Yang D, McCue DA, Kantarjian HM, Kontoyiannis DP, et al. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(8):

2362-8.

52. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(1): 235-51.
53. Bille J, Stockman L, Roberts GD, Horstmeier CD, Ilstrup DM. Evaluation of a lysis-centrifugation system for recovery of yeasts and filamentous fungi from blood. *J Clin Microbiol.* 1983; 18(3): 469-71.
54. Cockerill FR, Torgerson CA, Reed GS, Vetter EA, Weaver AL, Dale JC, et al. Clinical comparison of difco ESP, Wampole isolator, and Becton Dickinson Septi-Chek aerobic blood culturing systems. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(1): 20-4.
55. Parikh HR, De AS, Baveja SM. Comparison of the lysis centrifugation method with the conventional blood culture method in cases of sepsis in a tertiary care hospital. *J Lab Physicians.* 2012; 4(2): 89-93.
56. Henry NK, McLimans CA, Wright AJ, Thompson RL, Wilson WR, Washington JA. Microbiological and clinical evaluation of the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. *J Clin Microbiol.* 1983;17(5):864-9.
57. Kiehn TE, Wong B, Edwards FF, Armstrong D. Comparative recovery of bacteria and yeasts from lysis-centrifugation and a conventional blood culture system. *J Clin Microbiol.* 1983; 18(2): 300-4.
58. Murray PR, Spizzo AW, Niles AC. Clinical comparison of the recoveries of bloodstream pathogens in Septi-Check brain heart infusion broth with saponin, Septi-Chek tryptic soy broth, and the isolator lysis-centrifugation system. *J*

Clin Microbiol. 1991; 29(5): 901-5.

59. Banerjee R, Ozenci V, Patel R. Individualized approaches are needed for optimized blood cultures. Clin Infect Dis. 2016; 63(10): 1332-9.
60. Klingspor L, Muhammed SA, Ozenci V. Comparison of the two blood culture systems, Bactec 9240 and BacT/Alert 3D, in the detection of *Candida* spp. and bacteria with polymicrobial sepsis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(11): 2983-7.
61. Nawrot U, Kowalska-Krochmal B, Sulik-Tyszka B, Kozak M, Swietek K, Pajaczkowska M, et al. Evaluation of blood culture media for the detection of fungi. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(1): 161-7.
62. Alam MZ, Alam Q, Jiman-Fatani A, Kamal MA, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, et al. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30(5): 1437-51.
63. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998; 36(2): 329-34.
64. Neppelenbroek KH, Seo RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. Oral Dis. 2014;20(4):329-44.
65. Ramani R, Gromadzki S, Pincus DH, Salkin IF, Chaturvedi V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. J Clin Microbiol. 1998;36(11):3396-8.

66. Kaçmaz B, Sipahi AB, Aksoy A. *Candida* türlerinin tanımlanmasında Api ID32C ve Rapid Yeast Plus sistemlerinin karşılaştırılması. ANKEM. 2006.
67. Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. J Clin Microbiol. 1979; 10(3): 357-64.
68. Graf B, Adam T, Zill E, Gobel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. J Clin Microbiol. 2000; 38(5): 1782-5.
69. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41(6): 2629-32.
70. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 8th edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016.
71. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. Crit Care. 2010; 14(6): R222.
72. Ecker DJ, Sampath R, Li H, Massire C, Matthews HE, Toleno D, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. Expert Rev Mol Diagn. 2010; 10(4): 399-415.
73. Xu J, Millar BC, Moore JE, McClurg R, Walker MJ, Evans J, et al. Comparison of API20C with molecular identification of *Candida* spp isolated from bloodstream infections. J Clin Pathol. 2002; 55(10): 774-7.

74. Xafranski H, Melo AS, Machado AM, Briones MR, Colombo AL. A quick and low-cost PCR-based assay for *Candida* spp. identification in positive blood culture bottles. BMC Infect Dis. 2013; 13: 467.
75. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(3): 465-84.
76. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40(7): 2483-9.
77. Taira CL, Okay TS, Delgado AF, Ceccon ME, de Almeida MT, Del Negro GM. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. BMC Infect Dis. 2014; 14: 406.
78. Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 73(1): 65-7.
79. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013; 26(3): 547-603.
80. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-

- flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(9): 2269-81.
81. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(4): 1481-3.
 82. Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT(bioMerieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010.
 83. Radic M, Goic-Barisic I, Novak A, Rubic Z, Tonkic M. Evaluation of PNA FISH(R) Yeast Traffic Light in identification of *Candida* species from blood and non-blood culture specimens. *Med Mycol*. 2016; 54(6): 654-8.
 84. Reller ME, Mallonee AB, Kwiatkowski NP, Merz WG. Use of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for definitive, rapid identification of five common *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(11): 3802-3.
 85. Harris DM, Hata DJ. Rapid identification of bacteria and *Candida* using PNA-FISH from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013; 12: 2.
 86. Calderaro A, Martinelli M, Motta F, Larini S, Arcangeletti MC, Medici MC, et al. Comparison of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assays with culture-based matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight

mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts from blood cultures and cerebrospinal fluid cultures. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(8): O468-75.

