

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KANDİDEMİLERİN HIZLI TANISINDA POZİTİF KAN
KÜLTÜR ŞİŞELERİNDEN DİREKT İDENTİFİKASYON
VE DUYARLILIK TESTLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Egemen GÖKBOLAT

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2015**

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KANDİDEMİLERİN HIZLI TANISINDA POZİTİF KAN
KÜLTÜR ŞİŞELERİNDEN DİREKT İDENTİFİKASYON
VE DUYARLILIK TESTLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Egemen GÖKBOLAT

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Doç. Dr. Yasemin ÖZ

ESKİŞEHİR
2015

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Egemen GÖKBOLAT'a ait "Kandidemilerin hızlı tanısında pozitif kan kültür şişelerinden direkt identifikasyon ve duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında tıpta uzmanlık tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 15.12.2015

Jüri Başkanı Prof. Dr. Gül DURMAZ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Yasemin ÖZ
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Aynur GÜLCAN
Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte KurulununTarih veSayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Enver İHTİYAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı hazırlarken bana her zaman destek olan, en zor zamanlarda bir an bile yalnız bırakmayan kıymetli eşim Merve GÖKBOLAT'a; tezimin konusunun belirlenmesi, araştırma aşaması, yön tayini ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Yasemin ÖZ'e; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilgileriyle beni aydınlatan değerli hocalarım Prof. Dr. Gül DURMAZ'a, Prof. Dr. Filiz AKŞİT'e, Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN'e, Prof. Dr. Tercan US'a, Prof. Dr. Nihal DOĞAN'a, Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ'ye, Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU'na, çalışma bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Selma METİNTAŞ'a; bölümümüzde birlikte çalıştığım arkadaşlarım Uzm. Dr. Emrah AYDIN'a, Uzm. Dr. Müge ASLAN'a, Dr. Suat YILDIZ'a, Dr. Ali DURMAZ'a, Dok. Öğr. İman AFANEH'e ve tüm laboratuvar çalışanlarına yardım ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Gökbolat, E. Kandidemilerin hızlı tanısı amacıyla pozitif kan kültür şişelerinden identifikasyon ve antifungal duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2015. Kandidemiler günümüzde mortalitesi en yüksek nozokomiyal enfeksiyonlardan birisi olmuştur. Tanı ve tedavideki gecikmeler mortaliteyi anlamlı oranda arttırmaktadır. Bu çalışmada, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında klinik kan kültür örneklerinden izole edilen ve *Candida* enfeksiyonlarından başlıca sorumlu olan beş farklı *Candida* türü (n=60) ile iki kalite kontrol izolatu (*C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019) kullanılarak kan kültürü simülasyonları yapılmıştır. Plus Aerobic/F, Peds Plus/F ve Mycosis IC/F şişeleri sinyal süresi açısından karşılaştırılmıştır. Mycosis IC/F şişesi en hızlı sinyal veren şişe olarak bulunurken, en yavaş sinyali Peds Plus/F şişesi vermiş ve aradaki süre farkı anlamlı bulunmuştur (p<0.001). *C. tropicalis* en hızlı, *C. glabrata* ise en yavaş sinyal veren izolat olmuş ve süre farkları anlamlı bulunmuştur (p<0.001). Pozitif sinyal veren şişelerden direkt ve klasik yöntemlerle tanımlama ve antifungal duyarlılık testleri uygulanmıştır. Yapılan tanımlama testlerinden CHROMagar *Candida*, klasik API 20C AUX testi ve peptid nükleik asit *in situ* hibridizasyon (PNA-FISH) testlerinin her birinin doğruluk oranı %100 olarak bulunmuştur. Direkt API testinin doğruluğu ise %98.4 bulunmuştur. Germ tüp testi direkt yapıldığında %85.5 doğruluk, indirekt yapıldığında ise %95.2 doğrulukla sonuç vermiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Duyarlılık testleri broth mikrodilüsyon, Etest ve disk difüzyon testleri olmak üzere üç farklı yöntemle, hem direkt kan kültür şişesinden hem de klasik olarak katı besiyeri pasajından uygulanmıştır. Buna göre testlerin direkt ve klasik yoldan uygulanmaları arasındaki esansiyel ve kategorik uyum oranları hesaplanmıştır. Mikrodilüsyon yönteminin hem esansiyel hem de kategorik uyumları diğer iki teste göre daha yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kandidemi, direkt identifikasyon, direkt antifungal duyarlılık,

PNA-FISH

ABSTRACT

Gökbolat, E. Evaluation of rapid identification and antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. Eskisehir Osmangazi University School of Medicine, Department of Clinical Microbiology, Eskisehir, 2015.

Candidemia is a nosocomial infection that has become one of the highest mortality ratings recently. Delays of diagnosis and treatment increase mortality rates significantly. In this study, 60 strains of *Candida* spp (five common strains of mainly responsible for *Candida* infections) selected which were isolated from clinical blood cultures at Eskisehir Osmangazi University School of Medicine, Department of Clinical Microbiology and simulated a blood culture model. Quality control was ensured by testing *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 isolates.

Mycosis IC/F had significantly shorter time to detection compared to Peds Plus/F ($p < 0.001$). Mean time to positive yeast detection for *C. tropicalis* was the fastest, whereas *C. glabrata* was the slowest ($p < 0.001$). Identification and antifungal susceptibility tests were performed with directly and conventional methods by positive blood culture bottles. CHROMagar *Candida*, conventional API 20C AUX and PNA-FISH tests have excellent accuracy (%100). Direct API has %98.4 accuracy. The accuracy rates were %85.5 and %95.2 for direct and indirect germ tube tests respectively ($p > 0.05$). We have performed broth microdilution, Etest and disc diffusion methods as susceptibility testing. Among these, we found microdilution as the most compatible test in terms of essential and categorical agreement.

Key Words: Candidemia, direct identification, direct antifungal susceptibility,

PNA-FISH

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Tanım	3
2.2. <i>Candida</i> 'ların Genel Özellikleri	4
2.2.1. <i>Candida</i> Hücresinin Biyolojik Yapısı	4
2.2.2. <i>Candida</i> 'ların Mikolojik Özellikleri	5
2.2.3. Tıbbi Önemi Olan <i>Candida</i> Türleri	6
2.2.4. Patojenite	6
2.2.5. Epidemiyoloji ve Bulaşma	9
2.3. Klinik <i>Candida</i> Enfeksiyonları	9
2.3.1. Yüzeysel <i>Candida</i> Enfeksiyonları	9
2.3.2. Derin Yerleşimli <i>Candida</i> Enfeksiyonları	10
2.3.3. Kandidemi	12
2.4. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Tanısı	13
2.4.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması	13
2.4.2. Mikroskopik İnceleme	13
2.4.3. Kültür	14
2.4.4. Manuel İdentifikasyon Testleri	15
2.4.5. Otomatize İdentifikasyon Sistemleri	15
2.4.6. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization: Time of Flight Mass Spectrometry</i> (MALDI-TOF MS)	16

	Sayfa
2.4.7. Serolojik Yöntemler	16
2.4.8. Fungal Metabolitlerin Saptanması	17
2.4.9. Spesifik Nükleik Asitlerin Saptanması	17
2.4.10. Peptid Nükleik Asit Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (PNA-FISH)	19
2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri	19
2.5.1. Broth Testleri	20
2.5.2. <i>Gradient</i> test (Epsilometer Test; Etest)	21
2.5.3. Disk Difüzyon Testi	21
2.5.4. <i>Time-kill</i> Testi	21
2.5.5. Otomatize Antifungal Duyarlılık Yöntemleri	22
2.6. Antifungal Ajanlar	23
2.6.1. Azoller	23
2.6.2. Ekinokandinler	24
2.6.3. Polyenler	25
2.7. Antifungal Duyarlılık Paternleri	25
2.8. Antifungal Tedavi	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. İzolatların Tanımlanması	31
3.2. Kan Kültür Şişelerine İnokülasyon	31
3.3. Tanımlama Testleri	32
3.3.1. Germ Tüp Testi	33
3.3.2. Kromojenik Besiyerine Pasaj	33
3.3.3. API 20C AUX Maya Tanımlama Sistemi	33
3.3.4. PNA-FISH Yeast Traffic Light Tanı Kiti ile Tanımlama	35
3.4. Antifungal Duyarlılık Testleri	36
3.4.1. RPMI 1640 Besiyeri (L-Glutaminli)	36
3.4.2. Metilen Mavili Mueller-Hinton Besiyeri	37
3.4.3. Etest Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi	37
3.4.4. Broth Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi	38

	Sayfa
3.4.5. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi	40
3.4.6. Antifungal Duyarlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
3.4.7. İstatistik Yöntem	41
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
EKLER	
EK 1: İzolatların Tür, Konsantrasyon ve Şişelere Göre Pozitif Sinyal Verme Süreleri	
EK2: Antifungal Duyarlılık Testlerinin Sonuçları ile Kategorik ve Esansiyel Uyumları	
EK 3: Antifungal Duyarlılık Testlerinin Kategorik ve Esansiyel Uyum Oranları	
EK 4: Klasik Etest ve Klasik Mikrodilüsyon Yöntemleri Arasındaki Kategorik ve Esansiyel Uyum Oranları	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALS	Agglutinin-like sequence
AMB	Amfoterisin B
AND	Anidulafungin
ATCC	American Type Culture Collection
BG	1,3- β -D-glukan
CAS	Kaspofungin
CFU	Colony forming unit
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DA	D-arabinitol
DD	Disk difüzyon
DNA	Deoksiribonükleik asit
Etest	Epsilometer test
EU	Esansiyel uyum
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
FC	Flusitozin
FDA	US Food and Drug Administration
FLU	Flukonazol
GTT	Germ tüp testi
HIV	Human Immunodeficiency Virus
I	Orta derece duyarlı
IT	İtrakonazol
KU	Kategorik uyum
LA	L-arabinitol
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MD	Mikrodilüsyon
MH	Mueller-Hinton
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonik asit
MSS	Merkezi Sinir Sistemi

NK	Natural killer hücre
NPD	Negatif prediktif değer
PAFE	Postantifungal etki
PCR	Polymerase chain reaction
PNA-FISH	Peptit nükleik asit floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
POS	Posakonazol
PPD	Pozitif prediktif değer
R	Dirençli
RNA	Ribonükleik asit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Duyarlı
SAP	Salgısal aspartil proteaz
SDA	Saboraud dekstroz agar
SDD	Doza bağlı duyarlı
Th	T helper
TOC	Tween 80-oxgall-kafeik asit
XTT	Tetrazolium tuzu
VOR	Vorikonazol

ŞEKİLLER

	Sayfa
4.1. <i>C. albicans</i> izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri	43
4.2. <i>C. parapsilosis</i> izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri	44
4.3. <i>C. tropicalis</i> izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri	44
4.4. <i>C. glabrata</i> izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri	45
4.5. <i>C. krusei</i> izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri	45
4.6. <i>C. glabrata</i> ve <i>C. krusei</i> PNA-FISH görüntüleri	50
4.7. <i>C. albicans</i> ve <i>C. parapsilosis</i> PNA-FISH görüntüleri	50
4.8. <i>C. tropicalis</i> PNA-FISH görüntüsü	50

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Yaygın <i>Candida</i> spp. için genel duyarlılık paterni	26
3.1. Antifungal ajanların mikrodilüsyon test konsantrasyonları	38
3.2. CLSI M27 S4'e göre türler ve antifungaller için MİK breakpoint sınır değerleri	41
4.1. Şişe türlerine göre sinyal süreleri	46
4.2. Türlerin ortalama sinyal süreleri ve istatistiksel analizi	47
4.3. Konsantrasyon miktarı ile sinyal sürelerinin karşılaştırılması	47
4.4. Klasik ve direkt tanımlama testlerinin türlere göre performansı	48
4.5. PNA-FISH testinin performansı	49
5.1. Literatürden PNA-FISH performansını özetleyen örnekler	63

1. GİRİŞ

Candida'lar insan cilt, sindirim sistemi, solunum sistemi ve kadın genital sisteminde normal flora üyesi olarak bulunabilirken, savunma sisteminin herhangi bir nedenle hasarlanması sonucu genelde endojen floradan kaynaklanan ve mukokütanöz enfeksiyonlardan ciddi invaziv enfeksiyonlara kadar değişen spektrumda enfeksiyonlar yapabilmektedir.

Daha önceki yıllarda hastane enfeksiyonlarına neden olan etkenler genellikle Gram-negatif ve pozitif bakteriler iken son yıllarda genel mantar enfeksiyonlarının insidansında artış gözlenmektedir (1). Bu artış geniş spektrumlu antibiyotiklerin, immünoşüpresif ilaçların yaygın kullanımı, sitotoksik tedaviye bağlı uzun süren nötroopeniler, artan invaziv kateter kullanımı ve yoğunlaşan majör kardiyak ve abdominal cerrahi gibi girişimsel işlemler ile ilişkilidir (2-4).

Nozokomiyal mantar enfeksiyonları sıklıkla ağır seyirli, hızlı ilerleyen, tanısı zor ve tedaviye dirençli hastalıklar olduğundan ciddi morbidite ve mortalite nedenidir (5).

Candida spp. hastane kaynaklı kan akışı enfeksiyonlarında %9'luk oranıyla dördüncü sırada yer alırken, %39.2'lik mortalite oranıyla birinci sıraya çıkan mikroorganizmalardır (6).

Candida enfeksiyonlarından en sık izole edilen patojen *C. albicans* olmakla beraber, özellikle invaziv enfeksiyonlarda non-*albicans* türlerin de son yıllarda artmaya başladığı gösterilmiştir (7). *C.glabrata* ve *C. krusei* dünya genelinde kandidemilerin %15-25'ini oluştururlar ve yaygın kullanılan antifungal ajanlara azalmış duyarlılıklarıyla da tedavi edilmeleri zordur (8).

İnvaziv kandidiyazda kullanılan başlıca üç ana grup ilaç vardır. Bunlar; triazololler, ekinokandinler ve polyenlerdir. Tarihte flukonazol (FLU) ve amfoterisin B (AMB) deoksikolat kandidemiler için ilk sıra ilaçlar olarak kabul edilmiştir. Ancak günümüzde non-*albicans Candida* türleri (9, 10) ile FLU dirençli *C. albicans*'ın (11, 12) artan sıklığı göz önüne alındığında, yüksek etkili ve iyi tolere edilen ekinokandinler ilk sıra ilaçlar arasında kendilerine yer bulmuşlardır (13).

Önemli antifungallerden biri olan FLU 1990 yılından itibaren klinik kullanıma girmiştir ve kandidemi tedavisinde AMB ile eşit etkide olduğu gösterilmiştir (14). Ekinokandinlerden kaspofungin (CAS) *Candida*'lar için FLU

dirençli türler de dahil olmak üzere mükemmel in vitro etkiye sahiptir (15) ve 2003 yılından itibaren US Food and Drug Administration (FDA) tarafından kandidemiler için kullanılması yönünde onay almıştır. CAS ve FLU Infectious Disease Society of America tarafından ilk sıra ilaçlar olarak kabul edilseler de (16, 17), seçim klinisyenin bilgisi ve geçmiş deneyimi, etkenin türü ve hastanın önceki azol kullanımını gibi durumlara göre değişebilmektedir. Son yıllarda artan FLU direnci ve non-*albicans* türlerin artışı birçok klinisyeni özellikle izolat tanımlanana kadar flukonazolden ziyade CAS tercihi yapmaya itmektedir. Ancak ekinokandinlerin azollere göre çok daha pahalı ilaçlar olması ilaç maliyetlerini arttıran bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (18).

Kandidemilerde hızlı tanı ve erken tedavinin mortaliteyi belirgin oranda azalttığı gösterilmiştir (19, 20). Her ne kadar non invaziv ve hızlı tanıya yönelik çeşitli serolojik ve moleküler testlerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılsa da, kandidemilerin tanısında altın standart yöntem hala kan kültürüdür. Ancak duyarlılık düşük ve sonuçlar ise zaman gerektirir (21-26).

Bu noktada sonuçları hızlandırabilmek için en azından pozitif sinyal sonrası tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerinin ivedilikle sonuçlandırılması hastanın prognozu açısından son derece önemli hale gelmiştir. Bunun yanında hem hastanede yatış sürelerinin kısılması hem de kullanılacak antifungallerin daha dar spektrumlu ve daha ucuz ajanlar olarak seçilmesi bu konunun ekonomi açısından da önemli hale gelmesine sebep olmuştur.

Bizim bu çalışmadaki amacımız, kandidemiler için tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerini olabilecek en kısa zamanda sonuçlandırmaya çalışmaktır. Bu amaçla geleneksel yöntemlerle yapılan tanı ve duyarlılık testlerinin direkt olarak pozitif sinyal vermiş kan kültür şişelerinden yapılması hedeflenmiş; bulunan sonuçlar klasik yöntemlerle elde edilen verilerle karşılaştırılıp, yöntemler arasında uyum olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca kan kültürlerinin duyarlılığı açısından üç farklı kan kültür şişesi ve kandaki fungal yükün etkisi de değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Tanım

Candida'ların tarihçesi Hipokrat ve Galen'e kadar dayanmakla birlikte, ilk kez 1839'da Langenbeck tarafından bir hastanın ağzındaki lezyondan yapılan kazıntı örneğinde mantarın gözlemlenmesi ile keşfedilmiştir. Pamukçuğun etkeni olarak mantarın tarifini 1842'de Gruby yapmış, 1843'te Robin pamukçuk etkeni mantarın sistemik enfeksiyona neden olduğunu gözlemiş ve bu mantarı ilk kez *Oidium albicans* olarak adlandırmıştır. 1890'da Zopf tarafından önerilen *Monilia albicans* ismi ile birlikte yıllar içinde, aynı mantar için 100'ü aşkın isim kullanılmıştır. *Candida albicans* ismi 1923 yılına gelindiğinde Berkhout tarafından verilmiştir. *Candida* enfeksiyonlarının en önemli dönemi 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin yaygın olarak kullanıma girmesi ile başlamıştır (27, 28).

Candida türleri, Ascomycota bölümünde, Hemiascomycetes sınıfında, Saccharomycetales takımında ve *Candidaceae* ailesinde yer alan maya mantarlarıdır (29). Bu cins içerisinde 200'den fazla tür bulunmaktadır. *Candida* türleri normal flora üyesi olarak ciltte, solunum ve sindirim sistemi ile kadın genital sisteminde yaygın olarak bulunabilirler. Normal flora üyesi iken immün sistemin herhangi bir nedenle baskılandığı durumlarda dokulara invaze olarak hayatı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bunun için en önemli predispozan faktörler; i) kemoterapi, başta kemik iliği olmak üzere organ transplantasyonu ve bunlara eşlik eden derin immünosüpresyon; ii) hastanede uzun süre yatış; iii) damar içi kateterizasyon; iv) geniş spektrumlu antimikrobik ilaçların uzun süre kullanımı; v) artmış profilaktik antifungal ilaç kullanımı olarak özetlenebilir (30).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının en sık etkeni *C. albicans*'tır, ancak birçok merkezden *C. glabrata* ve *C. krusei* gibi non-*albicans* *Candida* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonların sıklığında artış bildirilmektedir. Bunun en önemli nedeni olarak antifungal ajanların yaygın kullanımı, özellikle profilaktik FLU kullanımı suçlanmaktadır. Antifungal profilaksi, duyarlı suşların elimine olarak dirençli türlerin baskın hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle hastanede yatmakta olan ve çeşitli nedenlerle immün sistemi baskılanmış hastalar için *C. glabrata* ve *C. krusei*

gibi daha dirençli türler ile oluşan enfeksiyonlar önemli bir sorun haline gelmekte, dolayısıyla tanı ve tedavide alternatif yöntemlerin kullanımını gerektirmektedir (31).

2.2. *Candida*'ların Genel Özellikleri

Candida'lar yaygın maya türleri olup, bitkilerde, memeli sindirim kanalında ve insan mukoza ve derisinde bulunur. İnsan gastrointestinal kanalının her yerinde bulunabilirler ve en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır.

2.2.1. *Candida* Hücresinin Biyolojik Yapısı

Mantarlar basitçe, fotosentez yapmayan, plazma membranı ve en dışta hücre duvarı bulunan ökaryotik hücrelerdir. Membranla çevrili bir çekirdek ve içinde bir çekirdekçik ile lineer kromozomlar bulunur. Sitoplazmada mitokondri, golgi aygıtı, vakuoller, birkaç çeşit vezikül ve 80S ribozomlar gibi organeller ile hücre iskeleti bileşenleri yer almaktadır. Bu bileşenler, membran hareketinde rol oynayan mikrotübüller, sitoplazmik akışkanlıktan sorumlu aktin ve aktinle birlikte organellerin hareketini sağlayan miyozindir (32).

Hücre membranı, bulundurduğu ozmoenzimler sayesinde moleküllerin transferini sağlar. Duvar sentezinde rolü olan kitin sentetaz ve sinyal iletiminde rolü olan enzimler membranda bulunur. *Candida* hücre membranı ayrıca fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve fosfatidil inositol gibi fosfolipitleri de bulundurur. Hücre membranı büyük miktarda sterol içerir, membran lipitlerinin %22'sini steroller oluşturur. Sterollerin %95'i ergosterol formundadır ve birçok antifungal ajan ergosterolün farklı sentez basamaklarında etkilidir (32).

Hücre duvarı, hücreye şeklini veren, osmotik basınca karşı hücreyi koruyan ve moleküllerin transferinde rolü olan sert bir yapıdır. *Candida* hücre duvarı, antijenik belirteçleri, memeli hücrelerinde bulunmayan anahtar biyomolekülleri bulundurur ve konak hücrelere tutunmayı sağlar. Hücre duvarının en temel bileşenleri olan karbonhidratlar, mannan ya da mannopteinler, glukanlar (β -1,3 ve β -1,6 bağlı) ve kitinden oluşmaktadır (33, 34). Glukanlar ve kitin duvarın yapısal iskeletini oluşturur ve glukanlar duvar ağırlığının %47-60'ını oluşturmaktadır. Kitin N-asetilglukozamin'in bir polimeridir ve maya hücre duvarlarının yalnızca %2-4 kadarını oluşturan önemli bir yapısal bileşendir (34). Mannoproteinler ise yapısal

polimerler içindeki hücre duvarının şekilsiz kısmının esas elemanıdır ve hücre duvar karbonhidratlarının %40'ını oluşturur. *Candida* hücre duvarındaki ana antijenik yapı olan mannanın yapısal farklılığına göre A ve B olarak iki serotipe ayrılır. Hücre duvarının diğer bileşenleri proteinler (%5-15), lipitler (%2-5) ve inorganik fosfattır (32, 34, 35).

2.2.2. *Candida*'ların Mikolojik Özellikleri

Candida'lar tek hücreli, ökaryotik, tomurcuklanarak veya ikiye bölünerek çoğalan, 3-4 µm boyutlarında yuvarlak veya oval görünümlü (blastospor) mayalardır. Blastosporlar ana hücreden ayrılmadan uzayarak 5-10 µm boyutlarında yalancı hif (*pseudohypha*), bazen de gerçek hif oluşturabilirler (36, 37). *Candida albicans*, besince fakir bir ortamda iyi yedek besin depolayan, gerçek ya da yalancı bir hifin ucunda veya arasında bulunan, tek hücreli, kalın duvarlı, geniş oval yapılı klamidosporlar ve serumda 37°C'de bekletildiğinde, 1.5-2 saatte çimlenme borusu (germ tüp) oluşturmaktadır. Bu özellikler *C. albicans*'ın hızlı ön identifikasyonu için önemlidir (27, 36, 38). Ancak *C. dubliniensis*'in de germ tüp ve klamidospor oluşturabildiği unutulmamalıdır. Bunun yanında *C. glabrata* ve *C. famata*, gerçek ya da yalancı hif oluşturmamaları ile diğer türlerden ayrılabilirler (36).

Gram boyama ile tüm *Candida* türleri gram pozitif boyanır. Maya elemanlarının örnekler içinde aranmasında gram boyama, kalkoflor beyazı ve KOH gibi yöntemler kullanılmaktadır (39, 40). *Candida* türlerinin çoğu, yaygın kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürerler. Sabouraud dekstroz agar (SDA) gibi mikolojik besiyerlerinde 37°C'de 1-3 günde beyaz ya da krem renkli, yumuşak kıvamlı, genellikle S koloni morfolojisinde ve tipik maya kokulu koloniler oluştururlar (38, 39).

C. krusei dışındaki *Candida* türlerinin üreaz enzimi yoktur. *Candida* türleri oksijen varlığında spesifik karbonhidratları tek karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Bazıları fermentatiftir. Bu özellik klinik örneklerden izole edilen *Candida*'ların diğer mantarlardan ayırımında önemlidir (39).

2.2.3. Tıbbi Önemi Olan *Candida* Türleri

Normal florada bulunan *Candida*'lar, herhangi bir nedenle savunma sistemi bozulmuş hastalarda dokuları istila ederek yaşamı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara neden olabilirler. *C. albicans* hemen hemen tüm *Candida* enfeksiyonlarından en sık soyutlanan türdür (39). Bunun nedeni normal florada yüksek sıklıkta bulunması ve bazı virulans faktörlerine sahip olmasıdır (41, 42). *C. albicans*'ın A ve B serotipleri sağlıklı bireylerde eşit dağılım göstermekteyken, immünsüprese bireylerde B serotipinin daha sık görüldüğü bildirilmektedir (39, 43).

Candida enfeksiyonlarından ikinci en sık izole edilen etken *C. glabrata*'dır ve normal gastrointestinal ve genital floranın üyesidir. En sık üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur ancak, derin doku tutulumu ve kandidemiye de neden olabilmektedir. İzolatlarının büyük çoğunluğu flukonazole az duyarlıdır (38, 39). *C. tropicalis* ve *C. albicans* kadar virulan olduğu bilinen, invazyon yeteneği yüksek bir *Candida* türüdür (38). Hatta lösemi ve lenfomalı hastalarda *C. albicans*'tan daha virulan davrandığı bildirilmektedir (39).

Tıbbi önemi olan diğer kandida türleri; *C. catenulata*, *C. ciferrii*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii* ve *C. zeylanoides*'tir (39). Ancak bu liste ender görülen yeni türlerin artması ile daha da büyüme eğilimindedir.

2.2.4. Patojenite

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının genellikle immünsüprese hastalarda görülmesi sebebiyle, bu enfeksiyonların oluşmasında virulans faktörlerinin katkısının düşük olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte enfeksiyonlar sırasında birtakım sekretuar enzimler de saptanmıştır. Bu nedenle invaziv *Candida* enfeksiyonları hem konak savunmasındaki yetersizlik hem de mikroorganizmanın virulans faktörlerinin bir sonucudur.

***Candida* Virulans Faktörleri**

Candida'ların sahip olduğu bazı özellikler konağın savunma sistemini yenerek hastalık oluşturmaya çalışır. Mikroorganizmanın kolonizasyon ve ardından invazyon yapabilmesi için, konağı tanınması ve adezyonu şarttır. Dış hücre duvarı tabakası mannopteinler, β -1,3 ve β -1,6 bağlı glukoz ve kitin içermekte ve bu tabaka *Candida*'ların konak yüzeyine yapışması ve ardından kolonizasyonunda önemli rol oynamaktadır (41). *Candida* hücrelerinin virulansı, konak hücrelerine tutunma eğilimi ile doğru orantılıdır ve adezyon major virulans faktörü olarak tanımlanabilir. Adezyonu takiben *slime* faktörün oluşumu önemli bir virulans faktörüdür. Yapay yüzeylere adezyon ve tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm oluşumu, antifungal ilaçlara sıklıkla direnç göstermesi ve biyofilm oluşturan hücrelerin artmış patojenliği nedeniyle son yıllarda önemli bir sorun haline gelmiştir (44). Hastaların bir kısmında sistemik kandidiyaz damar içi kateterlerin kontaminasyonu ile başlamakta ve biyofilm tabaka, içindeki mayaların antifungal ilaçlara direncinde önemli rol oynamaktadır. *Candida*'lar, adezyonda rol alan, genellikle polisakkarit ya da glukoprotein yapıda adezinlere ve hücre ilişkili ya da serumda bulunan ligandlara sahiptir. Bu adezinler, Als (*agglutinin-like sequence*) protein ailesi, Hwp1p, Eap1p, Csh1p ve diğer daha az bilinen hücre yüzey reseptörlerinden oluşmaktadır (44).

Fenotipik değişiklik, invazyon sırasında değişen çevre şartlarına mantarın uyumunun sağlanmasında önemli bir faktördür. Bazı *C. albicans* hücre topluluklarında hücre yüzey özellikleri, koloni görünümü ve metabolizması, daha virulan ve enfeksiyonlarda daha etkili forma değişiklik gösterebilmektedir (45). Ortamın ısısı, pH'ı, CO₂ konsantrasyonu gibi çevresel koşullardaki değişiklikler, *Candida*'larda tek hücreli, ovoid maya hücreleri (blastospor) ile hif ya da pseudohiflerin oluşturduğu filamentöz yapılar arasında morfolojik değişikliklere neden olabilir. Mantarın bu özelliği enfeksiyonların patogeneğinde önem kazanmaktadır. Çevreye yayılma ve yeni konağa ulaşmada maya hücreleri sorumlu iken, doku hasarı ve invazyon için hifler gereklidir ve biyofilm oluşumunda her iki form da yer almaktadır (41, 46).

Önemli diğer virulans faktörleri, proteazlar (salgısal aspartil proteinaz=SAPs), lipazlar ve fosfolipazlar gibi hidrolitik enzimlerin sentezi ve salınmasıdır. Bu enzimlerin fungal beslenmedeki önemli rolleri yanı sıra, lezyon

alanındaki çoğu konak proteinlerinin (albumin, hemoglobin, keratin, salgısal IgA) yıkılması ile doku hasarı, invazyon, konak savunmasından kaçış gibi mekanizmalarla *Candida* patogenezinin güçlü katkıları bulunmaktadır. *In vitro* koşullarda *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'te aktif olarak proteinaz üretimi saptanmıştır (41, 44, 47).

***Candida* Enfeksiyonlarına Konak Yanıtı**

Candida enfeksiyonlarına konak yanıtı, doğal bağışıklık ve hücre aracılı kazanılmış bağışıklık ile fungal virulans arasındaki ilişkinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Mantarın mukozal yüzeyde uzun süre kommensal olarak kalması ya da patojenliğe dönüşümü, doğal ve kazanılmış bağışıklığın bütünü ile ilişkilidir. Mikroorganizmaya ilk yanıt, cilt ve mukoz membranların oluşturduğu fiziksel bariyerler ile oluşur. *Candida* enfeksiyonlarına doğal bağışıklıkta nötrofiller, monositler ve doku makrofajları, doğal öldürücü (NK) hücreler ile opsonin (spesifik antikorlar ve kompleman componentleri), kollektin, defensin, mannoz bağlayan protein gibi moleküller görev almaktadır. *Candida*'lar deri veya mukoza engelini aştıklarında, kandidemi ve sistemik kandidiyaza karşı savunmada rol oynayan en önemli hücre tipi nötrofillerdir ve bunların sayı ile fonksiyonlarındaki bozukluk konağın *Candida* enfeksiyonlarına duyarlılığını arttırmaktadır. Bununla birlikte makrofajlar dissemine kandidiyazda büyük role sahiptir. Opsoninler nötrofil fagositozu için çok gerekli olmasalar da, fungusun hücre içi öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır. NK hücreleri fungusa karşı direkt öldürücü etki gösteremezler, ancak fungus ile NK hücreleri arasında onların fonksiyonlarını etkileyen bir etkileşim meydana gelebilir ve bu etkileşim fagositik hücre fonksiyonlarını uyaran sitokinlerin salınımını başlatabilmektedir (48-50).

Fungal enfeksiyonlara karşı özgül (kazanılmış) savunmada etkili mekanizma hücre aracılı immünitedir, ancak antikor yanıtının belli tipleri de koruyucu role sahiptir. Genellikle T-helper (Th) 1 aracılı immünite enfeksiyonun ortadan kaldırılmasında, Th2 ise enfeksiyona duyarlılıkta etkilidir. Th1 ve Th2 hücrelerinin etkinlikleri, enfeksiyon bölgesindeki fungisidal fagositleri etkinleştirir ya da etkinliklerini durdurur. Fagositlerin etkinlikleri Th1 tipi sitokinler tarafından arttırılır; Th2 tipi sitokinler ise fagositik fonksiyonları bozar (48-51).

2.2.5. Epidemiyoloji ve Bulaşma

Candida türleri toprakta, suda, yiyeceklerde, bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunabilirler. Sağlıklı insanlarda cilt ve mukoz membranlarda kommensal olarak bulunur ve herhangi bir nedenle konak savunma sistemi bozulduğunda patojenite kazanabilir. Bu nedenle enfeksiyonlarının çoğunlukla endojen floradan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sistemik *Candida* enfeksiyonları için en sık giriş yolu gastrointestinal sistemdir. Nadiren vajinal kandidozlu anneden bebeğine vertikal bulaşma, yatan hastalar arasında ya da sağlık çalışanlarından nozokomiyal geçiş gibi insandan insana bulaşma da söz konusu olabilir. Hastanede yatan hastalarda kolonizasyonun, sağlıklı kişilere göre daha fazla olduğu saptanmıştır (39, 52).

Nozokomiyal kan akımı enfeksiyonu etkenleri arasında *Candida*'lar Amerika'da 4., Avrupa'da ise 6. sırada yer almakta ve yoğun bakım hastaları arasında daha sık görülmektedir. *C. albicans* en sık görülen tür olmakla birlikte, non-*albicans* türlerin sıklığında artış bildirilmektedir. Bu artıştan ikinci jenerasyon azol antifungallerin yaygın kullanımı sorumlu tutulmakta ve bununla uyumlu olarak flukonazole daha az duyarlı (*C. glabrata*) ya da doğal dirençli (*C. krusei*) izolatlarda belirgin artış bildirilmektedir (53).

2.3. Klinik *Candida* Enfeksiyonları

2.3.1 Yüzeysel *Candida* Enfeksiyonları

Yüzeysel *Candida* enfeksiyonları hem immünsüprese hem de immünkompetan bireyleri etkileyebilmektedir. Pamukçuk olarak bilinen oral *Candida* enfeksiyonları oldukça yaygındır. Dil ve diğer ağız içi yüzeylerde krem gibi beyaz yamalarla karakterize, oral kandidiyazın spesifik bir formudur, ağrılıdır ve kaldırıldığında kanayabilir. Sıklıkla süt emen bebeklerde, kanserli, AIDS'li hastalarda, inhale steroid kullananlarda görülür (27). Bu klasik lezyonlara ilaveten; akut atrofik kandidiyaz, kronik atrofik kandidiyaz, anguler *cheilit* ve kandidal lökoplakiyi içeren diğer formlar da görülebilir. Tanı lezyonun klinik görünümü, lezyondan alınan örneklerin mikroskopik incelenmesi ve kültürü ile konulabilir (27, 54).

Candida özofajiti, genellikle hematopoetik veya lenfatik sistem kanseri tedavisi, antibiyotik, steroid ya da omeprazol kullanımı ve ilerlemiş HIV enfeksiyonu

ile ilişkilendirilmiştir. Yutma güçlüğü, ağrılı yutma ve retrosternal ağrı gibi diğer özofajitlerden ayırt edilemeyen semptomlar görülür. Tanı endoskopide pamukçuk benzeri beyaz yamaların görülmesi ve biyopsi ile yapılabilir (27, 54).

Vulvovajinal kandidiyaz diğer bir mukozal *Candida* enfeksiyonudur ve vajinitlerin en sık nedeni kandidalardır. Tüm kadınların yaklaşık %75'i hayatlarında en az bir kez *Candida* vajiniti atağı geçirirler ve bunların %85-90'ında *C. albicans* etkindir (54, 55). Bu yaygın enfeksiyon sıklıkla kontrolsüz diyabet, antibiyotik tedavisi, gebelik, hormon replasman tedavisi, immünsüpresif tedavi durumlarında görülür. Semptomatik vajinal kandidiyazda kaşıntı, yanma hissi, kesilmiş süt benzeri akıntı gibi yakınmalar, vajinal ve/veya vulvar eritem ve ödem gibi bulgular vardır (27, 55).

Cilt, tırnak ve mukoz membranlarda kandidalar tarafından oluşturulmuş kronik ve/veya tekrarlayan enfeksiyonlar kronik mukokutanöz kandidiyaz olarak anılmaktadır. Bu kliniğe sahip hastaların ortak özelliği, *Candida* lara karşı etkili hücre aracılı immün yanıt geliştirebilme yeteneklerindeki yetersizliktir. Hastaların çoğu infant ya da çocukluk yaş grubundadır. T lenfosit fonksiyon bozukluğu yanında, bazen B lenfosit, granülosit veya kompleman fonksiyon bozukluğu da görülebilir. Bazı örneklerde çoklu endokrin anomaliler, tekrarlayan viral ve bakteriyel pulmoner veya sinüs enfeksiyonları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (27).

Candida türleri cilt ve tırnakları tutan yüzeysel enfeksiyonlara neden olabilirler. Mikroorganizma sıcak ve nemli vücut bölgelerini tercih eder. HIV ile enfekte hastalarda yüzeysel *Candida* enfeksiyonları sıklıkla diğer yüzeysel mikozlarla birlikte görülmektedir. İnfantlarda görülen diaper dermatitinin en sık nedenlerinden biri *Candida* lardır ve gluteal, inguinal ve perineal alanlarda lezyonlar daha belirgindir. Diyabetik, yaşlı ve obez yetişkinlerde de benzer lezyonlar oluşabilir (31).

2.3.2. Derin Yerleşimli *Candida* Enfeksiyonları

Derin yerleşimli *Candida* enfeksiyonları direkt inokülasyon ya da hematogen yayılma ile oluşabilir. En sık alt üriner sistem enfeksiyonları görülür. Hastanede yatan ve yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan en sık izole edilen etkenler arasında yer almaktadır. *Candida* türleri alt üriner sistemde kolonize olabilirler ve alt ya da üst üriner sistemde enfeksiyona neden olabilir. Semptomlar bakteriyel enfeksiyonlarla

aynıdır. Üriner kateter varlığı, diyabet, geniş spektrumlu antibiyotiklerin ya da immünoşüpresif ajanların kullanımı en önemli risk faktörleridir (31).

Candida ile oluşan merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonu nadirdir, sıklıkla prematüre infantları ve MSS cerrahisi geçirmiş hastaları etkiler. Genellikle dissemine kandidiyazın bir komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Diğer risk faktörleri lomber ponksiyon, ventrikülo-peritoneal şant ve nadiren bakteriyel menenjitin komplikasyonudur. En sık görülen şekli menenjittir, mikotik anevrizma ve beyin apseleri de görülebilir. Semptom ve bulgular, klasik menenjit tablosuna göre daha silik ve kronik seyreder, mortalitesi yüksektir (27, 56).

Diğer nadir bir tutulum *Candida* nedenli pnömonidir ve iki şekilde görülür; enfekte sekresyonların aspirasyonu ile endobronşiyal yerleşim sonucu gelişen lokal veya diffüz bronkopnömoni ve hematogen kaynaklı, yaygın, ince nodüllü infiltratlar.

Diğer formları daha nadirdir. Fungal endokarditlerin en sık etkeni *Candida* 'lardır ve perikard, miyokard ile endokarda enfeksiyon oluşturabilirler. Kalp cerrahisi, protez kalp kapakları, santral venöz kateterler, intravenöz ilaç kullanımı, bakteriyel endokardit ve kalp kapağı yapısal bozuklukları önemli risk faktörleri arasında sayılabilir (27).

Candida nedenli peritonit sıklıkla iki hasta grubunu etkilemektedir; kronik peritoneal diyaliz hastaları ile karaciğer ya da pankreas transplant hastaları ve pankreatit ya da gastrointestinal perforasyon nedenli cerrahi müdahale geçirmiş hastalardır. Peritoneal diyaliz hastalarındaki fungal peritonitlerin yaklaşık %75'inde etken kandidalardır (31).

C. albicans endojen oftalmitlerin en sık nedenlerindedir. Ayrıca eksojen oftalmit, keratit gibi enfeksiyonlara da neden olabilir. Genellikle sistemik bir hastalık varlığında (diyabet, immünoşüpresyon) ortaya çıkar. Kandidemi, cerrahi, lokal steroid ya da antibakteriyel ajan kullanımı, göz anomalileri ve intravenöz kateterler enfeksiyona zemin hazırlayan risk faktörleridir (57).

Kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları oldukça nadir görülen enfeksiyonlardır ve genellikle kandideminin geç komplikasyonudur. Vertebra ve intervertebral diskler, el bileği, femur, proksimal humerus, skapula ve kaburgaların kostakondral birleşim yerlerini tutabilir. Tanı ve tedavisi güçtür (27).

Hepatosplenik kandidiyaz (kronik dissemine kandidiyaz), akut lösemi için tedavi alan hastalar ya da uzun süre nötropenik kalan kemik iliği transplant alıcılarında görülen dissemine *Candida* enfeksiyonunun bir sendromudur. Hastalarda çoklu karaciğer ve dalak apseleri mevcuttur. Morbidite ve mortalitesi yüksektir (58).

2.3.3 Kandidemi

Kandidemi terimi, *Candida* türünden bir mayanın kanda bulunması durumunu tanımlar ve invaziv kandidiyazın en sık klinik tablosudur. Kan kültüründe bir maya asla kontaminant olarak kabul edilmemelidir ve daima ivedilikle kaynağının bulunması gerekir. Kandideminin sebebi birçok değişik organ veya enfekte bir kateter olabilir (59).

Kandidemili tüm vakalarda antifungal bir ajanla tedavi gerekir (17) ve asla sadece kateterin çıkarılması tedavi için yeterli sayılmaz. Birçok çalışma kandideminin yüksek mortaliteyle ilgili olduğunu (60, 61) ve antifungal tedavi edilmeyen hastalarda bu oranların daha da arttığını ortaya çıkarmıştır (61, 62).

Kandidemi Epidemiyolojisi

C. albicans kandideminin en sık sebebidir ancak non-*albicans* türlerin izolasyon sıklığı da son yıllarda artmaktadır. Bunlar arasında en göze çarpanlar *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* olmakla birlikte, *C. tropicalis* ve *C. krusei* de artan oranlarıyla dikkati çeker. Bu değişim önemlidir çünkü bazı *C. glabrata* ve tüm *C. krusei* suşları flukonazole dirençlidir. Buna ek olarak *C. parapsilosis*'in tüm ekinokandinler için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) breakpoint değerleri diğer *Candida* türlerinininkinden daha yüksektir (63).

C. glabrata kandidemilerde hemen *C. albicans*'tan sonra gelerek % 20-24'lük oranı ile önemli bir fırsatçı mantardır. Tüm *Candida* türleri gibi biyofilm yapabilir. Hastanın yaşının artması ile *C. glabrata* fungemileri arasındaki doğru orantı dikkat çekicidir (194). *C. parapsilosis* ise daha çok genç hastalarda ve yenidoğan yoğun bakımlarında (özellikle düşük doğum tartılı, prematüre bebeklerde) sorun olan bir mantardır. Mukoza yerine daha çok deride bulunan *C. parapsilosis* de biyofilm yapar ve sıklıkla santral venöz kateter ve eklem protezlerini enfekte edebilir. Bunun anlamı enfeksiyon kontrol önlemleri ile önlenemez olmasıdır (64-66). Bunları takiben gelen

C. tropicalis ve *C. krusei* daha sıklıkla hematolojik malinitesi olan veya kök hücre transplantı yapılan hastalarda kandidemi etkeni olarak görülür. Bu hastalarda azol profilksisi ve preemtif tedavi bu türlerin artışından sorumlu tutulmaktadır (64-66).

Ülkemizdeki kandidemi insidansı ise Yapar ve ark.'na (67) göre 2000-2003 yılları arasında 5.6/10 000 yatış (%57.7 *C. albicans*, %20.2 *C. tropicalis*, %12.5 *C. parapsilosis*); Erdem ve ark.'na (68) göre 2004-2007 yılları arasında 4.2/10 000 yatış (%30 *C. albicans*, %70 non-*albicans Candida*); Koçak ve ark.'na (69) göre de 2008 yılında 16.8/10 000 yatış (%55.2 *C. albicans*, %28.9 *C. parapsilosis*) olarak hesaplanmıştır.

2.4. *Candida* Enfeksiyonlarının Tanısı

Candida enfeksiyonlarının tanısında ilk adım bu etkenden şüphelenmektir. Laboratuvar tanısında standart yaklaşım;

- Klinik örneklerin direkt mikroskopik incelenmesi,
- Kan, vücut sıvıları, dokular ve diğer örneklerden kültür ile etkenin izolasyonu,
- Etkenin tür seviyesinde tanımlanması,
- Dokudaki *Candida* türü ile morfolojik benzerliğin kanıtlanmasına dayanmaktadır.

2.4.1. Örneklerin Alınması ve Taşınması

Candida enfeksiyonu şüphesi varlığında örneklerin alınması ve laboratuvara ulaştırılması esnasında özel işlemlere gerek yoktur. Örnekler alındıktan sonra en geç iki saat içinde laboratuvara ulaştırılmalı, mümkün olan en kısa sürede işleme alınmalı, doku ve sürüntü örneklerinin kurummasına izin verilmemelidir. Kısa sürede işleme alınamayacak steril örnekler 37°C'de, normal flora ile kontamine olma olasılığı yüksek olan örnekler ise +4°C'de saklanmalıdır (39, 70).

2.4.2. Mikroskopik İnceleme

Candida enfeksiyonlarının tanısında, ilk adım mikroskopik incelemedir ve örneklerin gram, metilen mavisi veya kalkoflor beyazı ile boyanarak incelenmesinde tomurcuklanan maya hücreleleri, hif ya da yalancı hiflerin görülmesi tanıda

değerlidir. Cilt, tırnak gibi keratinize ya da epitelyal doku örnekleri %10-30 KOH ile muamele edilerek incelenmelidir. Beyin omurilik sıvısı, idrar, bronkoalveolar lavaj gibi sıvı örneklerde maya hücreleri yoğun olmayacağından, santrifüj işleminden sonra gram boyası ile incelenmesi ayrıca balgam örneklerinde musini parçalamak amacı ile örneğin homojenize edilmesi duyarlılığı arttırmaktadır (28, 70).

2.4.3. Kültür

Etkenin izolasyonu için tüm örneklerin kültür incelemesi yapılmalıdır. Bu, gerektiğinde antifungal duyarlılık testlerinin yapılabilmesi ve epidemiyolojik çalışmalar için de önemlidir (38). Yüzeysel enfeksiyonların mikroskopik incelemesinde mikroorganizmanın görülmesinin ardından kültür pozitifliği tanıyı kesinleştirir (27). İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısında da kültür önemli rol oynar. Pozitif bir kan kültürü sistemik bir enfeksiyonu ya da kontamine intravenöz girişimlere bağlı geçici bir kandidemiye yansıtabilir. Ancak solunum veya sindirim sisteminden elde edilen pozitif bir kültür kolonizasyon da olabileceğinden, balgam ya da gaita örneğinden izolasyon tek başına tanı için yeterli değildir. Bu nedenle steril bölge örnekleri elde edilmeli ve sonuçlar klinik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir (28, 38, 70).

Candida'lar, genellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanılan besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. Saboraud dekstroza agar (SDA), içerdiği yüksek şeker konsantrasyonu nedeniyle, bakterilerin üremelerini baskılarken, *Candida*'lar ve diğer mantarların üremelerini kolaylaştırmaktadır. Mantar enfeksiyonu açısından şüpheli örnekler SDA besiyerine inoküle edilerek oda ısısı (22-26°C) ve 37°C'de inkübe edilirler. Maya kolonileri 24-48 saatte belirgin hale gelir. Dissemine kandidiyaz ve kandidemi düşünüldüğünde mutlaka kan kültürü yapılmalıdır. Ancak bu durumda kan kültürü pozitiflik oranı düşük olduğundan birkaç kez tekrarlanmalıdır. Pozitiflik oranını ve üreme hızını arttırmak için lizis santrifügasyon teknikleri, sürekli monitorizasyon yapan otomatize sistemler geliştirilmiştir. İnvaziv fungal enfeksiyon tanısında klinik örneklerin mikroskopik incelenmesi ve kültürü hala altın standart yöntemler olmakla birlikte, bunların duyarlılık ve özgüllüğü genellikle yetersizdir ve fungal yükün yükseldiği, enfeksiyonun ileri evrelerinde pozitifleşmektedirler (19).

Spesifik Kültür

Staib tarafından *C. neoformans* tanısı için geliştirilen Birdseed (*Guizotia abyssinica*) agar, *C. neoformans* ve *C. albicans* için kullanılan tween 80-oxgall-kafeik asit (TOC) agar besiyerleri bulunmaktadır (71-73).

Kromojenik Kültür

Kromojenik besiyerleri *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi klinik *Candida* türlerinin doğrudan tespit edilmesini sağlar. Bu besiyerlerinden bazıları şunlardır; CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France), *Candida* (Oxoid, Basingstoke, UK), Candi Select 4 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), chromID *Candida* (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) (71, 73, 74).

2.4.4. Manuel İdentifikasyon Testleri

Manuel identifikasyon yöntemleri koloni morfolojisi, karbonhidrat asimilasyon testleri, fenoloksidaz ve üreaz enzimlerinin saptanması ve SDA buyyonunda yüzeyde zar ve gaz oluşumunun araştırılması gibi yöntemleri kapsamaktadır. Bu grupta API 20C AUX (bioMérieux), Auxacolor (Bio-Rad), Candifast (ELITech Group), ID 32 C (bioMérieux), RapID Yeast Plus (Remel), Uni-Yeast-Tek (Remel) testleri ticari olarak geliştirilmiş karbonhidrat asimilasyon testleridir (71, 72, 74).

2.4.5. Otomatize İdentifikasyon Sistemleri

Bakteri tanımlamasında yaygın olarak kullanılan otomatize identifikasyon sistemlerinin, mantarların tanımlanmasında da kullanımı son zamanlarda artmıştır. Bu gruba Biolog YT Microplate (Biolog), MicroScan Rapid YS (Siemens), Sherlock MIS (MIDI, Inc.), Vitek YBC (bioMérieux), Vitek 2 YBC (bioMérieux) örnek olarak verilebilir (71, 74, 75).

2.4.6. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization: Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Matrix associated laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), mantar tanımlanmasında kullanılan en yeni yöntemlerden biridir. Bu çok hızlı ve doğru teknik, minimal uzmanlık ve zaman gerektirir. Yöntemin temelinde ribozomal proteinler esas alınmaktadır. Tüm hücreler veya ekstrat kimyasal matris içine konur ve lazerle iyonize edilir. Örnek MS içerisine bir şırınga pompası ile püskürtülmektedir. Damlacıklar buharlaştıkça, yükler damlacıkların içinde bulunan moleküllere transfer olur. Çoklu yüklü iyonlar oluşur. Oluşan moleküller detektöre aktarılır. Kütle analizinde ayırım genellikle kütle-yük oranı ile yapılmaktadır. İyonizasyon durumlarına göre tanımlama yapılır (71, 76, 77).