87. Hall L, Le Febre KM, Deml SM, Wohlfel SL, Wengenack NL. Evaluation of the Yeast Traffic Light PNA FISH probes for identification of *Candida* species from positive blood cultures. J Clin Microbiol. 2012; 50(4): 1446-8.
88. Terlecka JA, du Cros PA, Orla Morrissey C, Spelman D. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-albicans species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles. Mycoses. 2007; 50(1): 48-51.
89. Chen YC, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC. Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(1): 71-7.
90. Hesstvedt L, Gaustad P, Andersen CT, Haarr E, Hannula R, Haukland HH, et al. Twenty-two years of candidaemia surveillance: results from a Norwegian national study. Clin Microbiol Infect. 2015; 21(10): 938-45.
91. Morii D, Seki M, Binongo JN, Ban R, Kobayashi A, Sata M, et al. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in hospitals in Osaka, Japan. J Infect Chemother. 2014; 20(9): 558-62.
92. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74(4): 323-31.
93. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS, et al.

International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 35(1): 19-25.

94. Kuzucu Ç, Yetkin G. Bir yıl içerisinde kan kültürlerinden izole edilen *candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. Erciyes Tıp. 2006.
95. Gültekin B, Eyigör M, Telli M, Aksoy m, Aydın N. Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. ANKEM. 2010.
96. Alışkan HE, Bozkırlı ED, Çolakoğlu Ş, Demirbilek M. Hastanemizde üç yıllık süreçte kan kültürlerinden izole edilen *Candida albicans* ve non-albicans *Candida* türlerinin etken olduğu kandidemilerdeki risk faktörlerinin irdelenmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2016.
97. Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç N. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve Amfoterisin B ve Flukonazole in vitro duyarlılıkları. Selçuk Tıp. 2012.
98. Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct Comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. Journal of Clinical Microbiology. 2004; 42(1): 115-8.
99. Lyon R, Woods G. Comparison of the BacT/Alert and Isolator blood culture systems for recovery of fungi. Am J Clin Pathol. 1995; 103(5): 660-2.

100. Fricker-Hidalgo H, Chazot F, Lebeau B, Pelloux H, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Use of simulated blood cultures to compare a specific fungal medium with a standard microorganism medium for yeast detection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998; 17(2): 113-6.
101. Datcu R, Boel J, Jensen IM, Arpi M. Comparison of BACTEC blood culture media for the detection of fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36(1): 131-7.
102. Park BR, Kim TH, Kim HR, Lee MK. Comparative analysis of simulated candidemia using two different blood culture systems and the rapid identification of *Candida albicans*. *Ann Clin Lab Sci*. 2011; 41(3): 251-6.
103. Nylen T, Saeedi B, Borg C, Ullberg M, Ozenci V. The performance of 4 different supplements and 5 blood culture bottles types in detection of bacteria and *Candida* spp. in simulated sterile body fluid cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 77(1): 1-4.
104. Idelevich EA, Grunastel B, Becker K. Rapid detection and identification of candidemia by direct blood culturing on solid medium by use of lysis-centrifugation method combined with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Clin Microbiol*. 2017; 55(1): 97-100.
105. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*.

2012; 50(1): 176-9.

- 106.de Almeida JNJ, Sztajn bok J, da Silva ARJ, Vieira VA, Galastri AL, Bissoli L, et al. Rapid identification of moulds and arthroconidial yeasts from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol*. 2016; 54(8): 885-9.
- 107.Phoompoung P, Chayakulkeeree M. Recent Progress in the diagnosis of pathogenic *Candida* species in blood culture. *Mycopathologia*. 2016; 181(5-6): 363-9.
- 108.Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(5): 1542-8.
- 109.Panda A, Ghosh AK, Mirdha BR, Xess I, Paul S, Samantaray JC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *J Microbiol Methods*. 2015; 109: 93-105.
- 110.Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(9): 1237-45.