2.4.7. Serolojik Yöntemler

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının erken tanısı, nonspesifik klinik semptom ve bulgular nedeniyle oldukça zordur. Ayrıca sıklıkla negatif sonuçlanan ya da geç pozitifleşen kan kültürü gibi geleneksel yöntemler hastalığın tanısında çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle invaziv *Candida* enfeksiyonlarının hızlı tanısına yönelik birkaç serolojik test geliştirilmiştir. Kültür dışı tanı testleri içinde en ilgi çeken konak yanıtını ölçen testlerdir. Çünkü uygulaması kolaydır ve örnek eldesi için invaziv işlemler gerekmez. Ancak bu yöntemler invaziv kandidiyaz için nadiren kullanılırlar. Çünkü enfekte olmayan hastalarda kolonizasyona bağlı yanıtlar, immün düşkün hastalarda yetersiz antikor yanıtı gibi nedenlerle antikor tarama testlerinin performansı düşüktür (78, 79). Ancak moleküler biyolojik tekniklerle geliştirilen rekombinant antijenlerin bu sorunları çözebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (79).

Mannan, *Candida* hücre duvarında bulunan üç önemli polisakkarit bileşeninden (beta gluklan, kitin, mannan) biridir. Enfeksiyon sırasında dolaşıma geçer ve serolojik yanıtı oluşturan en önemli *Candida* antijenidir (80). Kanda mannan antijenlerini tespit etmek üzere çeşitli ticari testler geliştirilmiştir. Ancak mannan kandan hızla uzaklaştırıldığı için, özellikle tek serum örneği ile testin duyarlılığı azalmaktadır (81). Bu nedenle testin duyarlılığını arttırmak için

hastalardan sık kan örneği alınması gerekmektedir. Yüksek riskli hastalarda antikor testleri ile birlikte yapıldığında duyarlılık ve özgüllüğün tek başına yapıldığından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (82). Ancak *Candida* mannan antijeninin serumda yarı ömrünün kısa olması, enfeksiyonun ancak geç evrelerinde saptanabilmesi gibi dezavantajları nedeni ile testin yararı sınırlıdır. Antijen tespiti invaziv mikozlu hastaların tanısı ve takibinde önemli bir araç olmakla birlikte sonuçlar konak risk faktörleri, klinik semptom ve bulguları ve radyolojik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir.

“*Horseshoe crab*”, 1,3- β -D-glukanlar (BG) koagülasyon kaskadının faktör G’si (serin proteaz zimojen) ile reaksiyona giren bir fungal hücre duvarı bileşenidir ve bu reaksiyondan yola çıkılarak geliştirilmiştir (83). BG panfungal bir testtir ve türler arasında ayırım yapamamaktadır. Aspergillozis, fusariyozis, kandidiyaz ve trikosporoz gibi invaziv fungal enfeksiyonların tanısında kullanılabildiği ve enfeksiyonu klinik tanıdan ortalama 10 gün önce yüksek bir duyarlılık (%97) ve özgüllükle (%93) saptadığı bildirilmektedir (84).

2.4.8. Fungal Metabolitlerin Saptanması

Enfekte konağın vücut sıvılarında bulunabilen mikrobiyal metabolitlerin saptanması enfeksiyon hastalıklarının tanısında bir başka yaklaşım olabilir. D-arabinitol (DA) *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* tarafından kültürde büyük miktarlarda üretilirken; *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*’ta gösterilememiştir (85). DA ve L-arabinitol (LA) normal insan serumunda endojen olarak bulunmakla birlikte serum DA konsantrasyonu ve DA/kreatin ve idrar DA/LA oranları invaziv *Candida* enfeksiyonlarında, enfekte olmayan ya da kolonize bireylerdekinden daha yüksek bulunmuştur, ancak bunu duyarlı bir şekilde saptayacak herhangi bir ticari sistem bulunmamaktadır (86).

2.4.9. Spesifik Nükleik Asitlerin Saptanması

Fungal enfeksiyonların artan sıklığı ve tanısındaki yetersizlik, dikkatleri invaziv fungal enfeksiyonların moleküler yöntemler kullanılarak hızlı ve etkili tanısına çevirmiştir. Panfungal ve fungus özgül polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri invaziv fungal enfeksiyonların tanısında değerlendirilmiş ve ümit verici

sonuçlar alınmış olmakla birlikte, henüz standardize edilememiş ve ticari olarak geliştirilmiş bir moleküler tanı sistemi bulunmamaktadır (87, 88). DNA tespitine dayalı yöntemlerin rutin laboratuvara adaptasyonu öncesinde fungal DNA eldesi için en uygun ekstraksiyon yöntemi, uygun DNA hedefi ve uygun moleküler yöntem belirlenmiş olmalıdır.

Fungal DNA elde edilmesinde altı farklı yöntemin değerlendirildiği bir çalışmada *C. albicans* için hücre duvarının enzimatik lizisi, *A. fumigatus* için ise mekanik ajitasyon en iyi sonucu vermiş ve tüm mantar türleri için uygun tek bir ekstraksiyon yöntemi bulunmadığı sonucuna varılmıştır (89, 90). Son zamanlarda Whatman FTA mikrokart teknolojisi ile fungal kültürlerden (hem küf hem de maya) DNA ekstraksiyonunun daha etkili, daha pratik ve daha kısa sürede yapılabildiği bildirilmekle birlikte klinik örneklerden fungal DNA elde edilmesinde kullanıldığına dair çalışmaya ulaşılamamıştır (91).

Hedef olarak genellikle DNA tercih edilir, çünkü RNA ile karşılaştırıldığında nispeten daha stabil ve ekstraksiyonu daha kolaydır. Son yıllarda ribozomal DNA gen bölgesi (18S geni, 5.8S geni, 28S geni ve internal transcribed spacer 1 ve 2 bölgeleri) ümit veren bir hedef olarak görülmektedir (92). Fungal enfeksiyonların tanınmasında tüm fungal türler arasında büyük oranda korunmuş sekanslar kullanılabilirken, değişken sekanslar tür identifikasyonu için önerilmektedir. İnvaziv kandidiyaz tanısında iki antijen saptama yöntemi ile moleküler yöntemlerin performansı karşılaştırıldığında, özgüllükler her üç test için de oldukça yüksek ($\geq 97\%$) olduğu halde, *Candida* PCR her iki antijen testinden de daha duyarlı (95%) bulunmuştur (93).

Genellikle yüksek performans bildiren yayınlara rağmen, invaziv fungal enfeksiyonların tanısında moleküler yöntemler klinik kullanıma girememiştir. Ayrıca bu enfeksiyonların erken tanısında kültür yöntemleri üzerine tatmin edici bir üstünlüğü de gözlenmemiştir. Moleküler tanı yöntemleri kolonize ve enfekte bireyleri ayıramadığı gibi, yanlış pozitif sonuçlar invaziv kandidiyaz için 31% ve invaziv aspergilloz için $8-38\%$ olarak bildirilmektedir (85).

2.4.10. Peptit Nükleik Asit Floresan *in situ* Hibridizasyon (PNA-FISH)

PNA molekülleri DNA benzeri yapılardır. Ancak DNA'daki negatif yüklü şeker-fosfat omurgası yerine N-(2-aminoetil) glisin tekrarları içeren yüksüz polyamid veya peptid omurga yerleştirilmiştir. PNA probları DNA ile aynı nükleotid bazlarını içerir. Bazlar omurgaya metilen karbonil bağlarla bağlanır (94).

PNA problemlerin DNA veya RNA problemlere oranla birçok avantajı vardır; i) PNA'nın yüksüz omurgası geleneksel DNA problemlere oranla daha yüksek özgüllükte ve daha hızlı hibridizasyon yapabilmesine olanak sağlar, ii) göreceli olarak daha hidrofobik karakterde olması hücre morfolojisini bozmadan hücre duvarından geçebilmesini sağlar, iii) DNA problemlere göre daha yüksek duyarlılık ve daha parlak floresan elde edilir, iv) nükleaz ve proteazlara daha dayanıklıdır (94).

PNA-FISH yönteminin diğer identifikasyon yöntemlerine göre avantajları ise; i) pozitif kan kültürü sinyali alındıktan sonra 90 dakika içerisinde kullanılan kite göre üreyen mayanın türünü tespit edebilir. Oysa ki geleneksel kültür yöntemlerinde bu süre günler alabilir, ii) non-*albicans* türlerin kan kültürlerinde üreme insidansının artmasıyla ampirik tedavide ekinokandinler flukonazole birlikte yer almaya başlamıştır, ancak ekinokandinlerin yüksek maliyeti ve *C. albicans* suşlarının birçoğunun hala flukonazole duyarlı olması gereksiz ekinokandin kullanımını ve dolayısıyla tedavi maliyetini düşürebilir, iii) tanımlama süresini kısaltarak klinisyenin doğru ve etkin tedaviye daha önce başlamasıyla hastaların morbidite ve mortalite oranlarını düşürebilir ve hastanede yatış sürelerini kısaltabilir (94-96).

2.5. Antifungal Duyarlılık Testleri

Son 20 yıl içinde konak faktörlerinde, enfeksiyon nedeni olan mantar spektrumunda ve kullanılan antifungallerde dikkat çekici değişiklikler meydana gelmiştir; i) belirgin immünsüpresyonu olan hasta sayısındaki artış ile birlikte bu hastaları etkileyen invaziv fungal enfeksiyonların sıklığı ve mortalitesinde artış, ii) yeni antifungal ilaçların geliştirilmesi, iii) antifungal direncin ortaya çıkması. Bu nedenle iyi bir klinik sonuç elde etmek için standart *in vitro* antifungal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır (97).

Şu anda mevcut olan referans yöntemler, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) tarafından maya (CLSI M27-A3) (98) ve küfler (CLSI M38-A2)

(99) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, maya (CLSI M44-A) (100) ve küfler (CLSI M51-A) (101) için geliştirilen disk difüzyon yöntemi ile *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) tarafından maya (EUCAST EDef 7.2) (102) ve küfler (EUCAST EDef 9.2) (103) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemleridir. Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin uygulaması oldukça zahmetlidir ve sonuçlar uzun sürede (genellikle 48 saat) alınabilir. Ayrıca bazı *Candida* türleri ve azoller için MİK sonuçlarının okunması sıkıntılıdır. Bu nedenle antifungal duyarlılık testleri ile ilgili çalışmalar daha hızlı ve/veya pratik yöntem arayışlarına ve bu alandaki çalışmalara odaklanmıştır.

Ticari olarak geliştirilen gradient testler (epsilometer test; Etest) (AB Biodisk, Liofilchem) ve Sensititre Yeast One (TREK Diagnostic Systems) gibi sistemler ile genelde iyi düzeyde uyum oranları elde edildiği bildirilmektedir (104). Tetrazolyum tuzunun (XTT) indirgenmesi esasına dayanan ve bir kolorimetrik metabolik test olan XTT testi ise henüz araştırma aşamasındadır. Flow sitometre ve ergosterol miktarının tayini, antifungal ilaçlara duyarlılığın belirlenmesi için araştırılan diğer yöntemlerdir ve bu testlerle saatler içerisinde, referans yöntemler ile genellikle iyi düzeyde uyum gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, özel donanım gerektirmesi nedeniyle, yaygın kullanımı olası gözükmemektedir (105).

2.5.1. Broth Testleri

Mayalar için uygun şekilde tasarlanmış ve standardize edilmiş ilk antifungal duyarlılık yöntemi CLSI tarafından geliştirilen bir broth makrodilüsyon testidir. Ancak çok sayıda izolatin test edilmesi için pratik olmadığından, daha sonra geliştirilen mikropleyt ile mikrodilüsyon formatı daha çok kabul görmüştür.

CLSI bu yöntemlerde, besiyeri olarak MOPS [*3-(N-morpholino) propansulfonic acid*] ile tamponlanmış RPMI 1640 broth, spektrofotometrik olarak hazırlanmış $0.5-2.5 \times 10^3$ CFU/ml son konsantrasyonda maya süspansiyonu ve 35°C'de 48 saatlik inkübasyon süresi önermektedir. Sonuçlar görsel olarak değerlendirilir; 48 saatte AMB için üremenin tamamen inhibe edildiği ilk kuyucuk, azol antifungaller için ise üremede %80'lik (makrodilüsyon) ya da en azından %50'lik (mikrodilüsyon) azalmanın gözlemlendiği ilk kuyucuk, ekinokandinler için de

24 saatte en azından %50'lik azalmanın gözlemlendiği ilk kuyucuk MİK değeri olarak tanımlanmaktadır (106).

2.5.2. Gradient test (Epsilometer Test; Etest)

Azalan dilüsyonlarda antifungal ajanın emdirildiği plastik veya kağıt bir stripin, test edilecek mikroorganizmanın yayıldığı agar plağı yüzeyine yerleştirilmesi ve antifungalın besiyerine diffüze olmasına dayanan bir testtir. Sonuçlar genellikle 48 saatlik inkübasyonun ardından değerlendirilir. Agar yüzeyinde üreme inhibisyon zonu ile antifungal emdirilmiş şeritin kesiştiği noktadan MİK saptanabilir. Hem küf hem de mayalar için kullanışlı bir yöntemdir. Güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksek ve referans mikrodilüsyon testleri ile de uyumlu bulunmuştur (106, 107). AMB, FLU, itrakonazol (IT), flusitozin (FC), vorikonazol (VOR), posakonazol (POS), CAS ve anidulafungin (AND) için Etest stripleri ticari olarak bulunmaktadır. En önemli avantajı uygulama kolaylığı ve Etest için kullanılan besiyerinden etkilenmemesidir. Sıklıkla kullanılan besiyeri %2 glukoz içeren RPMI 1640 agardır (106).

2.5.3. Disk Difüzyon Testi

FLU ve VOR gibi suda çözünebilen antifungal ajanlar için oldukça kullanışlı ve basit bir yöntemdir ve CLSI tarafından *Candida* türlerinin bazı antifungallere duyarlılığını değerlendirmek için standardize edilmiştir (100). FLU, VOR ve CAS için *breakpoint* değerleri de mevcuttur (106). Yöntem bakteriler için yaygın olarak kullanılan Kirby-Bauer disk difüzyon testine benzer ve test besiyeri olarak glukoz ve metilen mavisi eklenmiş Mueller-Hinton agar önerilmektedir (105, 106, 108). Test için, 0.5 McFarland bulanıklıkta maya süspansiyonu ve 35°C'de 24 saatlik bir inkübasyon süresi önerilmektedir. Sonuçlar görsel olarak üremenin kalıcı olarak inhibe edildiği zon çapı ölçülerek değerlendirilir (106). Testin üstünlüğü, kolay yapılması ve nispeten daha kısa sürede (18-24 saat) sonuç alınabilmesidir.

2.5.4. Time-kill Testi

Time-kill testleri aktivitenin hızı ve genişliği, farmakodinamik özellikleri (konsantrasyon ve etki arasındaki ilişki, PAFE), kombinasyon çalışmalarında ilaçlar

arasındaki sinerji ve antagonizma hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (109). Bu yöntemde standart maya süspansiyonu antifungalın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılır ve belirli zaman aralıklarında besiyerine pasaj yapılır. Her zaman aralığı için canlı kalan hücreler hesaplanabilir ve test edilen her ilaç konsantrasyonu için, ilacın zaman içinde izolat üzerine etkisini gösteren öldürme-zaman eğrisi ve PAFE eğrisi elde edilebilir.

Test besiyeri olarak RPMI 1640 medium, $1-5 \times 10^5$ CFU/ml yoğunlukta maya süspansiyonu, çalkalamalı inkübatör ve başlangıç inokülümüne göre $\geq 99.9\%$ ya da $3-\log_{10}$ 'luk azalma kriteri test parametreleri olarak kullanılmaktadır (105). Çeşitli antifungal ajanlarla mayalara karşı çalışılmıştır ve *Candida* spp. için standardizasyonun mümkün olduğu düşünülmektedir. Ancak *Aspergillus* spp. gibi filamentöz mantarlar için homojen olmayan bir üreme özelliği gösterdikleri ve koloni değerlendirmesi zor olduğu için sınırlı sayıda çalışma mevcuttur ve ileri değerlendirme gereklidir (105).

2.5.5. Otomatize Antifungal Duyarlılık Yöntemleri

CLSI M27 standartlarına uygun broth mikrodilüsyon panelleri günümüzde ticari olarak mevcuttur. FDA, FLU için Sensititre YeastOne colorimetric plate (TREK Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH) ve VITEK 2 yeast susceptibility test (bioMerieux, Inc., Marcy l'Etoile, France) sistemini onaylamıştır. Sensititre YeastOne sistemi aynı zamanda IT ve FC için onay almıştır (110).

Sensititre YeastOne Kolorimetrik Panel

YeastOne paneli 96 kuyucuklu, kolorimetrik üreme indikatörü olarak alamarBlue kullanan bir sistemdir. Birçok ülkede doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından iyi sonuçları olan bir testtir (111, 112). Broth inokulum süspansiyonunun eklenmesinin ardından 24 saatlik inkübasyon sonrasında kolorimetrik MİK sonuçları okunacak hale gelir. İlk kuyucuktaki renk kırmızı ise üreme olduğu, mor ise üreme inhibisyonu, mavi ise üreme olmadığı anlamına gelir. Test; FLU, IT ve FC'ye ek olarak AMB, genişlemiş spektrumlu triazol (POS, ravukonazol ve VOR) ile ekinokandinleri (AND, CAS ve mikafungin) için de kullanılabilir. Çok merkezli bir çalışmada CLSI referans metodu olan *broth* mikrodilüsyon yöntemi ile uyumunun (\pm

2 katlık dilüsyon) triazoller için %95.4, ekinokandinler için de %100 olduğu belirlenmiştir (113, 114). Sistemin diğer avantajı ise tüm antifungal ajan sınıflarında (polyenler, FC, triazoller ve ekinokandinler) 24 saat içerisinde sonuç vermesidir.

VITEK 2 Maya Duyarlılık Testi

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları açısından antifungal duyarlılık testleri için spektrofotometrik yaklaşım uygun bir durum olarak görülmekte (115, 116) ve EUCAST'ın ayrılmaz bir parçası olarak karşımıza çıkmaktadır (117, 118). Son zamanlara kadar spektrofotometri, ticari testler içinde yer almıyordu ve laboratuvarları manuel teknikleri kullanmaya zorluyordu (105, 107, 119, 120). Ancak bioMérieux (Hazelwood, MO) tarafından piyasaya sürülen spektrofotometrik VITEK 2 sistemi sayesinde *Candida* spp. için AMB, FLU, FC ve VOR gibi antifungalleri tam otomatize bir şekilde çalışma fırsatı ortaya çıktı (121). Tam otomatize bu sistem sayesinde, duyarlılık testindeki tüm parametrelerde (inokulum hazırlanması, inkübasyonun süresi ve sıcaklığı ile MİK değerini saptama) standardizasyon sağladı (122). Yapılan çalışmalarda VITEK 2 sisteminin *Candida* spp. için CLSI referans metodu ile esansiyel uyumunun (EU) ve kategorik uyumunun (KU) (AMB, FLU, FC ve VOR) %95'in üzerinde olduğunu gösterildi (121, 123, 124). Bu sistem antifungal duyarlılık testleri için otomatize ilk sistem olması ve testi standardize etmesi yönüyle önem taşır. Ek olarak bu işlemi 12-15 saat gibi bir sürede yapabilmektedir (123, 124).

2.6. Antifungal Ajanlar

2.6.1. Azoller

Bu grup içerisinde imidazoller ve triazoller bulunur. Bu iki alt grubun kimyasal yapısı birbirinden farklıdır. İmidazol grubunun azol halkasında iki azot bulunurken; triazollerde üç azot bulunur. Genel olarak topikal tedavide kullanılan imidazol grubu içerisinde sadece ketokonazol sistemik etkiye sahipken; FLU, VOR, IT ve POS'tan oluşan triazol grubunun tamamının sistemik etkisi vardır (125-127).

Azol grubu, en yaygın kullanılan antifungal ajanlardır ve fungal sitokrom p450 bağımlı enzim 14-alfa-demetilazı inhibe ederek etki gösterir. Bu enzim

lanosterolün ergosterole dönüşümünü sağlar ve inhibisyonuyla fungal hücre membranı sentezi bozulur (126, 128).

FLU, 1990'da FDA tarafından onaylandığından beri kandidiyaz tedavisi için çok geniş çevrelerde kullanılmıştır ve mükemmel bir güvenlik profiline sahiptir. Bunun yanında intravenöz ve oral kullanımlar için uygun olmakla beraber maliyeti de düşüktür. Flukonazolün biyoyararlanımının iyi olması birçok hasta için oral kullanımına olanak sağlar (63).

VOR, MİK breakpoint değerlerinin bir log veya daha fazla düşük olmasıyla flukonazole göre daha üstün bir ilaçtır (129). Ancak FLU ve VOR arasında çapraz direnç başta *C. glabrata* olmak üzere sık görülür. VOR, *C. krusei* izolatlarında sitokrom p450 izoenzimine daha sıkı bağlanmasıyla flukonazole göre önemli ölçüde daha iyi *in vitro* aktivite gösterir (130).

POS sadece oral süspansiyon şeklinde kullanım için uygundur. Hematolojik maligniteli hastalarda kemoterapiye bağlı uzamış nötropeni durumlarında ve allojeneik kemik iliği transplantı hastalarında fungal enfeksiyonları önlemesi açısından profilaktik olarak kullanılır. Bunun yanında orofarengeal kandidiyazlı hastalarda da etkisi ispatlanmıştır ancak sistemik kandidiyazda kullanılmaz (63).

IT mukozal kandidiyazda kullanılır ama sistemik enfeksiyonlarda kullanılamaz (63).

2.6.2 Ekinokandinler

Ekinokandinler farklı bir yoldan etki gösteren yeni bir antifungal grubudur. Bilinen diğer antifungallerden farklı olarak 1,3-beta-D-glukan sentezini inhibe ederek etki gösteren yarı sentetik lipopeptidlerdir. Geniş bir antifungal etki spektrumuna sahip bu grup CAS, AND ve mikafunginden oluşur (131-133). Birçok *Candida* türüne mükemmel etkilidirler ve hem kandidemi hem de invaziv kandidiyazın çeşitli türlerine karşı kullanılabilir. *C. glabrata* ve *C. krusei* kandidemilerinde azollere tercih edilir (134).

Candida türlerine karşı geniş spektrumlu aktivitelerinden dolayı kandidemi ve invaziv kandidiyazlarda yoğun olarak kullanılır. Ekinokandinler için en yüksek MİK değerleri *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii*'de bulunmuştur. Direnç tüm

türlerde benzer mekanizmayla gerçekleşir ve ekinokandinler tarafından hedeflenen enzimde FKS 1 veya FKS 2’de mutasyon olmasını gerektirir (63).

2.6.3. Polyenler

AMB ve nistatin bu grupta yer alan antifungal ilaçlardır. Nistatin sadece topikal kullanılabilirken AMB sistemik mantar enfeksiyonlarında da etkilidir (126).

AMB, fungisidal etkisini mantar hücre duvarında bulunan başlıca sterol olan ergosterole bağlanarak gösterir. Bu bağlanma, membranın ozmotik bütünlüğünü bozar ve ardından bu olay intraselüler potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerin hücre dışına kaçışı ve mantar hücresinin ölümü ile sonuçlanır.

Ticari olarak bulunan parenteral formülasyonu AMB deoksikolattır (135). Sistemik enfeksiyonlarda etkili bir antifungal olmasına rağmen terapötik aralığının dar oluşu ve oldukça nefrotoksik olması sebebiyle AMB lipit kompleks, AMB koloidal dispersiyon ve lipozomal AMB gibi lipit formülasyonları geliştirilmiştir. lipit formları piyasaya çıkmıştır. Bu formülasyonlar yan etki açısından geleneksel AMB’ye göre daha güvenilir ilaçlardır (38, 125, 127, 135).

2.7. Antifungal Duyarlılık Paternleri

Candida’lar için duyarlılık testleri artık daha kolay ve daha geniş alanlarda yapılmaya başlanmıştır. İnvaziv kandidiyazlı hastalarda en önemli parametre suşun flukonazole olan direnç profilidir. Öyle ki bazı laboratuvarlar sadece *C. glabrata* için flukonazole antifungal duyarlılık testi uygulamaktadır (63). *C. glabrata* suşlarında flukonazolün yanında VOR için de direnç oranının arttığı saptanmıştır. Genel duyarlılık paternleri tablo 2.1.’de gösterilmiştir.

C. albicans suşları arasında direnç oranı çok azdır. Sekiz yıllık bir çalışmada 1997-2005 arasında 40 ülkede toplanan 90,000 *C. albicans* izolatu üzerinde yapılan duyarlılık çalışmasında sadece %1,5 oranında FLU direnci gözlenmiştir (136). Nadir vakalar ve FLU dirençli *C. albicans* mukozal enfeksiyonlu hastaları içeren küçük seriler üçüncü basamak hastanelerde rapor edilmiştir ve bunların da çoğunun kronik FLU profilaksisi alan immünsüprese hastalarda görüldüğü ortaya çıkarılmıştır (137, 138). Direnç rapor edilmesine karşın çoğu *C. albicans* izolatu ekinokandinlere duyarlıdır (133, 134). Çok büyük çoğunluğu ise AMB’ye duyarlıdır (63).

C. parapsilosis ise çoğu antifungale duyarlı olmakla birlikte ekinokandinler için MİK breakpoint değeri diğer *Candida* türlerine oranla daha yüksektir (141). Ancak bu verinin klinik anlamı net değildir. İnvaziv kandidiyazda CAS etkinliğini değerlendiren bir çalışmada *C. parapsilosis* kandidemili hastalarda AMB ile CAS klinik yanıtı aynı çıkmıştır (142). Ayrıca başka bir çalışmada da tedavide CAS kullanılan hastalarda klinik ve mikrobiyolojik başarı ortalamasının *C. parapsilosis*'te (%74) diğer *Candida* türleriyle benzer olduğu bulunmuştur (143).

Tablo 2.1. Yaygın *Candida* spp. için genel duyarlılık paterni-Pappas ve ark. (17)'ndan alınmıştır.

İzolat	FLU	IT	VOR	POS	FC	AMB	Ekinokandinler
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S/R*
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	S-DD/R	S-DD/R	S/R	S/R	S	S/I	S/R*
<i>C. krusei</i>	R	S-DD/R	S	S	I/R	S/I	S
<i>C. lusitaniae</i>	S	S	S	S	S	S/R	S

S: Duyarlı; I: Orta derecede duyarlı; R: Dirençli; S-DD: Doza bağlı duyarlı.

* Ekinokandin direnci *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* suşları arasında yaygın değildir.

Uluslararası bir sürveyans çalışmasında 2001-2005 yılları arasında 9371 *C. parapsilosis* izolatu toplanmıştır. Afrika ve Orta Doğu dışındaki tüm coğrafi bölgelerde FLU için %91-96, VOR için %95-98 arası duyarlılık sonuçları bulunmuştur. Bu iki bölge için ise %79 ve %86'lık FLU ve VOR duyarlılığı bildirilmiştir. FLU duyarlılığı en az olan suşların ise yoğun bakım ünitelerinden alınan örneklerden izole edildiği belirtilmiştir (%86) (144).

C. tropicalis genel olarak azollere, AMB'ye ve ekinokandinlere duyarlıdır. Ancak hematolojik maligniteli hastaların kan kültürlerinden izole edilen *C. tropicalis* izolatlarında kaspofungin direnci bildirilmiştir (140, 145, 146).

Birçok *C. glabrata* izolatu azollere dirençlidir. Direncin sebebi çoğu suşta ilaç *efflux* pompalarındaki değişimdir (17, 141). Ancak bu tip bir direnç yüksek dozda

FLU kullanımını ile aşılabılır. Azollere çapraz direnç *C. glabrata* izolatlarında sık görülür. *C. glabrata Candida* türleri arasında VOR için en yüksek MİK breakpoint değeri elde edilen türdür. Flukonazole dirençli izolatlar genelde vorikonazole de dirençlidir (147, 148). ABD’de 2006-2010 yılları arasında yapılan bir sörveyans çalışmasında kan kültürlerinden 1669 tane *C. glabrata* izolatu elde edilmiş; 162 tanesi (%9.7) flukonazole dirençli olarak bulunmuştur. Bu 162 suşun ise %98.8’i vorikonazole, %9.3’ü anidulafungine, %9.3’ü kaspofungine ve %8’i de mikafungine dirençli olarak bildirilmiştir (148).

Dirençli izolatların bildirilmesine karşın ekinokandinlerin *C. glabrata* üzerinde yüz güldüren etkisi ise hala devam etmektedir (149, 150). Ancak unutulmamalıdır ki özellikle FLU ve VOR dirençli suşlarda ekinokandin direnci de artmaya başlamıştır. Bu direnç profili FKS1 ve FKS2 genlerindeki mutasyona bağılı olarak ortaya çıkabilir. Önceki çalışmada (148) bahsedilen ve FLU dirençli bulunan 162 izolatuın 18’inde (%11.1) bu gen mutasyonunun, ekinokandinlerin bir veya daha çoğına direnç kazanılmasında rol oynadığı bildirilmiştir.

ABD’de yapılan 10 yıllık bir çalışmada kan kültüründe üreyen *C. glabrata* izolatlarındaki ekinokandin direnci 2001 yılında %4.9 iken 2010’da %12.3’e yükselmiştir (151). Bu direnç yukarıda da bahsedildiğı gibi FKS mutasyonunun varlığıyla ilişkilendirilmiştir. Bunun sebebi olarak da duyarlı suşlarda herhangi bir mutasyona rastlanmaması olduğı belirtilmiştir. Yapılan analizlere göre var olan bu ekinokandin direncinin önceki ekinokandin kullanımıyla ilişkili olduğı bildirilmiştir.

C. krusei değışmiş bir sitokrom p450 izoenzimi nedeniyle flukonazole intrensek dirence sahiptir (152). Ancak bu direnç yüksek dozda FLU kullanımıyla aşılabilir. Vorikonazolün farkı ise flukonazole göre sitokrom p450 izoenzimine daha etkin bir biçimde bağlanmasıdır. Böylece VOR daha yüksek duyarlılık oranlarına sahiptir (153).

VOR direnç insidansında coğrafi farklılıklar da rol oynar. Uluslararası bir sörveyans çalışmasında kandidemiye sebep olan 3500’e yakın *C. krusei* izolatu toplanmış, bunların ortalama %83’ünün vorikonazole duyarlı olduğı bildirilmiştir. Ancak bu oranın Latin Amerika’da %75’e düşerken, Kuzey Amerika’da ise %92’ye kadar çıktığı gösterilmiştir (154). *C. krusei* izolatları posakonazole ise genellikle duyarlıdır (155).

Yukarıda bahsedilen geniş srveyans çalışmasında tüm *C. krusei* izolatları ekinokandinlere duyarlı olarak bildirilmelerine rağmen (154), ekinokandin direncinin rapor edildiği nadir vakalar da literatürde gösterilmiştir (156, 157).

C. krusei AMB için ise azalmış duyarlılık gösterir ve bu durum da tedavi için yüksek dozlara çıkılmasını gerektirir (63).

2.8. Antifungal Tedavi

Kandidemi tedavisinde en çok kullanılan antifungal ajanlar FLU ve ekinokandinlerdir. AMB formülasyonları toksisite riskinden dolayı daha az tercih edilmektedir. Hem ekinokandinler hem de FLU, AMB formülasyonlarına göre daha iyi tolere edilir (158).

Kandidemili bir hastada antifungal ilaç başlanacağı zaman bazı faktörler göz önünde bulundurulmalıdır; i) son zamanlardaki azol kullanımı, ii) klinik birimde ve hastanedeki *Candida* türlerinin prevalansı ve anlık antifungal duyarlılık bilgileri, iii) flukonazol dirençli *Candida* türleriyle bağlantılı komorbid durumlar (nötropeni), iv) başka sistemlerde herhangi bir enfeksiyon durumu, v) herhangi bir antifungal ajana intolerans hikayesi (17).

Klinik olarak stabil, daha önce azol tedavisi almamış non-nötropenik kandidemili hastalarda; eğer klinik birimde veya hastanede *C. krusei* ve *C. glabrata* izolatları nadir izole ediliyorsa (<%15 tüm kandidemi) başlangıç tedavisi olarak ekinokandinler yerine FLU nerilmektedir (17).

Genel durumu orta veya orta-kötü olan ve/veya *C. glabrata* ve *C. krusei* remesi açısından riski bulunan non-nötropenik hastalarda ise FLU yerine ekinokandinler tercih edilir. Ancak hlihazırda FLU alan ve *C. glabrata* remiş hastalarda klinik yanıt iyiye gidiyor, tekrarlayan kültürde üreme olmuyorsa FLU tedavisine devam edilebilir (17).

Ntropenik hastalarda ise kandidemi için uygun tedaviyi seçmekte bir çok önemli faktör vardır (17). Kandidemili çoğu nötropenik hasta bir ekinokandin veya AMB formülasyonu ile tedavi edilmelidir. Azoller bu popülasyonda tercih edilmemelidir. Ayrıca, nötropenik hastalarda daha önceden profilaktik azol almış olabilecekleri için *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi FLU dirençli *Candida* spp. Üreme riski yüksektir. Eğer AMB kullanılacaksa lipit formu tercih edilmelidir. FLU

kullanımı ise daha önceden azol profilaksisi almamış klinik olarak stabil hastalarla sınırlandırılabilir.

Kan kültürlerinde *C. parapsilosis* üreyen hastalarda ekinokandin yerine FLU kullanılmalıdır (17). Ekinokandin tedavisi almakta olan ve klinik yanıtı iyi olan hastalarda eğer takip kan kültürlerinde üreme yoksa ekinokandinle devam etmek seçenekler arasındadır.

Kandidemi sebebinin *C. glabrata* olduğu zamanlarda kullanılacak antifungal seçmek zordur (17). Çünkü birçok suş flukonazole dirençlidir. *C. glabrata* fungemisinde en koruyucu yaklaşım flukonazolden başka bir antifungal seçmektir. Ancak FLU kullanımının sonuçlarda değişiklik yaratmadığını ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur (14, 159, 160). Kanser hastalarında yapılan bir çalışma *C. glabrata* suşlarının *C. albicans*'a göre tedavi edilebilirliğinin daha az olduğunu ve bunun da ne başlangıç tedavisi ne de *Candida* türüyle alakalı olduğunu bildirmiştir (161). Ancak *in vitro* verilere dayanarak tedavide FLU kullanımından kaçınmak daha ihtiyatlı bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır.

C. krusei flukonazole intrinsek dirençli bir tür olduğu için herhangi bir şüphe varlığında FLU kullanımından kesinlikle kaçınılmalıdır.

Güvenlik profilinden dolayı *C. glabrata* ve *C. krusei* kandidemilerinde amfoterisin B'nin yerine genellikle ekinokandinler tercih edilir. Bu gibi durumlarda VOR tercihi de yapılabilir ama *C. glabrata* izolatlarında FLU ve VOR arasında çapraz direnç olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. *C. krusei*'de ise böyle bir durum söz konusu değildir (63).

C. glabrata ve *C. krusei*'nin sık izole edildiği klinik birimler veya hastanelerde (>%15 tüm kandidemi) etkenin türü belli olana kadar ampirik tedavide FLU yerine ekinokandin kullanımı önerilir. Ekinokandinler arasında ise etki bakımından belirgin bir fark yoktur ve herhangi birisinin kullanılmasında sakınca yoktur (63).

Birkaç çalışmada kan kültüründe üreyen *C. glabrata* suşlarında ekinokandin direncinin arttığı bildirilmiştir. Geçmişte ekinokandin kullanan ve ekinokandin profilaksisi altında kandidemi geliştiren hastalarda dirençten şüphelenilmelidir. Böyle durumlarda antifungal duyarlılık test sonuçları netleşene kadar AMB formülasyonu kullanılmalıdır (63).

C. krusei suşları genellikle ekinokandinler ve vorikonazole duyarlı ancak flukonazole tamamen dirençlidir. Bu izolatlar ayrıca AMB için de yüksek MİK breakpoint değerleri gösterebilir ve bu yüzden *C. krusei* enfeksiyonlarında yüksek dozlarda kullanılmalıdır. Burada da toksisite riski sebebiyle AMB deoksikolat yerine lipit AMB formülasyonları tercih edilmelidir (63).

Kandidemiler için uygun tedavi süresi ile ilgili kesin bir karar yoktur. Ancak 2009 yılında Infectious Diseases Society of America rehberlerinde kan kültürü negatifleştikten en az iki hafta sonrasına kadar tedavinin devam etmesi önerilmiştir (17). Tedavi başladıktan sonra günlük kan kültürleri alınmalı ve kültürün negatifleştiği teyit edilmelidir. Kan kültürlerinde pozitiflik hala devam ediyorsa metastatik bir odak aranmalıdır (17).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na gelen kan kültürü örneklerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 20 *Candida albicans*, 10 *Candida parapsilosis*, 10 *Candida tropicalis*, 10 *Candida glabrata* ve 10 *Candida krusei* izolatu çalışmaya alındı. Çalışmada kalite kontrol izolatu olarak ATCC 22019 *Candida parapsilosis* ve ATCC 6258 *Candida krusei* referans suşları kullanıldı.

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 06.12.2013 tarih ve 19 sayılı onayıyla yürütülmüştür.

3.1. İzolatların Tanımlanması

Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen suşlar tanımlanırken gram boyama, germ tüp testi (GTT), kromojenik besiyeri ve API 20C AUX (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) ile API 32C (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) test kitleri kullanıldı. Tanımlanan izolatlar çalışmaya alınana kadar -70°C'de, %20 gliserol içeren stok besiyerinde saklandı. Çalışma sırasında -70°C'den çıkarılan izolatlar oda sıcaklığına geldikten sonra kromojenik besiyerine pasajları yapıldı. Pasajlar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen maya kolonilerinin identifikasyonlarının doğrulanması sonrasında izolatlar çalışmaya alındı. Her çalışmadan önce kromojenik besiyeri üzerinde üreyen kolonilerden SDA (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) besiyerine taze pasaj yapıldı ve izolatlar buradan kullanıldı.

3.2. Kan Kültür Şişelerine İnokülasyon

İzolatlar çalışma öncesi kodlandı ve çalışma boyunca sadece bu kodlar kullanıldı. Çalışmanın kör olarak yürütülebilmesi amacıyla mantar süspansiyonlarının hazırlanması ve kan kültür şişelerinin inokülasyonu başka bir araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. Daha sonra yapılan identifikasyon ve duyarlılık testleri çalışan kişinin şişenin içeriğinden haberi olmadan uygulandı.

Primer süspansiyonlar, SDA besiyerinde üretilmiş maya kolonileri kullanılarak hazırlandı. Süspansiyondaki maya konsantrasyonu $1-5 \times 10^6$ CFU/ml olacak şekilde %0.85'lik steril NaCl içerisinde ayarlandı. 10 kat seri dilüsyonlar

yapılarak son maya süspansiyonundaki hücre sayısı 1000-5000, 100-500 ve 10-50 maya hücresi/ml olacak şekilde ayarlandı.

Bu çalışmada Plus Aerobic/F Medium, Peds Plus/F Medium ve Mycosis IC/F Culture Vial (BD Diagnostics, Sparks, MD) olmak üzere üç farklı kan kültür şişesi ve BACTEC 9240 kan kültür sistemi (BD Diagnostics, Sparks, MD) kullanıldı. Klinik örneklerden en sık izole edilen beş farklı *Candida* türü (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei*) ve kalite kontrol izolatu olarak da ATCC 22019 *C. parapsilosis* ve ATCC 6258 *C. krusei* kullanıldı.

Kan kültürlerinin simülasyonu amacıyla, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankası'ndan temin edilen ve herhangi bir antimikrobik kullanım öyküsü olmayan sağlıklı donörlerden alınmış "taze tam kan" numuneleri kullanıldı. Kan örnekleri, Plus Aerobic/F Medium ve Mycosis IC/F Culture Vial şişelerine 8 ml, Peds Plus/F Medium şişelerine ise 2 ml olacak şekilde inoküle edildi. Eş zamanlı olarak, her bir farklı konsantrasyon için farklı bir şişe olacak şekilde *Candida* spp. inokülasyonu da yapıldı. Sonuçta her bir izolat için toplam dokuz adet kan kültür şişesi kullanıldı.

Ekimi yapılan şişeler BACTEC 9240 kan kültür sistemine yerleştirildi ve inkübasyona bırakıldı. Şişeler pozitif sinyal verdiğiğinde çıkarıldı ve sinyal zamanı not edildi. Her bir şişedeki maya üremesi Gram boyama yöntemi ile doğrulandıktan sonra, her bir izolat için üreme tespit edilen bir şişe seçildi. Steril bir enjektör yardımı ile her şişeden bir miktar kan aspire edilerek tanımlama ve antifungal duyarlılık testlerine alındı.

3.3 Tanımlama Testleri

Üreyen mayaları tanımlamak için germ tüp testi, kromojenik besiyerine pasaj, API 20C AUX ticari kiti ile karbonhidrat asimilasyon testi ve PNA-FISH Yeast Traffic Light (AdvanDx, Woburn, MA) testleri yapıldı.

3.3.1. Germ Tüp Testi

Direkt

Kan kültürü şişesinden bir miktar kan aspire edilerek lam lamel arası incelendi ve germ tüp yapıları arandı.

İndirekt

Kan kültürü şişesinden 0.5 ml kan aspire edilerek 0.5 ml insan serumu içerisinde karıştırıldı ve 35°C'lik etüvde 2 saat inkübe edildi (162). İnkübasyondan sonra her süspansiyondan bir damla alındı ve lam lamel arası incelenerek germ tüp yapıları arandı.

3.3.2. Kromojenik Besiyerine Pasaj

Direkt

RTA (Gebze, Kocaeli, Türkiye) firmasından temin edilen ticari CHROMagar *Candida* besiyerleri kullanıldı.

Pozitif şişeden alınan bir damla kan besiyeri üzerine damlatılarak steril bir öze yardımı ile pasajı yapıldı. 35°C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda her izolatin kendine özgü renklenme özelliği sayesinde (*C. albicans* yeşil; *C. glabrata* pembe, küçük; *C. tropicalis* mavi; *C. krusei* pudralı, pembe, yayılan; diğerleri renksiz koloniler) tür tayini yapıldı.

Klasik

Pozitif kan kültür şişesinden SDA'ya yapılan ekim sonucu saf bir şekilde üreyen maya kolonilerinden steril öze yardımı ile CHROMagar *Candida* besiyerine pasaj yapıldı. Ekimi yapılan plaklar 35°C'lik etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra direkt yöntemde anlatıldığı şekilde değerlendirildi.

3.3.3. API 20C AUX Maya Tanımlama Sistemi

API 20C AUX (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) ticari kiti, 19 karbonhidrat asimilasyon testinin performansını gösterebilen ve dehidrate substratlar

içeren 20 kuyucuktan oluşur. Mayalar sadece karbon kaynağı olarak her bir substratı kullanma kapasitesine sahip olduklarında çoğalabilirler.

Stripin Hazırlanması

İnkübasyon kutusu içinde nemli bir atmosfer yaratmak için kabın peteklerine 5 ml distile su konuldu.

Stripin Ekimi (Klasik)

Üretici firma önerileri doğrultusunda, CHROMagar *Candida* besiyerinde üreyen ve renklenmeyen koloniler alınarak (beyaz, krem rengi) API Suspension Medium (2ml) içinde türbiditesi 2 McFarland'a eşdeğer bir süspansiyon hazırlandı. API C Medium (7ml) içine önceki süspansiyondan 100 µl boşaltıldı ve homojenize edildi. Oluşan bu yeni solüsyondan stripin kuyucuklarına 100'er µl dağıtıldı. Stripin kapağı kapatıldı ve 24-48 saat süreyle 30°C'de inkübe edildi.

Stripin Ekimi (Direkt)

Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden alınan 100 µl kan doğrudan API C Medium (7ml) içine boşaltıldı ve homojenize edildi. Bu solüsyondan stripin kuyucuklarına 100'er µl dağıtıldı. Stripin kapağı kapatıldı ve 24-48 saat süreyle 30°C'de inkübe edildi.

Stripin Değerlendirilmesi

Değerlendirme 24-48 saat sonra yapıldı. Buna göre 0 kuyucuğu kontrol kabul edilerek kontrolden bulanık olan kuyucuklar pozitif olarak değerlendirildi. Oluşturulan profil *apiweb* tanımlama yazılımına girilerek sonuçlar elde edildi.

3.3.4. PNA-FISH Yeast Traffic Light Tanı Kiti ile Tanımlama

Çalışmada PNA-FISH Yeast Traffic Light (AdvanDx, Woburn, MA) tanı kiti kullanıldı.

Yayma Hazırlanması ve Tespiti

Üreticinin talimatlarına göre lam üzerine bir damla fiksasyon solüsyonu damlatıldı ve kan kültür şişesinden alınan 10 µl kan ile karıştırıldıktan sonra 55°C sıcaklıktaki ısı bloğunda 20 dakika tespit edildi.

Hibridizasyon

Tespit edilen preparata bir damla Yeast Traffic Light PNA prob solüsyonundan damlatıldı. Üzerine bir lamel kapatıldı ve hava baloncuğu kalmaması için dikkatlice bastırıldı. Hazırlanan preparat 55°C sıcaklıktaki ısı bloğu üzerinde 30 dakika boyunca inkübe edildi.

Yıkama

Preparatlar daha önceden hazırlanmış ve 55°C'lik su banyosuna konulmuş 1/60 oranındaki yıkama solüsyonu içerisine alındı ve üzerindeki lameller dikkatlice uzaklaştırıldı. 30 dakika inkübasyondan sonra lamalar çıkarılarak kurumaya bırakıldı.

İnceleme

Kuruyan preparatlar immersiye yağ ile 100x objektifte özel filtre yardımı ile incelendi. Yeşil floresan veren maya hücreleri *C. albicans*/*C. parapsilosis*, kırmızı floresan veren maya hücreleri *C. glabrata*/*C. krusei* ve sarı floresan veren maya hücreleri ise *C. tropicalis* olarak değerlendirildi.

3.4. Antifungal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya alınan izolatlara Etest, mikrodilüsyon (MD) ve disk difüzyon (DD) yöntemleri ile antifungal duyarlılık testleri uygulandı. Bu testler her bir *Candida* suşu için hem direkt kan kültür şişesinden hem de klasik katı besiyeri pasajından yapıldı. Elde edilen sonuçlar her test için kendi içinde esansiyel ve kategorik uyumları açısından değerlendirildi. MİK değerleri ± 2 katlık dilüsyon arasındaysa esansiyel uyum açısından pozitif (uyumlu) olarak değerlendirildi. Elde edilen MİK değerlerine göre mikroorganizmalar duyarlı (S), doza bağlı duyarlı (S-DD) ve dirençli (R) olarak kategorilere ayrıldı. Aynı profilde olanlar kategorik açıdan uyumlu, farklı profilde olanlar ise uyumsuz olarak değerlendirildi.

3.4.1. RPMI 1640 Besiyeri (L-Glutaminli)

Besiyerinin İçeriği

RPMI 1640 medium 10,4 g/l (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

MOPS 34,53 g/l (Merck, Darmstadt, Germany)

D-Glukoz 20 g/l (Merck, Darmstadt, Germany)

Agar: 20 g/l (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

NaOH

Hazırlanışı (Katı)

Bin ml katı besiyeri için; 500 ml distile suda glukoz ve agar çözdürülerek otoklavlandı, kalan 500 ml distile su ile RPMI 1640 ve MOPS çözdürülerek filtrasyon yöntemi ile sterilize edildi. Otoklavlanan kısım 50°C'ye soğuduktan sonra her iki karışım birleştirilerek plaklara döküldü.

Hazırlanışı (Sıvı)

Bin ml distile su içerisinde RPMI 1640 medium, MOPS ve D-Glukoz çözdürüldü. pH 7.0 olana dek distile suda çözdürülen NaOH süspansiyonu eklendi. Filtrasyon yöntemi ile sterilize edildi, kullanılıncaya dek +4°C'de saklandı.

3.4.2. Metilen Mavili Mueller-Hinton Besiyeri

Besiyerinin İÇeriği

38 g/l Mueller-Hinton (MH) agar (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)

100 µl/l metilen mavisi

10 g/l D-Glukoz (Merck, Darmstadt, Germany)

Hazırlanışı

Dehidre besiyeri ve diğer malzemeler distile su içinde çözdürölüp, otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edildi ve steril petri kaplarına besiyeri kalınlığı yaklaşık 4 mm olacak şekilde dökölüdü.

3.4.3. Etest Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi

Klasik

Pozitif şişelerden yapılan pasajlarda üreyen 24 saatlik taze kültürlerden alınan yaklaşık 1 mm çaplı maya kolonileri 5 ml steril %0.85 NaCl içerisinde 15 saniye vortekslenerek iyice karıştırıldı ve bulanıklığı 0.5 McFarland’a ayarlandı. Hazırlanan bu süspanسیون steril bir eküvyon yardımıyla RPMI 1640 katı besiyeri içeren plaklara yayıldı. Oda ısısına getirilen Etest şeritleri steril pens yardımı ile 90 mm’lik petrilere iki, 150 mm’lik petrilere altı tane olacak şekilde yerleştirildi. Ardından 35°C’de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Plaklar 24 ve 48. saatler sonunda iki kere değerlendirilerek MİK değerleri kaydedildi (130).

Eliptik inhibisyon zonunun Etest şeridiyle kesiştiği nokta MİK (µg/ml) değeri olarak belirlendi. İnhibisyon zonları değerlendirilirken, üretici firma ve CLSI önerileri doğrultusunda AMB için üremenin tam inhibe olduğu (%100 inhibisyon) değeri, azoller ve ekinokandinler için ise üremenin %80 inhibe olduğu değeri, o ilaç için MİK değeri kabul edildi (104).

Direkt

Pozitif şişeden 2 ml kadar süspansiyon steril bir tüpe alındı ve buradan steril bir eküvyon ile RPMI 1640 katı besiyerlerine yayıldı. Kalan işlemler klasik yöntemdeki gibi uygulandı (163).

3.4.4. Broth Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi

Antifungal Ajanların Hazırlanması

Daha önceden hazırlanmış olan stok antifungal solüsyonlardan CLSI önerileri (98) doğrultusunda AMB, FLU, VOR, POS, CAS ve AND için tablo 3.1.'deki dilüsyonlar hazırlandı.

Her antifungal için ayrı bir spora ikiye sıra test tüpü yerleştirildi. AMB, VOR ve POS için 1600 µg/ml'lik stok solüsyondan; CAS ve AND için ise 800 µg/ml'lik stok solüsyondan ilk tüplerde DMSO ile 1/2'lik dilüsyonlar, ikinci tüplerde ise RPMI 1640 broth ile 1/50'lik dilüsyonlar yapılarak yukarıdaki konsantrasyonların iki katı elde edildi. FLU için ise 5120 µg/ml'lik stok solüsyondan RPMI 1640 broth kullanılarak birinci adımda 1/8 sonraki adımda 1/2 olmak üzere ilk tüplerde 1/2'lik dilüsyonlar, ikinci tüplerde 1/5'lik dilüsyonlar yapılarak son konsantrasyonların iki katı elde edildi (164).