ÖZET

Candida enfeksiyonları hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda tanısı ve tedavisi zor, yüksek maliyetli bir enfeksiyon hastalığıdır. Diğer enfeksiyon etkenlerine göre mortalitesi de çok yüksek olduğundan uygun antifungal tedavinin zamanında başlanması gerekir. Bu nedenle tanı amaçlı kullandığımız kan kültürlerinde *Candida* cinsi maya mantarlarının üreme sürelerini hızlandırabilecek ya da daha hızlı tanımlanmasını sağlayabilecek bir yaklaşım geliştirilmesi önemlidir.

03/12/2016 tarihinden 17/04/2018 tarihine kadar laboratuvarımıza çeşitli kliniklerden gelen kan kültürlerinde *C. albicans* % 50.7 ile en çok üreyen tür olarak saptanırken ikinci sıklıkta *C. tropicalis* (% 13.4) ve *C. glabrata* (% 13.4) saptanmıştır. Laboratuvarımıza gelen bu etkenlerin ortalama üreme zamanı karşılaştırıldığında en uzun sürede *C. glabrata*'nın ürediği, en kısa sürede ise *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii*'nin ürediği saptanmıştır.

Çalışmada *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030 kökenleri kullanılmıştır. Mayaların üremesini hızlandıracağını düşündüğümüz özel mantar besiyeri hazırlanmıştır. Bu kökenlerin seri dilüsyonları özel mantar besiyeri eklenmiş ve eklenmemiş kan kültür şişelerine ekilerek kan kültürü simülasyonu yapılmıştır. Özel mantar besiyeri eklenmiş aerobik şişelerde ortalama üreme süresi eklenmemiş aerobik şişelerdeki ortalama üreme süresine göre daha kısa olduğu saptanmıştır. Aerobik şişelere özel mantar besiyeri eklenmesinin özellikle *C. glabrata* ve *C. albicans*'ta üreme süresini kısalttığı gözlenmiştir. Bu kan kültür şişelerinden MALDI-TOF MS ve API ID 32C

kullanılarak maya tanımlaması yapılmıştır. MALDI-TOF MS yönteminin ID 32C'ye göre ortalama 21,5 saat mayayı daha erken tanımladığı saptanmıştır. Sonuç olarak MALDI-TOF MS maya tanımlamasında hızlı ve kolay bir yöntem olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: *Candida*, kan kültürü, MALDI-TOF MS, API ID 32C

ABSTRACT

Hospital acquired *Candida* infections are difficult to diagnose and treat. Medical costs are therefore much higher particularly in immunocompromised patients. Mortality rates are very high when compared to those of other infectious diseases. Antifungal therapy should be initiated without delay. Therefore, it is important to develop an approach that accelerates the fungal growth rate and help faster identification in patients with positive blood cultures with *Candida* species.

C. albicans was the most prevalent species in blood cultures (50.7%) followed by *C. tropicalis* (13.4%) and *C. glabrata* (13.4%) in our microbiology laboratory from 03/12/2016 to 17/04/2018. When compared the detection rates among *Candida* species, we found that the longest detection time was seen in *C. glabrata*, while those for *C. lusitaniae* and *C. guilliermondii* were the shortest.

In our study, *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030 reference strains were used. We prepared a special fungal broth mix that was thought to accelerate the positivity of the *Candida* growth in blood culture bottles. *Candida* cell suspensions were prepared and added into blood culture bottles. The mean time to positivity in aerobic blood culture bottles supplemented with special fungal broth mix was found to be shorter than that was in aerobic blood culture bottles without supplementation. Addition of special fungal broth mix to aerobic blood culture bottles was found to shorten the growth time especially in *C. glabrata* and *C. albicans*. MALDI-TOF MS and API ID 32C identification systems were used for identification of yeasts. *Candida* strains were identified 21,5 hours earlier by MALDI-TOF MS than that was in ID 32C system.

As a conclusion, we think that MALDI-TOF MS identification system is a quick and easy method for yeast identification in blood cultures.

Keywords: *Candida*, blood culture, MALDI-TOF MS, ID 32C

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Elif Ayça

Soyadı: Ünal

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara-28/03/1989

Eğitimi: 1-Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

2-Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

3-Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi

4-Namık Kemal İlköğretim Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

Çalışmalar:

- Impact of Iontophoresis and PACK-CXL Corneal Concentrations of Antifungals in an In Vivo Model. Kalkancı A, Yesilırmak N, Özdemir HB, Ünal EA, Erdoğan M, Şeker T, Tım AE, Karakuş AK, Hızıl K, Bilgihan K.
- The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on Candida and Staphylococcus biofilms. Güzel Tunçcan Ö, Kalkancı A, Ünal EA, Abdulmajed O, Erdoğan M, Dizbay M, Çağlar K.