Tablo 3.1. Antifungal ajanların mikrodilüsyon test konsantrasyonları

Antifungal ajanlar	Mikrodilüsyon test konsantrasyonları (µg/ml)										
AMB	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
FLU	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
VOR	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
POS	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
CAS	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	
AND	0.0156	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	

Maya Süspansiyonlarının Hazırlanması

Klasik

Pozitif şişelerden yapılan pasajlarda üreyen 24 saatlik taze kültürlerden alınan yaklaşık 1 mm çaplı maya kolonileri 5 ml steril %0.85 NaCl içerisinde 15 saniye vorteksenerek iyice karıştırıldı ve bulanıklığı 0.5 McFarland'a ayarlandı. Bu işlemle stok maya süspansiyonu her mililitrede $1-5 \times 10^6$ hücre içerdi. Çalışma süspansiyonunun iki katı elde edilmesi için stok maya süspansiyonu RPMI 1640 broth ile önce 1/50 ve ardından 1/20 oranlarında seyreltildi. Sonuçta $1-5 \times 10^3$ hücre/ml'lik maya süspansiyonları elde edildi.

Direkt

Pozitif şişeden aspire edilen 0.1 ml kan 5 ml RPMI 1640 sıvı besiyeri içerisinde karıştırılarak 1/50'lik dilüsyon elde edildi. Ardından bu solüsyondan 0.5 ml alınarak 9.5 ml RPMI 1640 sıvı besiyeri içerisinde 1/20'lik dilüsyon daha yapıldı ve sonuçta $1-5 \times 10^3$ hücre/ml'lik maya solüsyonları elde edildi. Koloni sayıları bu süspansiyondan SDA besiyerine yapılan pasajlarla doğrulandı.

İnokülasyon, İnkübasyon ve Değerlendirme

Broth mikrodilüsyon testi için steril, U tabanlı, 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanıldı. Mikropalaklar, antifungal isimleri ve dilüsyonları, suş numaraları ile işaretlendi. Steril plastik pipet uçları ve tek kanallı pipetörler kullanılarak, her bir sütuna bir ilaç konsantrasyonu olacak şekilde 100'er µl dağıtıldı. Ardından her bir sıraya bir suş gelecek şekilde mikroorganizmalar 100'er µl eklendi. Bu işlem sonucunda hem ilaç hem de maya konsantrasyonları 1/2 oranında seyreltilerek çalışma konsantrasyonuna ulaşıldı. Mikropalakların üzeri steril kapaklarla kapatıldı ve 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. AMB ve FLU için hem 24 hem de 48. saatlerde MİK değerleri saptandı. VOR ve POS için sadece 48, CAS ve AND için de sadece 24. saatte MİK değeri belirlendi. MİK değeri belirlenirken AMB için %100 inhibisyon kalan antifungaller için ise %50'lik inhibisyon esas alındı (98).

3.4.5. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıkların Belirlenmesi

Klasik

Yirmidört saatlik taze kültürlerden alınan yaklaşık 1 mm çaplı maya kolonileri 5 ml steril %0.85 NaCl içerisinde 15 saniye vorteksledi ve bulanıklığı 0.5 McFarland'a ayarlandı. Steril bir eküvyon yardımı ile metilen mavili MH besiyerleri içeren plaklara yayıldı. Ardından 25 µg FLU ile 1 µg VOR içeren diskler konuldu ve 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları cetvelle ölçülerek sonuçlar değerlendirildi (100).

Direkt

Pozitif şişeden alınan kan ile steril eküvyon çubuğu ıslatıldı ve metilen mavili MH besiyerleri içeren plaklara yayıldı. Kalan işlemler klasik yöntem ile aynı şekilde uygulandı.

3.4.6. Antifungal Duyarlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Etest ve MD yöntemleri için sonuçlar CLSI M27 S4 (164)'e göre değerlendirildi (Tablo 3.2.). CLSI rehberinde AMB için herhangi bir breakpoint değeri belirlemediği için, sonuçların karşılaştırılabilmesi amacıyla literatürde daha önce kullanılmış breakpoint değerleri esas alındı. Buna göre AMB MİK ≤ 1 µg/ml ise duyarlı; >1 µg/ml ise dirençli olarak kabul edildi (87).

Disk difüzyon sonuçları CLSI M44-A'ya (94) göre değerlendirildi. FLU ≥ 19 mm duyarlı (S), 15-18 mm doza bağlı duyarlı (S-DD), ≤ 14 mm dirençli (R) olarak kabul edildi. CLSI rehberinde VOR duyarlılığı için herhangi bir değer belirlenmediğinden literatürdeki (165) veriler ışığında VOR ≥ 17 mm duyarlı (S), 14-16 mm doza bağlı duyarlı (S-DD), ≤ 13 mm ise dirençli (R) olarak değerlendirildi.

Tablo 3.2. CLSI M27 S4'e göre türler ve antifungaller için MİK breakpoint sınır değerleri

Antifungal	Türler	MİK Aralıkları (µg/ml)		
		S	S-DD	R
FLU	<i>C. albicans</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. glabrata</i>	-	≤32	≥64
	<i>C. krusei</i>	-	-	-
VOR	<i>C. albicans</i>	≤0.12	0.25-0.5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0.12	0.25-0.5	≥1
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.12	0.25-0.5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	-	-	-
	<i>C. krusei</i>	≤0.5	1	≥2
CAS	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	≥0.5
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1
AND	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.12	0.25	≥0.5
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	≥1

3.4.7. İstatistik Yöntem

Elde edilen veriler, bilgisayar ortamında IBM SSPS (versiyon 20.0) İstatistik Paket Programında değerlendirildi. Çalışmanın bazı değişkenler ortalama değerleri ± standart sapma (±SD, minima ve maksima değerleri) ve ortanca %25'lik ve %75'lik çeyreklik değerleri ile verildi. Verilerin normal dağılıma uygunlukları N>30 olduğundan Kolmogorov-Smirnov Test ile ve grafiklerle kontrol edildi. Verinin

normal dağılım göstermediği görüldüğünden, gruplar arası farkın analizinde Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis analizleri kullanıldı. İstatistiki anlamlılık düzeyi olarak $p \leq 0.05$ kabul edildi. Kruskal-Wallis analiz yapılmış veride de Bonferroni düzeltmesi ile anlamlılık düzeyine karar verildi. Kruskal-Wallis analiz yapılan değişkenlerin karşılaştırılmasında anlamlılık düzeyi Bonferroni düzeltmesi ile grup sayısı 3 olduğu için $0.05/3=0.016$ olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla gruplar arasındaki farkın test edilmesi için kullanılan tek yönlü varyans analizinde anlamlılık düzeyi 0.016 olarak alınmıştır.

Yöntemler arası değerlendirmede duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değer (NPD) hesaplamasında aşağıdaki tanımlamalar esas alındı;

Duyarlılık; yöntemin gerçek pozitifler içinden pozitif ayırt edebilme yeteneğidir. Gerçek pozitiflerin, gerçek pozitif ve yalancı negatif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

Özgüllük; yöntemin gerçek negatifler içinden negatif ayırt edebilme yeteneğidir. Gerçek negatiflerin, gerçek negatif ve yalancı pozitif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

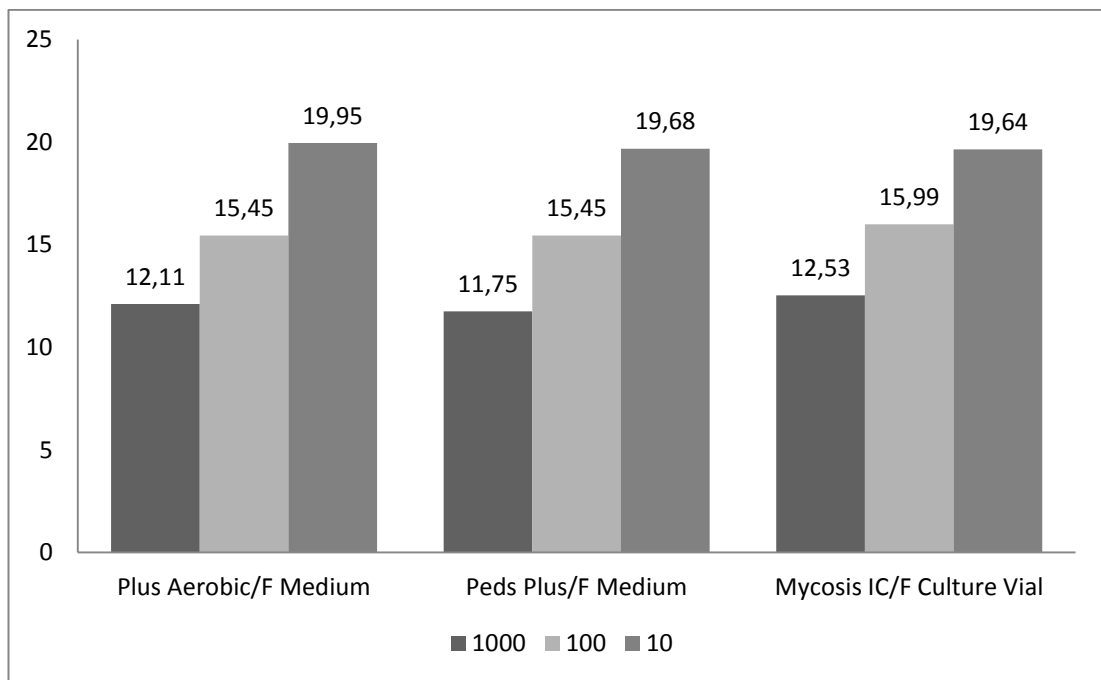
Pozitif prediktif değer; testin pozitif sonucu verdiği zaman, olgunun gerçekten pozitif olması durumunun koşullu olasılığının ölçüsüdür. Gerçek pozitiflerin, gerçek pozitif ve yalancı pozitif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

Negatif prediktif değer; testin negatif sonucu verdiği zaman, olgunun gerçekten negatif olması durumunun koşullu olasılığının ölçüsüdür. Gerçek negatiflerin, gerçek negatif ve yalancı negatif toplamına bölünüp yüzle çarpılmasıyla elde edildi.

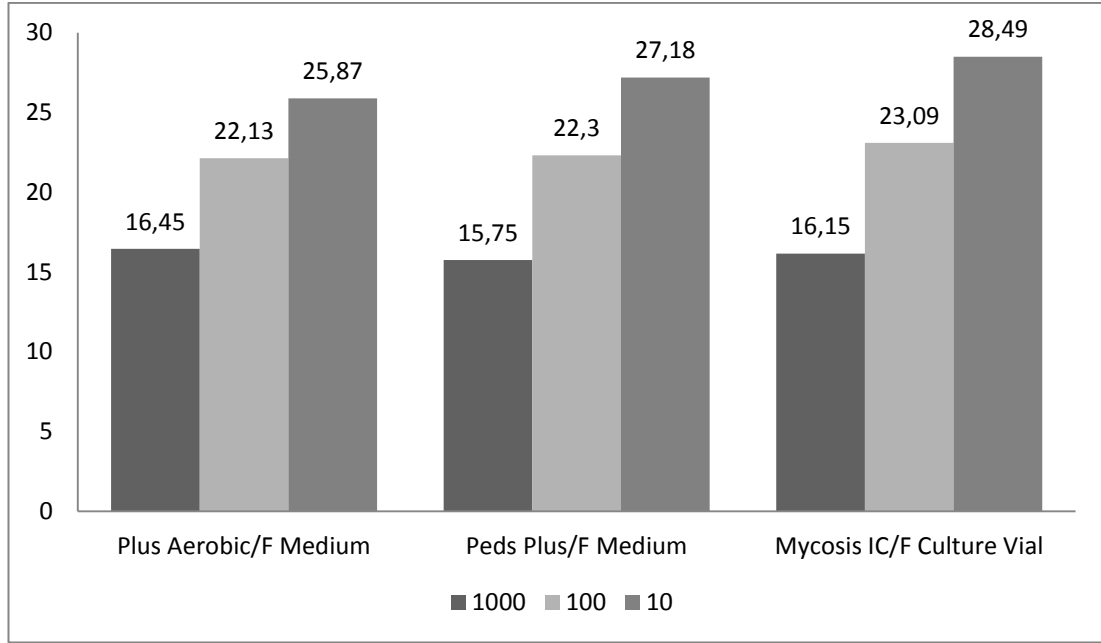
4. BULGULAR

Çalışma kapsamında kullanılan 62 izolatın üç farklı konsantrasyonda (10-50, 100-500, 1000-5000 hücre/şişe) ve üç farklı kan kültür şişesine (Plus Aerobic/F Medium, Bactec Peds Plus/F Medium ve Mycosis IC/F Culture Vial) inokülasyonu yapılmıştır. Buna göre izolatların konsantrasyon ve şişelere göre pozitif sinyal verme süreleri EK 1’de gösterilmiştir.

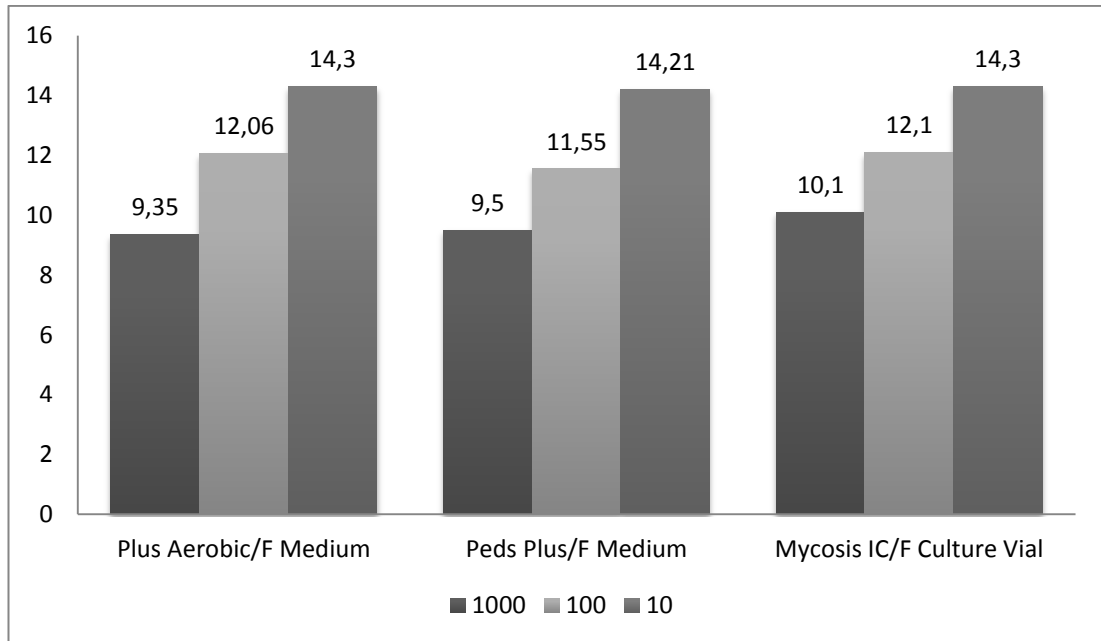
EK 1’e göre elde edilen veriler türlere özgü şekilde şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4. ve 4.5.’te özetlenmiştir.



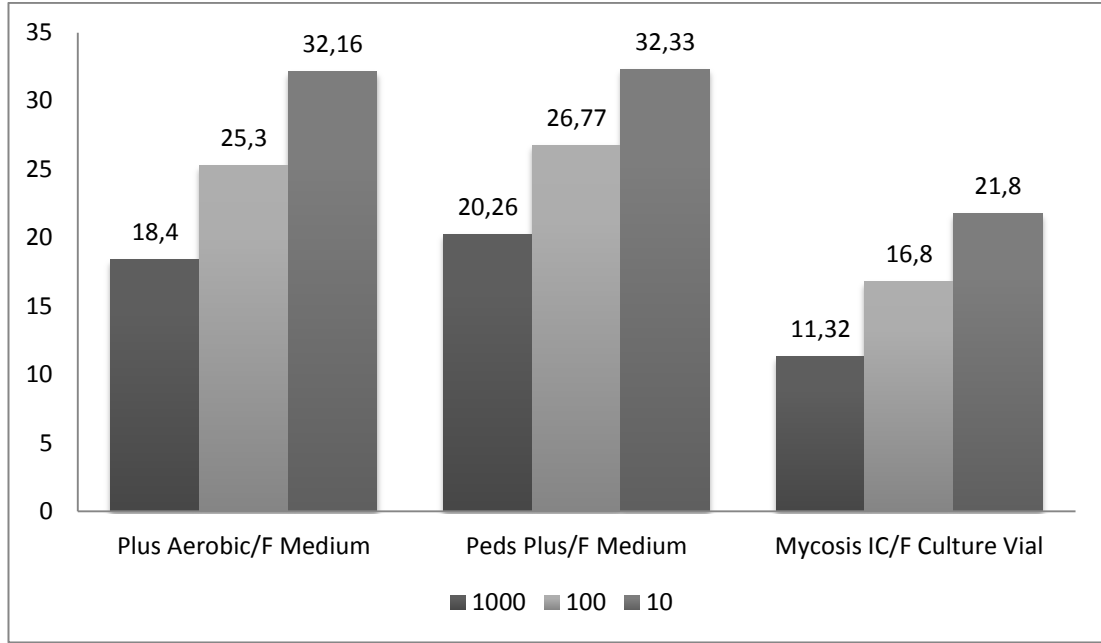
Şekil 4.1. *C. albicans* izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri



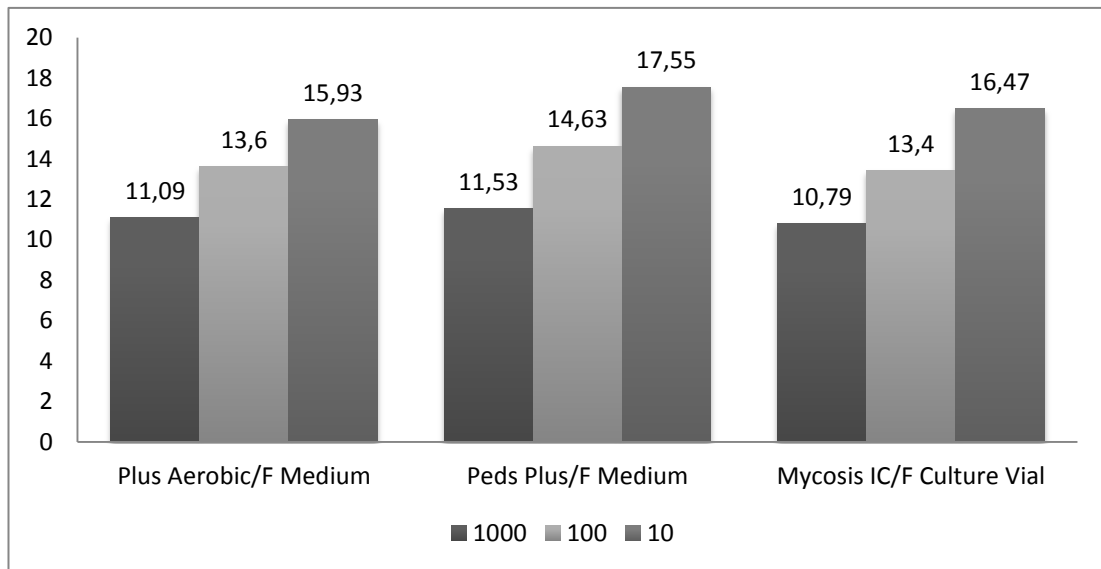
Şekil 4.2. *C. parapsilosis* izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri



Şekil 4.3. *C. tropicalis* izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri



Şekil 4.4. *C. glabrata* izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri



Şekil 4.5. *C. krusei* izolatlarının konsantrasyon ve şişelere göre ortalama sinyal süreleri

Elde ettiğimiz verilere göre pozitif sinyal süresinin şişe çeşidi, *Candida* türü ve şişedeki fungal yüke göre değişiklik gösterebildiği belirlendi.

Sinyal süresi açısından Plus Aerobic/F şişesi ile Peds Plus/F şişesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.857$). Plus Aerobic/F şişesi ile Mycosis IC/F şişesi arasında ise anlamlı bir fark olmasına rağmen Bonferroni düzeltmesi ile fark bulunamadı ($p=0.020$). Ancak Peds Plus/F şişesi ile Mycosis IC/F şişesi karşılaştırıldığında Mycosis IC/F şişesinin Peds Plus/F şişesinden anlamlı olarak pozitif sinyali daha kısa sürede tespit ettiği görüldü ($p=0.015$). Tablo 4.1.'de şişelerin sinyal sürelerinin istatistiksel analiz verileri gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Şişe türlerine göre sinyal süreleri

Şişe türü	Sinyal süresi (saat)		İstatistiksel analiz (Kruskal-Wallis)
	Ortalama±SD (min-max)	Ortanca (%25-%75)	
Plus Aerobic/F	17.28±6.36 (8.18-46.27)	15.57 (12.67-20.48)	p=0.023
Peds Plus/F	17.57±7.01 (8.53-45.22)	15.67 (12.91-21.00)	
Mycosis IC/F	16.07±6.81 (8.68-65.38)	14.68 (12.04-17.52)	

Şişeleri türlere göre değerlendirdiğimizde ise *C. glabrata* için Mycosis IC/F şişesinin Plus Aerobic/F şişesinden yaklaşık dokuz saat, Peds Plus/F şişesinden ise yaklaşık 10 saat daha erken sinyal verdiği saptandı ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0.001$, $p<0.001$). Plus Aerobic/F ve Peds Plus/F şişeleri arasında ise hem *C. glabrata* hem de diğer türler için anlamlı bir fark bulunamadı.

Tüm şişeler için türler arasında ortalama olarak en erken sinyali *C. tropicalis*, en geç sinyali ise *C. glabrata* izolatları verdi. *C. tropicalis*'in sinyal süresi diğer tüm izolatlara göre anlamı derecede kısa bulundu ($p<0.001$). *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'in uzun sinyal süresi diğer türlerle karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0.001$) bulunurken, kendi aralarında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.509$). Tablo 4.2.'de türlerin ortalama sinyal süreleri ve istatistiksel analiz verileri gösterilmiştir.

Konsantrasyonlar açısından yapılan değerlendirmede şişedeki fungal yükün artmasının tüm şişe ve izolatlarda sinyal süresini anlamlı derecede kısalttığı gözlemlendi.

($p < 0.001$). Tablo 4.3.'te şişedeki konsantrasyon miktarı arttıkça sinyal süresinin kısalması ve istatistiksel analizi gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Türlerle göre ortalama sinyal süreleri ve istatistiksel analizi

İzolot türü	Sinyal süresi (saat)		İstatistiksel analiz (Kruskal-Wallis)
	Ortalama±SD (min-max)	Ortanca (%25-%75)	
<i>C. albicans</i>	15.76±3.86 (9.87-28.87)	15.22 (12.67-18.27)	p<0.001
<i>C. parapsilosis</i>	21.74±5.05 (13.75-37.75)	21.80 (16.72-25.85)	
<i>C. tropicalis</i>	11.93±2.12 (8.18-16.78)	11.68 (10.09-13.69)	
<i>C. glabrata</i>	22.64±10.74 (9.50-65.38)	20.42 (14.59-29.31)	
<i>C. krusei</i>	13.80±2.94 (10.00-22.50)	13.55 (11.35-15.92)	

Tablo 4.3. Konsantrasyon miktarı ile sinyal sürelerinin karşılaştırılması

Şişe türü ve konsantrasyon miktarı	Sinyal süresi (saat)		İstatistiksel analiz (Kruskal-Wallis)
	Ortalama±SD (min-max)	Ortanca (%25-%75)	
Plus Aerobic/F			
10	21.24±6.91 (13.00-46.27)	19.18 (15.98-25.88)	p<0.001
100	17.30±5.40 (10.95-35.82)	15.23 (13.00-21.41)	
1000	13.28±3.68 (8.18-26.93)	12.16 (10.62-15.66)	
Peds Plus/F			
10	21.81±7.11 (13.00-45.22)	19.75 (16.42-26.44)	p<0.001
100	17.65±5.89 (10.50-35.32)	15.30 (13.66-21.89)	
1000	13.14±5.05 (8.53-33.32)	11.67 (10.50-15.34)	
Mycosis IC/F			
10	19.66±7.73 (12.53-65.38)	17.05 (15.40-22.53)	p<0.001
100	16.27±6.77 (10.50-56.72)	14.30 (12.60-17.30)	
1000	12.27±2.72 (8.68-22.13)	11.42 (10.43-13.17)	

İzolatlara direkt ve klasik yöntemlerle tanımlama testleri uygulanmış; testlerin performansları ve sonuç verme süreleri tablo 4.4.'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Klasik ve direkt tanımlama testlerinin türlere göre performansı

İzolat Adı	Toplam	Germ Tüpü		Direkt	Klasik	Direkt	Klasik
		Direkt (10 dakika)	İndirekt (2 saat)	CHROMagar (24 saat)	CHROMagar (48 saat)	API (48 saat)	API (72 saat)
<i>C. albicans</i>	20	11	18	20	20	20	-
<i>C. parapsilosis</i>	11	0	0	0	0	11	11
<i>C. tropicalis</i>	10	0	1	10	10	9	-
<i>C. glabrata</i>	10	0	0	10	10	10	-
<i>C. krusei</i>	11	0	0	11	11	11	-

Bu sonuçlara göre direkt GTT kan kültür şişesi pozitif sinyal verir vermez yapılabilmekte ve 10 dakika kadar kısa bir sürede sonuç verebilmektedir. Bu şekilde uygulanan testin duyarlılığı %55, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur. Testin pozitif prediktif değeri (PPD) %100, negatif prediktif değeri (NPD) %82; doğruluğu ise %85.5 olarak hesaplanmıştır. Kan kültür şişesinden alınan kanın serum içinde iki saat inkübasyonundan sonra yapılan değerlendirmede ise duyarlılık %90'a çıkmasına rağmen özgüllük %97.6'ya düşmüştür. Bunun sebebi bir *C. tropicalis* izolatına bağlı yalancı pozitifliktir. İndirekt germ tüp testi için PPD %94.7, NPD %97.6 ve doğruluk da %95.2 bulunmuştur. Testin direkt ve indirekt yapılmasında doğruluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

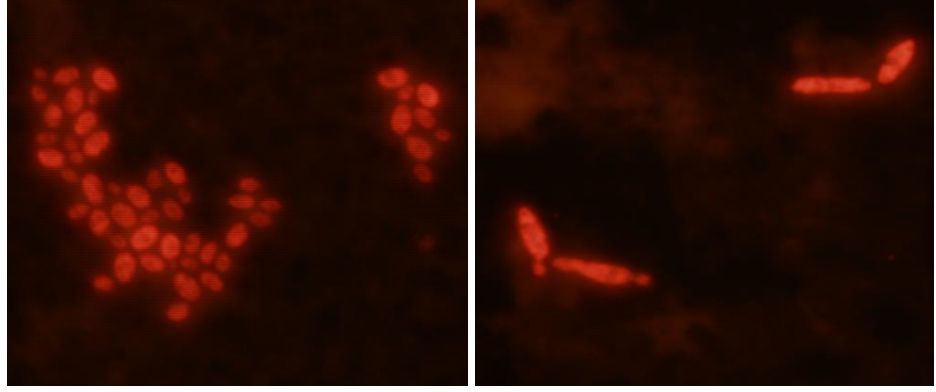
Kromojenik besiyeri pasajı hem direkt hem de klasik yoldan yapıldığında %100 duyarlılık, %100 özgüllük ve %100 doğruluk oranlarıyla sonuç vermiştir. Ancak testin direkt yapılması klasik yöntemle göre 24 saat kazandırmıştır.

Direkt API 20C AUX testinin duyarlılığı %98.4, özgüllüğü %100 ve doğruluğu ise %98.4 olarak hesaplanmıştır. Test için PPD %98.38, NPD ise %100'dür. Aynı test klasik yöntemle uygulandığında ise tüm oranlar %100'e ulaşmıştır. Testin direkt ve indirekt yapılmasında doğruluk oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

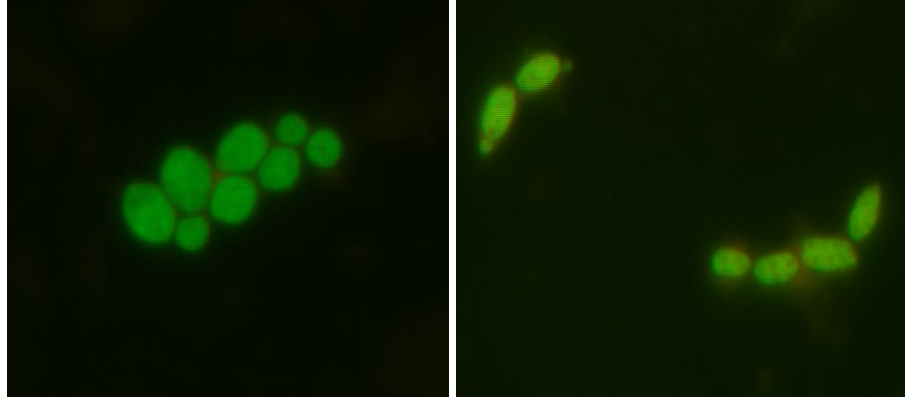
PNA-FISH testi oldukça kolay bir çalışma ve değerlendirme prosedürüne sahipti. Kan kültür şişesi pozitif sinyal verdiği anda çalışılmaya başlandığında ikinci saatin sonunda %100 duyarlılık, %100 özgüllük ve %100 doğrulukla sonuçlar elde edildi. Tablo 4.5.'te PNA-FISH testinin performansı, şekil 4.6., şekil 4.7. ve şekil 4.8.'de PNA-FISH görüntüleri gösterilmiştir.

Tablo 4.5. PNA-FISH testinin performansı

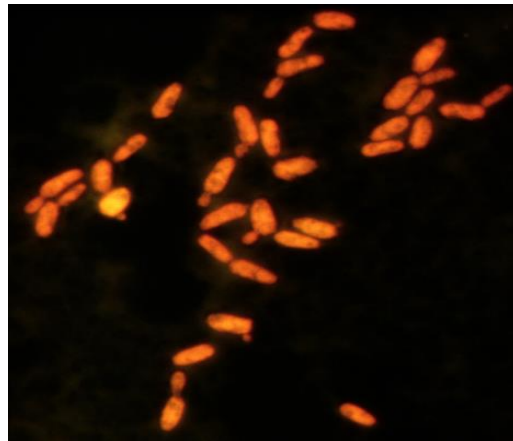
PNA-FISH	Toplam	<i>C.albicans</i>/ <i>C. parapsilosis</i> (yeşil)	<i>C.tropicalis</i> (sarı)	<i>C. glabrata</i>/ <i>C. krusei</i> (kırmızı)	Negatif (floresan yok)
<i>C. albicans</i>	20	31	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	11		0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	10	0	10	0	0
<i>C. glabrata</i>	10	0	0	21	0
<i>C. krusei</i>	11	0	0		0



Şekil 4.6. *C. glabrata* (solda) ve *C. krusei* (sağda) PNA-FISH görüntüleri



Şekil 4.7. *C. albicans* (solda) ve *C. parapsilosis* (sağda) PNA-FISH görüntüleri



Şekil 4.8. *C. tropicalis* PNA-FISH görüntüsü

Direkt ve klasik Etest ile MD sonuçları hem türlere hem de antifungal ajanlara göre kategorik ve esansiyel uyum; direkt DD ve klasik DD testleri ise sadece kategorik uyum açısından değerlendirildi. Etest ve MD yöntemleri değerlendirilirken CLSI M27 S4 kullanıldı. Buna göre *C. glabrata* için VOR MİK breakpoint değeri, *C. krusei* için de FLU MİK breakpoint değeri olmadığı için değerlendirilemedi (Bkz. EK 2).

Etest yönteminin kendi içindeki kategorik uyumu değerlendirildiğinde *C. glabrata* ve *C. tropicalis*'in en düşük oranlara sahip olduğu görüldü. En yüksek uyum oranı ise *C. albicans*'ta saptandı. Antifungal ajanlar arasında ise en düşük oran CAS'ta, en yüksek oran ise AND'de saptandı. Etest yönteminin esansiyel uyumu kategorik uyumundan daha yüksek bulundu. Burada izolatlar arasında belirgin fark gözlenmezken antifungaller arasında en yüksek uyum oranı AMB ile elde edildi. AND ve CAS ise kategorik uyumdakine benzer sonuçlar sergiledi.

MD yöntemi hem kategorik uyum hem de esansiyel uyum açısından değerlendirildiğinde, Etest yöntemine göre daha yüksek oranların elde edildiği gözlemlendi. MD için kategorik uyumda *C. krusei* hariç diğer izolatlarda yüksek bir uyum yakalanırken özellikle 48 saat sonunda izolatların kategorik uyumlarının oranlarının düşmesi dikkat çekti. Genel olarak antifungal ajanlar yüksek uyum oranları sergilemekle birlikte, VOR diğer antifungallere göre daha düşük bir uyum oranı gösterdi. Ancak esansiyel uyumda VOR'un uyum oranı yüksek bulundu. AND ve AMB iki kategoride de en yüksek uyum oranının elde edildiği antifungaller oldu.

DD yöntemi esansiyel uyum açısından değerlendirilemedi. Kategorik uyumda ise *C. albicans* ve *C. krusei* için %100'lük oranlar bulunurken diğer türlerin oranları daha aşağıda kaldı. *C. glabrata* ise %60'lık uyum oranı ile en düşük yüzdeye sahip tür oldu. Antifungal ajanlar arasında ise VOR'un FLU'dan daha yüksek (%89-%85) bir uyum sergilediği gözlemlendi (Bkz. EK 3).

Klasik Etest ile klasik MD sonuçları da kendi aralarında kıyaslandı. Özellikle AMB'nin hem kategorik hem de esansiyel uyumdaki son derece düşük oranı dikkat çekti (kategorik uyum %65-48, esansiyel uyum %68-66). Oranın bu denli düşük olmasında *C. krusei*'nin (%9-37, %9-9) payı büyük oldu. CAS ise AMB'ye benzer şekilde düşük uyum oranları gösterdi (%63-53, %55-47). CAS'ta ise bu düşüklüğe sebep olan ana faktörün *C. tropicalis* (%30-30, %30-20) olduğu görüldü. En yüksek

uyum ise AND'de gözlendi (%97-87, %87-88). İzolatlar arasında ise *C. albicans* ve *C. parapsilosis* diğer üç türe göre daha yüksek uyum oranı sergiledi (Bkz. EK 4).

5. TARTIŞMA

Nozokomiyal mantar enfeksiyonları sıklıkla ağır seyirli, hızlı ilerleyen, tanısı zor ve tedaviye dirençli hastalıklar olduğundan ciddi morbidite ve mortalite nedenidir (5).

Candida spp. hastane kaynaklı kan akışı enfeksiyonlarında %9'luk oranıyla dördüncü sırada yer alırken, %39.2'lik mortalite oranıyla birinci sıraya çıkan mikroorganizmalardır (6).

Tedavi edilmeyen kandidemilerde mortalite oranı %60 (60) iken, tedavi ile bu oran %30-40 seviyelerine düşmektedir (13, 166). Tedavideki gecikmenin mortaliteyi belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir (19, 20, 167). 230 kandidemili hastanın incelendiği retrospektif bir kohort çalışmasında, kan kültürü alınmasından FLU tedavisi başlanmasına kadar geçen zaman içerisinde mortalite oranlarının tedaviye başlama süresiyle birlikte doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür. Buna göre, pozitif saptanan kan kültürünün alındığı günde FLU tedavisi başlanan hastalarda mortalite oranı %15 iken; bir gün sonra tedavi alan hastalarda bu oranın %24'e; iki gün sonrasında tedavi başlananlarda %37'ye ve üçüncü gün tedavi başlananlarda ise %41'e çıktığı gözlenmiştir (20).

Kandidemi nedenli septik şoklu hastalarda ise mortalite oranlarının çok daha yüksek seyrettiği bildirilmektedir. Retrospektif yapılan bir kohort çalışmasında *Candida* spp. açısından kan kültürleri pozitif olan septik şoklu hastalarda hastane yatış süresi içerisindeki mortalite oranı %64 (155/224) olarak bulunmuştur (168). Septik şokun başlamasından itibaren 24 saat içinde kaynak kontrolü sağlanan ve antifungal tedavi başlanan hastalarda mortalite oranı %53'e düşerken, bu şartların sağlanamadığı kalan 82 hastada bu oran %98'e çıkmıştır. Yapılan çok değişkenli analizlerde hem kaynak kontrolünde hem de antifungal tedavideki gecikmenin mortalite ile son derece yakın ilişkili olduğu gözlenmiştir (168).

Çoğu kandidemilerde etken *C. albicans* olmakla birlikte, bunların yaklaşık %45'i *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* tarafından oluşturulmaktadır (169). *Candida* spp.'nin büyük kısmı yaygın kullanılan antifungallere hala duyarlı olmasına karşın, *C. krusei*'nin flukonazole intrinsek direnci, *C. glabrata*'nın triazolere artan direnç oranları ve *C. tropicalis*'in FLU ve vorikonazole değişken direnç oranları da unutulmamalıdır. Ayrıca *C. parapsilosis*

ekinokandinlere karşı yüksek MİK değerlerine sahiptir (170). Bu nedenle zamanında yapılan etyolojik tanı klinisyeni uygun tedavi konusunda yönlendirebilir ve mortalite oranlarının düşürülmesine katkı sağlayabilir (171, 172). Ancak laboratuvar testlerindeki olumlu gelişmelere rağmen kan kültürü pozitifliği ve sonrasında uygulanan identifikasyon ve antifungal duyarlılık işlemleri hala çok uzun zaman gerektirmektedir (173). Bu durum geç tanıya, dolayısıyla tedaviye geç başlanmasına ve sonuçta mortalite artışına neden olabilmektedir (19, 20).

Kan kültürü alınmasından etkenin tanımlanmasına kadar geçen süredeki gecikme, hastanın uygun tedaviyi almasında gecikmeye neden olacaktır. *In vitro* çalışmalarda, kan kültürlerinde pozitif sinyal verme süresinin *C. glabrata*'da diğer türlere kıyasla daha uzun olduğu gösterilmiştir. Anaerobik koşulların bu süreyi bir miktar kısalttığı ancak bunun hala yeterli düzeyde olmadığı bildirilmektedir (174, 175). Rutin kan kültürlerinden toplanan veriler de *C. glabrata*'nın daha uzun sürelerde pozitiflik verdiğini göstermektedir (176). Dolayısıyla, kan kültüründe *C. glabrata*'yı üretmek ve sonrasında tanımlamak daha uzun zaman gerektirecek, bu durum hastanın uygun tedaviyi almasını geciktirecek veya ekinokandin kullanımı konusunda klinisyen üzerinde baskı oluşmasına sebep olacaktır (171). Ancak ekinokandinlerin azollere göre çok daha pahalı ilaçlar olduğu da göz ardı edilmemelidir (18).

Kandidemiler günümüzde gerek artan sıklığı gerekse de zamanla değişen epidemiyolojisi ile önemli nozokomiyal enfeksiyonlardan biri olmuştur. Bu değişim azalan *C. albicans* ve artan non-*albicans* türlerin oranı ile kendini göstermektedir (177, 178). Flukonazole genellikle duyarlı olan *C. albicans*'ın yerini, genellikle dirençli *C. glabrata* almaya başlamıştır ve doğal olarak, artan FLU direnç oranları bildirilmeye başlanmıştır (179). Bu nedenle kan kültüründe üreyen *Candida* spp'nin ivedilikle tanımlanması ve antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması son yıllarda daha önemli hale gelmiştir.

Kandidemilerin hızlı tanısına yönelik kültür dışı tanı testleri arayışı sürmekle birlikte tanıda altın standart yöntem hala kan kültürüdür. Kan kültürü günümüzde otomatize sistemlerle yapılmaktadır. Özel şişeler ve sistemler sayesinde üreme tespit zamanları kısalmış olsa da birçok etken için hala uzun süre beklenmesi gerekebilmektedir.

Kandidemi tanısı iki önemli adım içermekte olup; bunlardan birincisi üremenin tespiti, ikincisi ise üreyen mayanın tanımlanmasıdır. Fernandez ve ark. (171) yaptığı 115 kandidemili hastayı içeren bir çalışmada, *C. albicans* için üreme sinyalinin BacT/Alert™ Kan Kültür Sistemi (bioMérieux, Durham, NC) ve aerob şişeler kullanılarak ortalama 35 saatte, *C. glabrata* için ise ortalama 80 saatte alındığı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada kesin tanımlama için gereken sürenin *C. albicans* için ortalama 85 saat, *C. glabrata* için ise ortalama 154 saat olduğu gösterilmiştir. *C. glabrata* üremesi varlığında geç pozitif sinyal vermesi açısından biz de benzer sonuçlar elde ettik. Buna göre bizim çalışmamızda *C. albicans* için ortalama pozitif sinyal süresi Plus Aerobic/F ve Peds Plus/F şişeleri için 15,73 saat olarak bulunurken, *C. glabrata* için bu süre 25,86 saat olarak bulundu. Ancak Mycosis IC/F şişeleri kullanıldığında *C. albicans* için bu süre ortalama 16,05 saat olarak bulunurken, *C. glabrata* için 16,64 saat olarak bulunmuştur. Buna göre Mycosis IC/F şişesi diğer iki şişeye belirgin bir üstünlük sağlamış ve *C. glabrata* suşlarını yaklaşık olarak dokuz saat kadar daha erken üretebilmiştir. Bu fark özellikle kandidemi gelişen hasta popülasyonu ve klinik durumları düşünüldüğünde son derece önemlidir (9, 180).

Nawrot ve ark.'nın (181) benzer bir çalışmasında Mycosis IC/F şişesinin özellikle *C. glabrata* için üreme sinyal süresini bir hayli düşürdüğü gösterilmiştir. Şişe başına 10-20 maya hücresi düşecek şekilde yapılan bu deneysel çalışmada *C. glabrata* için Plus Aerobic/F şişesinin ortalama 56.9 saatte sinyal verdiği bulunurken, bu süre Mycosis IC/F şişesi için ortalama 21.36 saat olarak bulunmuştur. Yine bizim sonuçlarımıza benzer şekilde diğer maya türleri için iki şişenin arasında belirgin bir zaman farkı bulunamamıştır. Örneğin *C. parapsilosis* için Mycosis IC/F şişesinin Plus Aerobic/F şişesine göre yaklaşık bir saatlik (31.41-30.05), *C. krusei* için de yaklaşık iki saatlik (21.07-19.09) gecikme gösterdiği saptanmıştır. *C. parapsilosis* açısından bizim sonuçlarımız da bu çalışmayla benzerlik göstermektedir (21.48 saate karşılık 22.58 saat). *C. krusei*'de ise her iki şişenin de aynı zamanda sinyal verdiğini tespit ettik (13.54-13.55). Meyer ve ark.'nın (182) yaptığı başka bir çalışmada ise yine Mycosis IC/F şişesi ile Plus Aerobic/F şişesi karşılaştırılmış, sonuçlar benzer bulunmuştur. Çalışmanın en çarpıcı sonucu, *C. glabrata* için ortalama 17.8 saatte sinyal veren Mycosis IC/F şişesinin, ortalama 61.5 saatte sinyal veren Plus Aerobic/F

şişesine belirgin üstünlüğüdür. Aynı çalışmada *C. albicans* Mycosis IC/F şişesinde 31.1 saatte, Plus Aerobic/F şişesinde ise 39.9 saatte sinyal vermiştir. Yaklaşık sekiz saatlik bu erken sinyal süresi *C. parapsilosis* için tersine dönmüş ve Mycosis IC/F şişesinde 32.0 saatte sinyal verirken Plus Aerobic/F şişesinde 24.4 saat ile daha erken sinyal alınabilmiştir. *C. krusei*'de ise Mycosis IC/F şişesi yaklaşık dört saatlik bir avantaja sahip (22.7-26.7) bulunmuştur. *C. tropicalis* için 18.5 saat sinyal süresi ile iki şişeden de aynı performansın elde edildiği bildirilmiş ve bu sonuç bizim çalışmamızda da *C. tropicalis* izolatları için benzer şekilde bulunmuştur (11.9-12.2).

Hem bizim çalışmamızda hem de Nawrot ve ark.'nın (181) yaptığı çalışmada Plus Aerobic/F şişesi, Peds Plus/F şişesi ve Mycosis IC/F şişesi *C. glabrata* dışındaki izolatlar için benzer performans göstermiştir. Bunun sebebi iki çalışmanın da deneysel yapılması ve kan kültür şişelerine belli miktarlarda maya konulması olabilir. Oysa Meyer ve ark.'nın (182) yaptığı çalışmada izolatlar arasında şişelerin sinyal verme zamanı açısından belirgin farklılıklar gösterilmiştir. Bu farkın sebebi olarak yapılan çalışmanın bizimkinin aksine deneysel olarak değil, doğrudan kandidemili hastalardan alınan kanlarla yapılmış ve dolayısıyla şişelerdeki fungal yüklerin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda dikkati çeken bir başka nokta da *C. tropicalis* ile inoküle edilen şişelerde diğer türlere göre daha erken sinyal alınmış olmasıdır. Kullanılan üç farklı şişenin sinyal sürelerinin ortalamasını aldığımızda, *C. tropicalis* 11.94 saatte sinyal verirken ona en yakın *C. krusei*'den (13.89 saat) yaklaşık iki saat, *C. albicans*'tan ise (15.84 saat) yaklaşık dört saat önce sinyal verdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmaların sonuçları ile de uyumlu bulunmuştur (162, 174, 182, 184).

Literatürde *Candida* spp. için üreme sinyal süresinin kandidanın türünü belirlemede yardımcı olabileceğine dair yayınlar mevcuttur. Bu çalışmalara göre *C. glabrata*'nın geç pozitif sinyal süresi diğer mayalardan ayrımını sağlayabilir. Fernandez ve ark. (171), Horvath ve ark. (174, 183), Trigueros ve ark. (184), Huang ve ark. (185) ile Chen ve ark. (186) çalışmalarında *C. glabrata*'nın diğer mayalardan anlamlı ölçüde geç pozitif sinyal süresine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmalarda *C. tropicalis*'in erken üremesi de anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte, sadece üreme süresine bakılarak kesin ve doğru identifikasyon mümkün

değildir. Çünkü üreme süresi üzerine *Candida* türü dışında etkili olabilecek başka faktörler de söz konusudur. İnoküle edilen kan miktarı ve kandaki mantar yükü, hastanın aldığı antimikrobiyal ilaçlar, şişenin laboratuvara geliş süresi, kullanılan sistemlerdeki farklılıklar (175), kandideminin kaynağı (184) ve hastada var olan septik şok, nötropeni ya da siroz (188) gibi klinik durumlar üreme süresine etkili olarak kesin ve doğru identifikasyonu engelleyebilir.

Kandidemili bir hastanın kanında <10 CFU/ml maya hücresi bulunduğu tahmin edilmektedir. Ancak kandidemi simülasyonları literatürde herhangi bir standardizasyona kavuşmamıştır. Bugüne kadar 1-100 CFU/ml maya hücresi içeren inokulum miktarları denenmiştir (175, 189-192). Otomatize kan kültür sistemleri üreticileri ise kalite kontrolü için 1000 maya/şişe'lik bir inokulum miktarı önermektedirler ki, bu konsantrasyon klinik bir kandidemi olgusunun kanında bulunan konsantrasyondan çok daha yüksek bir değere karşılık gelmektedir (175). Biz de çalışmamızda 10-50, 100-500 ve 1000-5000 maya/şişe olacak şekilde üç farklı konsantrasyon denedik ve şişedeki fungal yükün pozitiflik süresine katkısını araştırdık. Buna göre bir kan kültürü şişesinden erken pozitif sinyal almanın sadece şişe veya *Candida* türü ile ilgili olmadığını aynı zamanda şişenin içindeki fungal yük ile de doğru orantılı olduğunu gözledik.

Bu doğrultuda üç farklı konsantrasyondaki maya süspansiyonu üç farklı kan kültür şişesine ekilerek toplamda her bir izolat için dokuz şişe kullanılmıştır. Her bir set kan kültürü şişesine sırayla 10-50, 100-500 ve 1000-5000 maya/şişe olacak şekilde mayalar inoküle edilmiştir. Sonuçlar ise maya konsantrasyonu arttıkça pozitif sinyal süresinin düştüğünü göstermiştir. Literatürde Horvath ve ark.'nın (175, 184) yaptığı ve bizim sonuçlarımızla benzer sonuçları buldukları iki çalışmaları bulunmaktadır. İki çalışmada da her bir şişeye 10, 100 ve 1000 maya hücresi olacak şekilde şişelerin inokülasyonu yapılmış ve birisinde BACTEC 9240, diğerinde ise BacT/ALERT 3D kan kültür sistemi kullanılarak şişelerin inkübasyonu sağlanmıştır. Bunlardan BACTEC 9240 kan kültür sistemi ve Plus Aerobic/F şişeleri kullanarak yaptıkları çalışmada *C. albicans* için 10, 100, 1000 maya/şişe konsantrasyonları için sinyal sürelerini giderek azalan şekilde sırasıyla ortalama 35.89, 29.67 ve 21.00 saat bulmuşlardır. Öte yandan BacT/ALERT 3D kan kültür sisteminde Aerobic Medium kullanılarak yapılan ikinci çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur. Buna göre *C.*

albicans sırasıyla 26.8, 24.3 ve 20.4 saatte sinyal vermiştir. Tüm bu sonuçlara göre şişedeki fungal yük ne kadar artarsa sinyal süresinin de o kadar kısılacığını söyleyebiliriz.

Doğru ve hızlı tanı, uygun antifungal tedaviye zamanında başlanması açısından son derece önemlidir. Erken tedavi de azalan mortalite oranları, kısalan hastane yatışları ve hasta başına düşen maliyetin azalması gibi önemli sonuçları beraberinde getirmektedir.

Candida'ların tanımlanması morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi veya moleküler yöntemlerle yapılır. Morfolojik olarak koloni rengi ve görünümü, hif veya yalancı hif üretimi, germ tüp veya klamidospore oluşturma yetenekleri, blastosporların yapısı veya yerleşim şekilleri gibi özellikleri değerlendirilir. Biyokimyasal olarak ise karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyonu, üre hidrolizi ve nitrat asimilasyonu araştırılmaktadır (39, 193).

Candida'ların tanımlanmasında ilk olarak, hızlı sonuç veren ve uygulaması kolay olan GTT yapılmaktadır. Bu yöntem klasik olarak katı besiyerinde üreyen kolonilerden yapılmaktadır. Testin kendisi her ne kadar hızlı olsa da katı besiyerinde kolonilerin üremesini beklemek bu avantajı yok etmektedir (194).

Son yıllarda non-*albicans Candida* türlerinin sıklığındaki artışa rağmen, pek çok merkezde kandidemilerin en sık etkeni hala *C. albicans*'tır. Bu nedenle GTT *C. albicans*'ın *albicans* dışı *Candida*'lardan ayrılmasında güncelliğini hala korumaktadır. *Candida albicans* dışında *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis* de germ tüp oluşturan kandida türlerindedir. Diğer *albicans* dışı türler ise *C. tropicalis*, *C. kefyr* ve *C. krusei*'de psödogerme tüp oluşumu görülebilmektedir (39, 193).

GTT tıbbi önemi olan maya türleri için uzun zamandır yapılan ve kliniğe adapte olmuş ucuz ve yapılması kolay bir testtir. Ancak tüm testler gibi bunun da deneyimli personel tarafından yorumlanması önemlidir. Yukarıda da belirtildiği gibi özellikle yalancı germ tüp oluşumlarını gerçeklerinden ayırt etmek zor olabilir. Bizim çalışmamızda da bir tane *C. tropicalis* izolatu yalancı germ tüp oluşturarak yalancı pozitifliğe sebep olmuştur. Direkt GTT duyarlılığı bizim çalışmamız için %55, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur. İndirekt GTT duyarlılığı %90, özgüllüğü ise %98'dir. Sheppard ve ark. (194) tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada direkt GTT'nin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %87.1 ve %100 olarak

bulunurken indirekt GTT'nin duyarlılığı ve özgüllüğü %92.2 ve %100 olarak bulunmuştur. Terlecka ve ark. (195) ise 31 tane pozitif BacTAlert kan kültür şişesinden direkt GTT yaptıklarında bunların 13'ünün *C. albicans* olduğunu ve klasik GTT ile uyumunun % 100 olduğunu göstermişlerdir.

GTT direkt olarak kan kültür şişesinden yapıldığında 10 dakika gibi kısa sürede sonuç verebilen bir testtir. Bizim çalışmamızda bulunan %55'lik duyarlılık oranı düşük olmasına rağmen özellikle pozitif sinyal veren şişelerden testin ivedilikle uygulanması hastaya önemli yararlar sağlayabilir. Ayrıca indirekt GTT ile bu oranı iki saatlik bir uzamayla %90'lara çıkarmak mümkün olabilmektedir.

Candida enfeksiyonlarında bugünlerde en sıcak gündem *C. albicans*/non-*albicans* değişimidir. Pfaller ve ark. (196) 10,5 yılı içeren (1997-2007) 41 ülke ve 142 merkezden topladıkları 256882 *Candida* suşu ile yaptıkları çalışmada yıllar içindeki değişim şu şekildedir. *C. albicans* oranı 1997-2000 yılları arasında %70.9 iken non-*albicans Candida* oranı %29.1; 2001-2004 yılları arasında %62.9-%37.1; 2005-2007 yılları arasında da %65-%35'lik bir oran vardır. Yine 2019 kan izolatının incelendiği bir diğer çalışmada da non-*albicans Candida* türleri %54 ile öne geçmiştir (9).

Non-*albicans Candida*'ların dağılımında *C.glabrata* ve *C.parapsilosis*'i *C.tropicalis* ve *C.krusei* izlemektedir. *Candida* türlerinin dağılımının bilinmesi tedavide özellikle önemlidir çünkü antifungal duyarlılığı türlere göre tahmin edilebilir. *C.krusei*'de intrinsek FLU direnci, *C.glabrata*'da değişen oranlarda FLU direnci, *C.parapsilosis*'te ise ekinokandinler için yüksek MİK değerleri gibi değişkenlerin değerlendirilmesi tedavinin zamanında ve etkin olarak başlanmasında önem taşımaktadır (64). Dolayısıyla germ tüp testi son derece hızlı sonuç vermesine rağmen, günümüzde *C. albicans*/non-*albicans* ayrımı artık yeterli olmayabileceğinden tür düzeyinde tanımlama testleri daha da önem kazanmıştır.

Tür düzeyinde hızlı maya tanımlaması için ticari olarak geliştirilmiş kromojenik besiyerleri bulunmaktadır. Bu besiyerleri mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerle reaksiyona giren kromojenik substratlar içerirler. Bu sayede besiyeri üzerinde renk ve koloni görüntüsü olarak karakteristik üremeler ortaya çıkar (197). Ancak bu ürünün bazı kısıtlamaları vardır; üretici firma sadece üç farklı *Candida* türünün CHROMagar *Candida* besiyeri ile saptanabileceğini taahhüt

etmektedir. 37°C’de 48 saatte *C. albicans* açık ve orta yeşil koloniler şeklinde ürerken, *C. tropicalis* kenarları mor pigmentli metalik mavi renkli koloniler şeklinde, *C. krusei* ise geniş, tüylü, kenarları beyaz ortası pembe renkli koloniler şeklinde ürer. Birçok çalışmada bu üç *Candida*’nın bu şekilde tanımlanabileceği gösterilmiştir (197-205). Ancak *C. dubliniensis*’in *C. albicans* ile karışabileceği unutulmamalıdır (204-208). *C. glabrata* tanısı ise hala tartışmalıdır. Birçok yazar koyu pembeden mora kadar bir renk yelpazesinde *C. glabrata* üremesi olabileceğini ve bunun türe özgü olduğunu söylese de (198, 201, 202, 205) bir kısım yazar bu renklenmenin karakteristik olmadığı ve tanı koyulurken güvenilemeyeceğini söylemektedir (197, 200, 202, 204, 209, 210).

Çalışmamızda pozitif sinyal veren şişelerden CHROMagar *Candida* plaklarına yapılan pasajlarda *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* izolatlarının tamamı 18-24 saat içinde bu izolatlara özgü renk ve şekilde koloniler oluşturdu ve %100 duyarlılık ve özgüllükle tanımlandı. Benzer olarak direkt kan kültür şişelerinden kromojenik besiyerine pasaj yapan Birinci ve ark. (211) %100 duyarlılık ve özgüllük; Horvath ve ark. (212) ise %97 duyarlılık ve %100 özgüllük bildirmişlerdir. Üretici önerisi 48 saat olmasına rağmen ve 2003 ile 2004’te yapılan iki ayrı çalışmada da (211, 212) özellikle *C. glabrata*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* için geç renklenme sorunundan (sırasıyla 72, 48, 48 saat) bahsedilse de bizim çalışmamızda böyle bir sorunla karşılaşılmadı. *C. parapsilosis* suşları için CHROMagar *Candida*’nın herhangi bir renk tanımlaması olmadığından bu izolatlar duyarlılık ve özgüllük hesaplanırken göz ardı edilmiştir. Ayrıca renklenmeyen *C. parapsilosis* izolatları için de API 20C AUX (bioMérieux, France) testi yapılmış ve bunların tamamı (11/11) *C. parapsilosis* olarak tanımlanmıştır. Kromojenik besiyeri ile kan kültür şişesinden direkt inokülasyonla 18-24 saat içerisinde kandidaların tanımlaması yapılabilse de, sınırlı sayıda *Candida* türünü tanımlayabilmesi ve bazen tanımlama için uzun inkübasyon sürelerini gerektirmesi bu yöntemin dezavantajları olarak göz önünde bulundurulmalıdır.

Biyokimyasal tanıda kullanılmak üzere piyasada ticari olarak çok sayıda test bulunmaktadır. Bu testlerden en sık kullanılanlar API 20C AUX (bioMérieux, France), API ID 32C (bioMérieux, France), Vitek 2 (bioMérieux, France) kitleridir (213). Bu testler klasik olarak katı besiyerinde üremiş olan maya kolonilerine

uygulanmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız ticari asimilasyon testi API 20C AUX (bioMérieux, France) için üretici firma tarafından 48 saat, yeterli üreme gözlenmediğinde 72 saatlik inkübasyon süresi önerilmektedir. Bu sürenin kısaltılabilmesi amacıyla çalışmamızda hem kan kültür şişesinden direkt hem de CHROMagar'da renklenmeyen kolonilerden indirekt olarak uygulanmış olup, testin duyarlılığı ile özgüllüğü kan kültür şişesinden direkt uygulandığında sırasıyla %98 ve %100, klasik yoldan uygulandığında ise hem duyarlılık hem de özgüllük oranları %100 olarak bulunmuştur. Karabıçak ve ark. (214) yaptıkları bir çalışmada API 20C AUX'un beş yaygın *Candida* türünde %96 doğruluk oranıyla sonuç verdiğini göstermişlerdir. API testi hem kolay uygulanabilirliği hem de maliyetinin düşük olması sebebiyle tüm klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanabilecek bir testtir. En önemli dezavantajı uzun inkübasyon süresi nedeniyle geç sonuç vermesi olmakla birlikte, çalışmamızda olduğu gibi, ticari identifikasyon testleri kan kültür şişesinden direkt uygulanabilirse bu dezavantaj ortadan kaldırılabilir ve en az 24 saatlik bir avantaj sağlanabilecektir.

CHROMagar *Candida* ve ticari asimilasyon testleri ile *Candida* tür tanımlaması kolaylaşmasına rağmen, maya üremesinin beklendiği bu tür yöntemlerle sonuç vermek için hala uzun saatler beklenmesi gerekmektedir. Bu da özellikle kandidemi gibi yaşamı tehdit eden, doğru ve hızlı tedavinin hayat kurtarıcı olduğu durumlarda laboratuvar ve klinik çalışanlarını kısıtlamaktadır (215).

Morrell ve ark. (19) kan kültürünün pozitifleşmesinden tedaviye başlama arasındaki sürenin 12 saatten fazla süre olmasının mortaliteyi anlamlı olarak arttırdığını göstermiştir (%33-%11, $p=0,018$). Bu nedenle hasta özellikleri, altta yatan hastalıklar ve risk faktörlerine dayanarak hastaların yakın takibi ve erken dönemde tanısal işlemlerin yapılması, zamanında tedaviye başlanması açısından son derece önemlidir (87, 216). Kandidemi tanısı için altın standart yöntem kan kültürü olmakla birlikte duyarlılık oranları düşüktür (~%50). Kan kültürlerinde pozitif sonuç oranı lizis-santrifügasyon tekniği ile ve BACTEC, BacTAlert gibi sürekli monitorize kan kültür sistemleri ile bir miktar arttırılmış olsa da, kan kültürlerinden sonuç alınması için en az 1-3 gün gerektirmektedir. Buna ek olarak, organizmanın identifikasyonu için klasik yöntemlerle en az 1-2 gün daha gerekir. İdentifikasyon için gereken bu ilave sürenin kısaltılması amacıyla geliştirilen PNA-FISH yöntemi,

kültürün pozitifleşmesinden sonra iki saat içinde *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi sık görülen türleri tanımlayabilmektedir (17, 87, 64).

Görece olarak yeni bir teknik olan PNA-FISH, hem doğruluk oranları hem de tanımlama hızıyla oldukça avantajlı görünen yöntemlerdendir. Kan kültürlerinde üreyen bakteri ve kandidaların geleneksel kültür yöntemleri ile tanımlanma zamanları ve PNA-FISH'i karşılaştıran bir çalışmada ortalama tanımlama zamanı standart kültür yöntemleri için 83.6 saat, PNA-FISH için de 11.2 saat olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada PNA-FISH'in doğruluk oranı da %98.8 olarak bildirilmiştir (215). PNA-FISH çeşitli çalışmalarda özellikle yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarıyla ve iki saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesiyle son yıllarda öne çıkan bir test olmuştur. Tablo 5.1.'de literatürden PNA-FISH performansını gösteren yayınlar özetlenmiştir.

PNA-FISH Yeast Traffic Light testi yeşil, sarı ve kırmızı floresan renkleri kullanarak *C. albicans*/*C. parapsilosis* (yeşil-FLU duyarlı), *C. tropicalis* (sarı-FLU genellikle duyarlı) ve *C. glabrata*/*C. krusei* (kırmızı-FLU dirençli veya doza bağlı duyarlı) ayırımını sağlamaktadır (217, 218). Bu sayede etkenin antifungal direnci hakkında da kısmi bilgiler elde edilebilmektedir. Ancak testin bu aşamadaki en büyük sorunu *C. albicans* ile *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* ile *C. krusei* arasında tür düzeyindeki ayırımı renk bakımından yapamıyor olmasıdır. Bununla beraber özellikle kırmızı renk alan grup içinde, şekil 4.6.'da görüldüğü üzere *C. glabrata*'nın son derece küçük, gerçek ya da yalancı hif oluşturmeyen morfolojideki maya hücreleri ile *C. krusei*'nin daha büyük boyutlardaki ve yaygın yalancı hiflerin gözlendiği hücrelerinin deneyimli bir mikrobiyolog tarafından kolayca ayırımının yapılabilmesi mümkün olabilmektedir.

Ancak aynı durum *C. albicans* ve *C. parapsilosis* ayırımı için geçerli değildir. Bu iki maya türünün mikroskop altındaki benzer morfolojileri şekil 4.7.'de de gösterildiği üzere birbirlerinden ayrılmalarını zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, PNA-FISH testi ile GTT kombine edilirse germ tüp oluşturan ve yeşil renkli floresan veren maya hücrelerinin *C. albicans* olarak doğru şekilde tanımlanabileceği düşüncesindeyiz.

C. tropicalis sarı renk veren tek izolat olduğu için tanımlamada sorun yaşanmamıştır.

Tablo 5.1. Literatürden PNA-FISH performansını özetleyen örnekler

Yazarlar	Yıl	Mikroorganizmalar	Özet
Oliviera ve ark. (219)	2001	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	79 <i>C. dubliniensis</i> ve 70 <i>C. albicans</i> %100 duyarlılık ve %100 özgüllük
Rigby ve ark. (220)	2002	<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	23 referans suş ve 148 klinik suş (<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. tropicalis</i>) %100 duyarlılık ve %100 özgüllük
Wilson ve ark. (221)	2005	<i>C. albicans</i>	Üç farklı hastaneden 244 kan kültür örneği %99 duyarlılık, %100 özgüllük, %100 PPD, %99.3 NPD
Reller ve ark. (222)	2007	Beş yaygın <i>Candida</i> spp.	240 klinik örnek (<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. tropicalis</i>) %99 duyarlılık, %99 özgüllük
Shepard ve ark. (223)	2008	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Beş hastaneden 197 kan kültürü örneği <i>C. albicans</i> : %98.7 duyarlılık ve %100 özgüllük <i>C. glabrata</i> : %100 duyarlılık ve %100 özgüllük
Farina ve ark. (224)	2012	Beş yaygın <i>Candida</i> spp.	15 hastaneden 176 kan kültürü örneği %99.3 duyarlılık ve %100 özgüllük

Günümüzde invaziv *Candida* enfeksiyonları, sıklığı giderek artan ve epidemiyolojisi değişen önemli enfeksiyon hastalıkları olarak karşımıza çıkmaktadır (225-227). En ciddi formu olan kandidemi ise tek başına her yıl 6-24/100,000 kişiyi etkilemekte (225, 227, 228) ve %30-50 (229-232) arası mortalite oranları ile seyretmektedir. Bu durumun Amerika Birleşik Devletleri'ne yıllık maliyetinin 1 milyar \$ olduğu tahmin edilmektedir (233-235). Bu maliyetin büyük kısmı uzun hastane yatışına bağlı olmakla birlikte (234), antifungal tedavi, özellikle de AMB'nin lipit formülasyonları, ekinokandinler ve geniş spektrumlu triazololler de önemli bir yer tutmaktadır (233, 235, 236). Doğru antifungal seçimi ise dirençli izolatların artan sıklığı ile birlikte gittikçe karmaşık bir hal almaya başlamıştır (237-239).

Bu kaygılar ışığında, kandidemilerde en uygun antifungal ajanın seçimi ve tedavinin doğru şekilde yönlendirilmesi açısından antifungal duyarlılık testlerinin önemi artmaktadır (119, 240). Antifungal duyarlılık testlerindeki standardizasyonun sağlanmasına rağmen (105, 119, 240), birçok yazar ve çalışma grubu *Candida* spp.'nin rutin antifungal duyarlılık testlerinin etkenin tanımlanmasından sonra yapılması gerektiğini savunmaktadır (16, 113, 236, 241-245). Collins ve ark. (236) yaptıkları bir çalışmada, *C. glabrata*'ya bağlı kandidemilerde duyarlılık testlerinin sonucuna bağlı olarak pahalı ekinokandinler yerine FLU kullanımı sayesinde ortalama tedavi masraflarının azaldığını belirtmektedirler. Yazarlar ayrıca antifungal duyarlılık testlerinin günümüz dirençli organizma ve pahalı antifungal dünyasında bir zorunluluk haline geldiği görüşünü de savunmaktadırlar (236).

Antifungal duyarlılık testlerinde referans yöntem CLSI M27-A3'te standardize edilmiştir. Ancak bu yöntemin dezavantajı kan kültür şişesi pozitif sinyal verdikten sonra yapılan katı besiyeri pasajından uygulanması ve bu nedenle 48-72 saat sonraya kadar sonuç verememesidir. Bu testin, katı besiyeri pasajı beklenmeksizin şişeden direkt olarak uygulanmasıyla sonuç verme süresinin en az 24 saat daha kısalabileceğini düşünmekteyiz. Bu amaçla çalışmamızda antifungal duyarlılık testlerini hem direkt şişeden hem de klasik yöntemle uygun olarak çalıştık ve testlerin arasındaki uyumları karşılaştırdık.

Buna göre en yüksek uyum oranları direkt ve klasik MD testi ile elde edildi. Aynı uyum oranlarına Etest yöntemi ile ulaşamadı. Guinea ve ark. (246) ise yaptıkları bir çalışmada ± 2 katlık dilüsyondaki uyum oranları açısından direkt Etest,

klasik Etest ve klasik MD karşılaştırmışlardır. İzolat türleri ve antifungal ajanlara göre yaptıkları kıyaslamada bizim sonuçlarımızın tersine genel olarak en iyi uyumun direkt ve klasik Etest arasında olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar en uyumlu sonuçları CAS ile elde ettikleri halde bizim sonuçlarımıza göre uyum oranlarının en düşük olduğu antifungal CAS olarak belirlenmiştir. Chang ve ark. (163) 138 pozitif kan kültür şişesi kullanarak ± 1 katlık dilüsyondaki esansiyel uyum oranları açısından direkt Etest ve klasik Etest yöntemini klasik MD ile karşılaştırmışlar ve AMB için klasik Etest ile klasik MD uyum oranını %89.9, FLU için de %78.3 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise bu oranlar sırasıyla %68 ve %77 olarak bulunmuştur. Buna göre AMB için bizim uyumumuz daha düşük kalırken FLU için benzer uyum oranları gözlenmiştir. Özcan ve ark. (247) ise klasik Etest yöntemi ile elde ettikleri MİK değerlerini, klasik MD yöntemi ile buldukları değerlerle karşılaştırdıkları çalışmalarında, AMB için %84.7; FLU için %80.4 uyum olduğunu bildirmişlerdir.

Koehling ve ark. (248) klasik Etest ve EUCAST standartlarına göre yapılan klasik MD'yi karşılaştırıp uyum oranlarını değerlendirmişler ve genel olarak azollerde daha yüksek uyum oranı bulurken ekinokandinler ve özellikle de kaspofunginde bizim sonuçlarımıza benzer şekilde düşük uyum oranları saptamışlardır. Yazarlar CAS ile elde edilen düşük uyum oranlarını farklı markalardaki Etest şeritlerinin kullanımı ile açıklamışlardır (Liofilchem ve AB BİODİSK).

Bizim klasik Etest-MD karşılaştırmamızda da tatmin edici sonuçlar ortaya çıkmadığı görülmüştür. Esansiyel uyum oranı ≥ 90 (104) olarak belirlendiğinde hiçbir antifungal ajan ile bu uyum oranının elde edilemediği; ancak en yüksek uyum oranlarının ise AND (%87-88) ile gözlemlendiği saptanmıştır. Bu nedenle, Etest son derece pratik uygulanan kolay değerlendirilebilen bir yöntem olmakla birlikte, güvenilir sonuçların sağlanabilmesi için rutin antifungal duyarlılık testlerinde referans yöntemlerin kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

İnkübasyon süresi MİK sonuçlarında önemli bir etkiye sahiptir. Güncel literatür bilgilerine göre MİK değerlerini 24 saatte değerlendirmek 48 saatte değerlendirmeye göre daha iyi bir sonuç sağlamamaktadır. Ancak FLU uyumunu Etest ve CLSI M27-A2 referans yöntemiyle karşılaştıran bir çalışmada 24 saatte 48

saate göre *C. tropicalis* ve *C. albicans*'ta daha iyi bir uyum oranı gösterilmesine rağmen *C. glabrata* için iki sürede de daha düşük uyumlar bulunmuştur (104).

Başka bir çalışmada da POS uyumu Etest ve CLSI M27-A2 referans yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış ve *C. glabrata* ile *C. tropicalis*'te en düşük uyum oranları gösterilmiştir. Ancak *C. glabrata* için 24 saatlik esansiyel uyum (%72) 48 saate göre (%56) daha yüksek bulunurken; *C. tropicalis* içinse 48 saat uyumu (%71) 24 saat uyumundan (%39) daha yüksek bulunmuştur (249). Bizim çalışmamızda klasik Etest-klasik MD karşılaştırmasında etkenler arasında *C. albicans*, ajanlar arasında da AND hariç yüksek uyum oranları bulunamadı. Literatürle benzer şekilde 24 saat uyumlarının 48 saate göre daha yüksek olduğu gösterildi. Ancak tersine Chang ve ark. (163) 24 saat sonundaki direkt Etest ile klasik MD uyumlarını 48 saate göre daha düşük bulmuşlardır.

DD yöntemi ise sadece kategorik açıdan değerlendirildi. Burada da FLU ve VOR benzer sonuçlar verse de VOR'un uyum oranı FLU'nun uyum oranından hafifçe yüksek çıktı (VOR %89, FLU %85). Bu yöntemde de genelde olduğu gibi *C. glabrata* en düşük uyum oranı gösteren tür oldu.

Direkt ve indirekt uygulanan antifungal duyarlılık testleri arasında, özellikle referans mikrodilüsyon testinde, elde ettiğimiz yüksek uyum oranları, bu testlerin direkt kan kültür şişesinden de uygulanabilirliği açısından ümit verici olmuştur. Bu sayede antifungal duyarlılık testleri için gereken ilave zaman kayıpları ortadan kaldırılabilir ve hem tedavi doğru şekilde yönlendirilebilir hem de pahalı antifungallerin gereksiz kullanımı engellenerek tedavi maliyetleri düşürülebilir kanısındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda yer alan 62 *Candida* spp. izolatını kullanarak üç farklı konsantrasyon ve üç farklı kan kültür şişesi ile kandidemi simülasyonları yaptık. Şişe, izolat ve konsantrasyonlar arasındaki sinyal süresi farkını değerlendirirken aynı zamanda pozitif sinyal veren şişelerden erken tanı ile duyarlılık testleri uyguladık. Buna göre;

1. Kullanılan şişeler arasında Mycosis IC/F şişesinin diğer iki şişeye göre daha önce sinyal verdiği görüldü. Ancak aradaki süre farkı Peds Plus/F şişesi ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunurken, Aerobic/F Plus şişesi ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı.
2. Türler gere değerlendirildiğinde, *C. glabrata* için Mycosis IC/F şişesinin diğer iki şişeye belirgin üstünlük sağladığı görüldü. Dolayısıyla *C. glabrata*, kandidemilerin sık görülen ve nispeten dirençli bir etkeni olduğundan, kandidemi düşünülen olgularda kan kültürüne bu şişelerin de eklenmesinin erken tanıya katkı sağlayacağı düşünüldü.
3. Çalışmaya dahil edilen türler arasında *C. tropicalis* en kısa, *C. glabrata* ise en uzun sinyal süresine sahipti. Bu nedenle kandidemi düşünülen hastalarda geç sinyal süresi, etkenin *C. glabrata* lehine yorumlanabileceğini düşündürmektedir.
4. Beklendiği gibi, şişedeki fungal yük artışı sinyal süresini anlamlı oranda kısaltmıştır.
5. Tanımlama testlerinden PNA-FISH, kan kültür şişesi pozitif sinyal verdikten sonra yaklaşık iki saatte %100 doğrulukla en yaygın görülen beş *Candida* türünü tanımlayabilmekte ve etkenin antifungal direnç profili ile ilgili tahminde bulunabilmemize olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla kandidemi prevalansı yüksek sağlık kurumlarında bu testin çalışılması ile birlikte hem hasta prognozunun hem de maliyetlerin iyileştirebileceğini düşünmekteyiz.
6. PNA-FISH yönteminin tür düzeyinde *C. albicans*/*C. parapsilosis* ve *C. glabrata*/*C. krusei*'yi ayırt edememesi testin dezavantajı olarak görüldü. Ancak bu sorun, *C. glabrata* ve *C. krusei*'nin kan kültüründeki farklı mikroskopik özellikleri sayesinde, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* için ise direkt ve indirekt germ tüp testlerinin uygulanmasıyla aşılabildi.

7. Direkt CHROMagar ve API testleri klasik yöntemle karşılaştırıldığında doğruluk açısından aralarında herhangi bir fark bulunamadı. Ancak direkt testlerin en az 24 saat daha önce sonuç vermesi anlamlı bulundu. Dolayısıyla en az 24 saat daha erken elde edilebilecek identifikasyon sonuçlarıyla, enfeksiyon yönetiminin ve hasta prognozunun iyileştirilebileceği düşünüldü.
8. Duyarlılık testleri direkt kan kültür şişesinden ve klasik yoldan uygulandığında, referans mikrodilüsyon testi Etest ve disk difüzyon yöntemlerine göre hem kategorik hem de esansiyel uyum açısından daha başarılı bulundu. Bu nedenle özellikle mikrodilüsyon testinin, tüm antifungal ajanlarla yüksek uyum oranları da sergilediğinden, pozitif sinyal veren şişelere direkt uygulanabileceği ve böylece sonuçların en az 24 saat daha erken elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. İnci R, Hilmioglu S. Nozokomiyal fungal enfeksiyonlara yaklaşımlar. *Klinik Derg* 2000; 13: 28-31.
2. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 177-86.
3. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1692-6.
4. Yücesoy M, Yuluğ N. Kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* türlerinin antifungal ajanlara *in vitro* duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2000; 14: 71-8.
5. Erturan Z. Başlıca hastane enfeksiyonu etkeni mantarlar. *Aktüel Tıp Derg* 2002; 7: 14-8.
6. Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond. 2004. Nosocomial bloodstream infection in US hospitals: analysis of 4179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39: 309–317.
7. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2006; 27(5): 359-66.
8. Pfaller MA, Diekema DJ. International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: Global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Mar; 10 Suppl 1: 11-23.
9. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.* 2009; 48(12):1695–1703.

10. Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, Müller E, Putensen C, Rotstein C, Sganga G, Venditti M, Zaragoza Crespo R, Kullberg BJ. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med.* 2009; 35(1): 55–62.
11. Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(4): 798–804.
12. Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani MA. FIMUA-ECMM Candidaemia Study Group. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: *in vitro* susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(4): 777–779.
13. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, Sobel JD, Pappas PG, Kullberg BJ. Mycoses Study Group. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: A patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(8): 1110–1122.
14. Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP, et al. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med.* 1994; 331(20): 1325.
15. Barchiesi F, Schimizzi AM, Fothergill AW, Scalise G, Rinaldi MG. *In vitro* activity of the new echinocandin antifungal, MK-0991, against common and uncommon clinical isolates of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; 18(4):302-4.
16. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE. Infectious Diseases Society of America. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(2):161-89.

17. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009; 48(5): 503.
18. Alexander BD, Ashley ED, Reller LB, Reed SD. Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54(4): 277-82.
19. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MJ. Delaying empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: A potential risk factor for mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 3640-5.
20. Garey KW, Rege M, Pai M et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: A multi-institutional study. *Clin Infect Dis*. 2006; 43: 25-31.
21. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS et al. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2483-9.
22. Maaroufi Y, De Bruyne JM, Duchateau V et al. Early detection and identification of commonly encountered *Candida* species from simulated blood cultures by using a real-time PCR-based assay. *J Mol Diagn*. 2004; 6: 108-14.
23. Innings A, Ullberg M, Johansson A et al. Multiplex real-time PCR targeting the RNaseP RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 874-80.
24. Metwally L, Hogg G, Coyle PV et al. Rapid differentiation between fluconazole-sensitive and -resistant species of *Candida* directly from positive blood-culture bottles by real-time PCR. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 964-70.

25. Dunyach C, Bertout S, Phelipeau C et al. Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60: 263–71.
26. Shin JH, Nolte FS, Holloway BP et al. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 165–70.
27. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 2938-58.
28. Kwan Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea and Fabinger; 1992.
29. "5.8Ssequences"; CITED IN Cullings and Vogler, (1998), A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: Applications to ecology and evolution, *Molecular Ecology* (in press).
30. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins; 2006.
31. Öz Y. Vorikonazol, amfoterisin B ve kaspofunginin tek başına ve kombinasyonda *C. krusei* izolatlarına karşı in vitro farmakodinamik etkinliği. *Tıbbi Mikrobiyoloji Mikoloji Bilim Dalı Yan Dal Uzmanlık Tezi*. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir. 2010.
32. Lehmann PF. Fungal structure and morphology. In: Merz WG, Hay RJ, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th ed. London: Hodder Arnold; 2005. p. 69-81.
33. Chauhan N, Li D, Singh P, Calderone RA, Kruppa M. The cell wall of *Candida* spp. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 159-79.

34. Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(2): 281-310.
35. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R. Molecular organisation of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(1): 14-29.
36. Shea YR. Algorithms for Detection and Identification of Fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1745-61.
37. Gow NAR. Cell Biology and Cell Cycle of *Candida*. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 145-59.
38. Mitchell TG. Medical Mycology. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors. *Jawetz Medical Microbiology*. 23th ed. Boston: McGraw-Hill; 2004. 623-61.
39. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1762-88.
40. Hazen KC, Howell SA. Mycology and Antifungal Susceptibility Testing. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2004. 8.0.1.
41. Calderone RA, Gow NAR. Host Recognition by *Candida* species. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. Washington: ASM Press; 2002. p. 67-87.
42. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev.* 1991; 55: 1-20.
43. Pujol C, Renaud F, et al. Atypical strains of *Candida albicans* recovered from AIDS patients. *J Med Vet Mycology.* 1997; 35: 115-21.

44. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik A. Fungi pathogenic to humans: Molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol. 2009; 56(2): 211-24.
45. Odds FC, Gow NAR, Brown AJP. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In: Heitman J, Filler Sg, Edwards JE Jr, Mitchell AP, editors. Molecular principles of fungal pathogenesis. Washington: ASM Press; 2006. p. 305-19.
46. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture and drug resistance. J Bacteriol. 2001; 5385-94.
47. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect. 2003; 36: 223-8.
48. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: A review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit Rev Microbiol. 2009; 35.84: 283-309.
49. Ashman RB, Farah CS, Wanasaengsakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. Immunol Cell Biol. 2004; 82(2): 196-204.
50. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. Curr Opin Immunol. 2006; 18(4): 465-72.
51. Romani L. Immunology of Invasive Candidiasis. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press; 2002. p. 223-42.
52. Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press; 2002. p. 3-14.
53. De Rosa FG, Garazzino S, Pasero D, Di Perri G, Ranieri VM. Invasive candidiasis and candidemia: New guidelines. Minerva Anesthesiol. 2009; 75(7-8): 453-8.
54. Ruhnke M. Skin and Mucous Membran Infections. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press; 2002. p. 307-26.

55. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9(3): 335-48.
56. Redmond A, Dancer C, Woods ML. Fungal infections of the central nervous system: A review of fungal pathogens and treatment. *Neurol India.* 2007; 55(3): 251-9.
57. Thomas PA. Current perspectives on ophtalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(4): 730-97.
58. Sallah S, Wan JY, Nguyen NP, Vos P, Sigounas G. Analysis of factors related to the occurrence of chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia in a non-bone marrow transplant setting: A follow-up study. *Cancer.* 2001; 92(6): 1349-53.
59. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(10): 1455-60.
60. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, et al. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis.* 1992; 15: 414.
61. Nucci M, Colombo AL, Silveira F, et al. Risk factors for death in patients with candidemia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19: 846.
62. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Tanner DC, et al. Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. *Arch Intern Med.* 1995; 155: 2429.
63. Carol A Kauffman, Kieren A Marr, Anna R Thorner. 05/04/2015. Treatment of candidemia and invasive candidiasis in adults [online] UptoToDate. www.uptodate.com/contents/treatment-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults [04/06/2014].
64. Chang A, Neofytos D, Horn DL. Candidemia in the 21st Century Future Microbiology. 2008; 3(4): 463-472.

65. Puzniak L, Teutsch S, Powderly W, et al. Has the epidemiology of nosocomial candidemia changed? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; 25: 628-632.
66. Playford EG, Marriott D, Nguyen Q et al. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: Risk factors for non-*albicans* *Candida* spp. *Crit Care Med.* 2008; 36: 2034-2038.
67. Yapar N, Uysal U, Yucesoy M, Cakir N, Yuce A. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. *Mycoses.* 2006; 49(2): 134-8.
68. Erdem I, Oguzoglu N, Ozturk Engin D, Ozgultekin A, Inan AS, Ceran N, Kaya F, Genc I, Goktas P. Incidence, etiology and risk factors associated with mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Istanbul, Turkey. *Med Princ Pract.* 2010; 19(6): 463-7.
69. Yenigün Koçak B, Kuloğlu F, Doğan Çelik A, Akata F. Evaluation of epidemiological characteristics and risk factors of candidemia in adult patients in a tertiary-care hospital. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45(3): 489-503.
70. Richardson MD, Carlson P. Culture and non-culture based diagnostics for *Candida* species. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM Press; 2002. p. 387-94.
71. Marcos Y. and D.H. Pincus, Louise O'Connor and Barry Glyn, editors. *Fungal Diagnostics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 2013; 968: 25-55.
72. Çetinkaya Z, Fidan F, Ünlü M, Hasenekoğlu İ, Tetik L ve Demirel R, “Afyon Atmosferinde Alerjen Fungus Sporları”. *Akciğer Arşivi.* 2005; 6: 140-144.
73. Merz WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White

74. Çetinkaya Z, Altindis M, Aktepe OC ve Karabıcak N. “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Tanısında Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması”. Mikrobiyol Bul. 2003; 37: 269-276.
75. Shahzad et al. Human Fungal Infections: Need to Improve Diagnosis with New Biomarkers Developed by Translational Research Mol Med Ther. 2012.
76. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 93(3): 965-74.
77. 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.
78. Walsh TJ, Chanock SJ. Diagnosis of invasive fungal infections: Advances in nonculture systems. Curr Clin Top Infect Dis. 1998; 18: 101-53.
79. Laín A, Elguezabal N, Amutio E, Fernández de Larrinoa I, Moragues MD, Pontón J. Use of recombinant antigens for the diagnosis of invasive candidiasis. Clin Dev Immunol. 2008; 2008: 721950.
80. Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): 121-41.
81. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, et al. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: Useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol. 1999; 37(5): 1510-7.
82. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. Third European Conference on Infections in Leukemia Group. 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.
83. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, Hara K. Plasma (1->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with

- candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(12): 3115-8.
84. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, Ketchum PA, Finkelman MA, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(2): 199-205.
 85. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 465-84.
 86. Yeo SF, Huie S, Sofair AN, Campbell S , Durante A, Wong B. Measurement of serum D-arabinitol/creatinine ratios for initial diagnosis and for predicting outcome in an unselected, population-based sample of patients with *Candida* fungemia. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(11): 3894-9.
 87. Alexander BD, Pfaller MA. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(1): S15.
 88. White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(4): 479-86.
 89. Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, Wilks M, Millar MR, Agrawal SG. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 9): 1187-91.
 90. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10): 5122-8.
 91. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Campbell CK, Johnson EM. Ultra-rapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. *Med Mycol.* 2006; 44(5): 389-98.

92. Einsele H, Loeffler J. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 Suppl 4: 37-45.
93. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5): 2181-7.
94. Wang P. Recent advances in the rapid diagnosis of various infectious diseases by PNA-FISH. *Rev Med Microbiol.* 2009; 20: 56-62.
95. PNA-FISH *Candida*[online] AdvanDx. www.advandx.com/products/pna-fish/candida/ [11/07/2015].
96. Forrest GN. PNA FISH: present and future impact on patient management. *Expert Rev Mol Diagn.* 2007; 7: 231-236.
97. Smith J, Andes D. Therapeutic drug monitoring of antifungals: Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit.* 2008; 30(2): 167-72.
98. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition.
99. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition.
100. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline.
101. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline.
102. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.

103. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.
104. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, Reller LB. Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(3): 698-706.
105. Arikian S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol.* 2007; 45(7): 569-87.
106. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7(1): 107-19.
107. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61 Suppl 1: i13-18.
108. Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing. *Infect Dis Clin North Am.* 2006; 20(3): 699-709.
109. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(5): 1207-12.
110. Pfaller MA. New developments in the antifungal susceptibility testing of *Candida*. *Current Medicine Group LLC.* 2008; 2: 125-133.
111. Morace G, Amato G, Bistoni F, et al. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 2953–2958.
112. Pfaller MA, Jones RN. Performance accuracy of antibacterial and antifungal susceptibility test methods: Report from the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program (2001-2003). *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130: 767–778.

113. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Jones RN. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole, and ravuconazole. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4577–4580.
114. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, et al. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J Clin Microbiol.* 2008 (in press).
115. Cuenca-Estrella M, Lee-Yong W, Ciblak MA, et al. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 3644–3647.
116. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, et al. Comparison of visual 24-hour and spectrophotometric 48-hour MICs to CLSI reference microdilution MICs of fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for *Candida* spp.: A collaborative study. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4535–4540.
117. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, et al. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 467–474.
118. Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, et al. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 1–8.
119. Forrest G. Role of antifungal susceptibility testing in patient management. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19: 538–543.
120. Pfaller MA. Antifungal susceptibility testing methods. *Curr Drug Targets.* 2005; 6: 929–943.

121. Zambardi G, Parreno D, Monnin V, et al. Rapid antifungal susceptibility testing of medically important yeasts with VITEK 2 system [abstract M-1619]. Paper presented at the 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2005; 16–19.
122. Aubertine CL, Rivera M, Rohan SM, Larone DH. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. J Clin Microbiol. 2006; 44: 227–228.
123. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 Yeast Susceptibility Test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. J Clin Microbiol. 2007; 45: 796–802.
124. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. J Clin Microbiol. 2007; 45: 3522–3528.
125. Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. Med J Aust. 2007; 187(7): 404-9.
126. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2009.
127. Martinez R. An update on the use of antifungal agents. J Bras Pneumol. 2006; 32(5): 449-60.
128. Zonios DI, Bennett JE. Update on azole antifungals. Semin Respir Crit Care Med. 2008; 29: 198.
129. Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B et al. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: Results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. J Antimicrob Chemother. 2005; 55: 194.
130. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA et al. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species

- determined by Broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: Report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1440.
131. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003; 362(9390): 1142-51.
 132. Letscher-Bru V, Herbrecht R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother.* 200; 51(3): 513-21.
 133. Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: The newest class of antifungals. *Ann Pharmacother.* 2009; 43(10): 1647-57.
 134. Bennett JE. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med.* 2006; 355: 1154.
 135. Arikan S, Rex JH. Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology.* 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 1949-60.
 136. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: An 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1735.
 137. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 382.
 138. Oxman DA, Chow JK, Frenzl G, et al. Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: Is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern? *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1460.
 139. Hernandez S, López-Ribot JL, Najvar LK, et al. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: Correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1382.

140. Kofteridis DP, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Caspofungin-non-susceptible *Candida* isolates in cancer patients. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 293.
141. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 244.
142. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, et al. Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2002; 347(25): 2020-9.
143. Colombo AL, Ngai AL, Bourque M, Bradshaw SK, Strohmaier KM, Taylor AF, Lupinacci RJ, Kartsonis NA. Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-*albicans* *Candida* species: Review of the caspofungin database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(5): 1864-71.
144. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, Finkelievich J, Barnes R, Wadula J. Global Antifungal Surveillance Group. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: A global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(3): 842-9.
145. Pasquale T, Tomada JR, Ghannoun M, et al. Emergence of *Candida tropicalis* resistant to caspofungin. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 219.
146. Garcia-Effron G, Kontoyiannis DP, Lewis RE, Perlin DS. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 4181.
147. Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, et al. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1740.
148. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 1199.

149. Krogh-Madsen M, Arendrup MC, Heslet L, Knudsen JD. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin Infect Dis*. 2006; 42: 938.
150. Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK, et al. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 2373.
151. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: Clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013; 56: 1724.
152. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 2645.
153. Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA, et al. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 1213.
154. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 515.
155. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al. Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: Results from a global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 551.
156. Hakki M, Staab JF, Marr KA. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2522.
157. Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu MJ, et al. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 1876.

158. Gafter-Gvili A, Vidal L, Goldberg E, et al. Treatment of invasive candidal infections: Systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83: 1011.
159. Malani A, Hmoud J, Chiu L, et al. *Candida glabrata* fungemia: Experience in a tertiary care center. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 975.
160. Rex JH, Pfaller MA, Barry AL, et al. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 40.
161. Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, et al. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med.* 2002; 112: 380.
162. 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.
163. Chang HC, Chang JJ, Chan SH, Huang AH, Wu TL, Lin MC, Chang TC. Evaluation of Etest for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(4): 1328-33.
164. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement.
165. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: Analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(3): 819-26.
166. Clancy CJ, Nguyen MH. The end of an era in defining the optimal treatment of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2012; 54: 1123.
167. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *Am J Med.* 2002; 113: 480.

168. Kollef M, Micek S, Hampton N, et al. Septic shock attributed to *Candida* infection: Importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis*. 2012; 54: 1739.
169. Pfaller MA, Diekema DJ, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial program. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3254–3259.
170. Iatta R, Caggiano G, Cuna T, Montagna MT. Antifungal susceptibility testing of a 10-year collection of *Candida* spp. isolated from patients with candidemia. *J Chemother*. 2011; 23: 92–96.
171. Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE. Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 64: 402–407.
172. Forrest GN, 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: 3381–3383.
173. Bouza E, Sousa D, Muñoz P, et al. Bloodstream infections: A trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. *Clin Infect Dis*. 2004; 39: 1661–1669.
174. George BJ, Horvath LL, Hospenthal DR. Effect of inoculum size on detection of *Candida* growth by the BACTEC 9240 automated blood culture system using aerobic and anaerobic media. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 433–435.
175. Horvath LL, George BJ, et al. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 115–118.
176. Sogaard M, Hjort U, Hojbjerg T, Schonheyder HC. Detection of candidaemia in high risk patients: Can yield of blood cultures be improved by blind subculture? *Scand J Infect Dis*. 2006; 38: 187–191.

177. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): Variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis.* 1999; 29: 253-8.
178. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. For the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 627-30.
179. Metwally L, Walker MJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey BV, et al. Trends in candidemia and antifungal susceptibility in a university hospital in Northern Ireland, 2001-2006. *J Infect.* 2007; 55: 174-8.
180. Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA, Gransden WR, Holliman RE, Johnson EM, Perry JD, Sullivan DJ, Wilson JA. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. *J Hosp Infect.* 2003; 54(1): 18-24.
181. Nawrot U, Kowalska-Krochmal B et al. Evaluation of blood culture media for the detection of fungi. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34(1): 161-7.
182. Meyer MH, Letscher-Bru V, Jaulhac B, Waller J, Candolfi E. Comparison of Mycosis IC/F and plus Aerobic/F media for diagnosis of fungemia by the bactec 9240 system. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(2): 773-7.
183. Horvath LL, George BJ, Hospenthal DR. Detection of fifteen species of *Candida* in an automated blood culture system. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9): 3062-4.
184. Cobos-Trigueros N, Morata L, et al. Usefulness of time-to-positivity in aerobic and anaerobic vials to predict the presence of *Candida glabrata* in patients with candidaemia. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(12): 2839-41.
185. Huang L, Zhang YY, Sun LY. Time to positivity of blood culture can predict different *Candida* species instead of pathogen concentration in candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32(7): 917-22.

186. Chen LY, Yang SP, Chen TL, Liao SY, Chen YY, Chan YJ, Chen LK, Wang FD. Clinical significance of time to positivity for yeast in candidemia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015; 48(4): 425-30.
187. Ben-Ami R, Weinberger M, Orni-Wasserlauff R, et al. Time to blood culture positivity as a marker for catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2222–6.
188. Martinez JA, Pozo L, Almela M, et al. Microbial and clinical determinants of time-to-positivity in patients with bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 709–16.
189. 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.
190. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with plus aerobic/F and anaerobic/F blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(10): 4714-7.
191. Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr.* 1996; 129(2): 275-8.
192. Viganò EF, Vasconi E, Agrappi C, Clerici P. Use of simulated blood cultures for time to detection comparison between BacT/ALERT and BACTEC 9240 blood culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44(3): 235-40.
193. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. *Clinical Mycology*. 2nd ed. Churchill Livingstone, Elsevier Inc. 2009. p. 197-230.
194. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(10): 3508-9.

195. Terlecka JA, et al. 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.
196. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: A 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4): 1366-1377.
197. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1923–1929.
198. Bernal S, Mazuelos EM, Garcia M, Aller AI, Martinez MA, Gutierrez MJ. Evaluation of CHROMAagar *Candida* medium for isolation and presumptive identification of species of candida of clinical importance. *Mycology* 1996; 24: 201–204.
199. 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: 239–244.
200. Freydiere AM, Buchaille L, Gille Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997; 16: 464–467.
201. Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML, Green JA, Dooley DP. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4768–4770.
202. Houang ETS, Chu KC, Koehler AP, Cheng AFB. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J Clin Pathol.* 1997; 50: 563–565.
203. Huang L, Chen C, Chou C, Lu J, Chi W, Lee W. A comparison of methods for yeast identification including CHROMagar *Candida*, vitek system YBC and a traditional biochemical method. *Chin Med J.* 2001; 4: 568–574.

204. Odds FC, Davidson A. “Room temperature” use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 38: 147–150.
205. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 58–61.
206. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AM, Merz WG, Falkler WA, Meiller TF. Evaluation of a reformulated CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol*. 2001; 9: 2015–2016.
207. Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, Sanche SE, Cantu RA, Rinaldi MG, Patterson TF. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 3007–3012.
208. Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Perea S, Kirkpatrick WR, Rinaldi MG, Patterson TF. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* co-exist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 1621–1630.
209. Beighton D, Ludford R, Clark DT, et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 3025–3027.
210. Koehler AP, Chu K, Houang ETS, Cheng AFB. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 422–426.
211. Birinci A, Akkurt L, Acuner C, Unlu M, Durupinar B. Rapid identification of the *Candida* species from direct blood cultures by CHROMagar *Candida*. *J Int Med Res*. 2004; 32(5): 484-7.

212. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. J Clin Microbiol. 2003; 41(6): 2629-32.
213. Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, Posteraro P, Sanguinetti M. Update on the laboratory diagnosis of invasive fungal infections. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2011; 3(1): e2011002.
214. Karabıçak N, Uludağ Altun H, Karatuna O, Hazırolan G, Aksu N, Adiloğlu A, Akyar I. Evaluation of common commercial systems for the identification of yeast isolates in microbiology laboratories: A multicenter study. Mikrobiyol Bul. 2015; 49(2): 210-20.
215. 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.
216. Pappas PG. Invasive candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2006; 20(3): 485-506.
217. Arthington-Skaggs BA, et al. Candidemia Active Surveillance Group. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(8): 2477-81.
218. Shepard JR, Merz W, Gherna M, et al. Evaluation of yeast traffic light PNA FISH for detection of high prevalence *Candida* species. F-027. Presented at the 107th Annual American Society of Microbiology meeting. Toronto, Canada; May 21–25, 2007.
219. Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, Stender H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol. 2001; 39(11): 4138-41.

220. Rigby S, Procop GW, Haase G, et al. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(6): 2182-6.
221. Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB, Roberts GD, Hall GS, Alexander BD, Procop GW. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(6): 2909-12.
222. 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.
223. Shepard JR, et al. Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(1): 50-5.
224. Farina C, Perin S, Andreoni S, Conte M, Fazii P, Lombardi G, Manso E, Morazzoni C, Sanna S; Medical Mycology Committee (CoSM) 'Fungemia Diagnosis Study Group', Italian Society of Clinical Microbiology (AMCLI). Evaluation of the peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridisation technology for yeast identification directly from positive blood cultures: An Italian experience. *Mycoses.* 2012; 55(5): 388-92.
225. Hajjeh RA, et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(4): 1519-27.
226. Pappas PG, et al; NIAID Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: Epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(5): 634-43.
227. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1): 133-63.

228. Kao AS, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: Results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis*. 1999; 29(5): 1164-70.
229. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(9): 1172-7.
230. Pagano L, Caira M, et al. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: Results of the SEIFEM B-2004 study-Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(9): 1161-70.
231. Pagano L, Caira M, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006; 91(8): 1068-75.
232. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med*. 1988; 148(12): 2642-5.
233. Miller LG, Hajjeh RA, Edwards JE Jr. Estimating the cost of nosocomial candidemia in the united states. *Clin Infect Dis*. 2001; 32(7): 1110.
234. Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Beney J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health*. 2002; 5(1): 26-34.
235. Pelz RK, Lipset PA, Swoboda SM, et al. Candida infections: Outcome and attributable ICU costs in critically ill patients. *J Intensive Care Med* 2000; 15: 255–261.
236. Collins CD, Eschenauer GA, Salo SL, Newton DW. To test or not to test: A cost minimization analysis of susceptibility testing for patients with documented *Candida glabrata* fungemias. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(6): 1884-8.
237. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 2008, 46: 120–128.

238. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. *Clin Infect Dis*. 2006; 43 (Suppl 1): S3–14.
239. Rogers TR. Antifungal resistance: Limited data, dramatic impact? *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27S: S7–11.
240. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61 (Suppl 1): i13–18.
241. Baddley JW, Patel M, James M, et al. Utility of real-time antifungal susceptibility testing for fl uconazole in the treatment of candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50: 119–124.
242. Hadley S, Martinez JA, McDermott L, et al. Real-time antifungal susceptibility screening aids management of invasive yeast infections in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49: 415–419.
243. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 48: 153–160.
244. Magill SS, Sheilds C, Sears CL, et al. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: Case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 529–535.
245. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis*. 2002; 35: 982–989.
246. Guinea J, Recio S, Escribano P, Torres-Narbona M, Peláez T, Sánchez-Carrillo C, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Rapid antifungal susceptibility determination for yeast isolates by use of Etest performed directly on blood samples from patients with fungemia. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(6): 2205-12.
247. Özcan SK, Mutlu B, Dündar D, Willke A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının belirlenmesinde buyyon mikrodilüsyon ile Etest yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2010; 44: 263-71.

248. Koehling HL, Willinger B, Buer J, Rath PM, Steinmann J. Comparative evaluation of a new commercial colorimetric microdilution assay (SensiQuattro *Candida* EU) with MIC test strip and EUCAST broth microdilution methods for susceptibility testing of invasive *Candida* isolates. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(1): 255-61.
249. Sims CR, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L. Correlation between microdilution, Etest, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(6): 2105-8.

